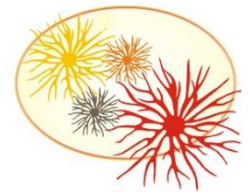




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Alinne Hoisler Ayech Monteiro

**Avaliação da toxicidade de curativo impregnado com prata
nanocristalina no verme *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
da Universidade Federal do Rio Grande
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr. José María Monserrat

Rio Grande 2019

“And if you listen very hard
The tune will come to you, at last
When all are one and one is all
To be a rock and not to roll”

Stairway to Heaven – Led Zeppelin

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande – FURG e ao Instituto de Ciências Biológicas – ICB, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PPGCF, à CAPES pelo fomento, durante os 2 anos de mestrado.

Ao meu orientador, José María Monserrat, ao qual tive a honra de ser orientada desde a graduação, pelo apoio e compreensão, exemplo de ética e profissionalismo, ao qual levarei por toda minha vida profissional e acadêmica.

Ao grupo EAOx, e todos os colegas envolvidos, que de alguma maneira me ajudaram ao longo desta caminhada.

Aos colegas que estiveram ao meu lado, desde as disciplinas, Jenifer, Thiago, Heloísa, e a princesa Anaéli, que trouxe brilho aos meus dias mais cinzas, á Miriam, aluna de iniciação científica, que trabalhou forte, não poupando finais de semana. Á Analía Ale, presente que ganhei da Argentina, e a qual espero trabalhar novamente.

Ao amor da minha vida, meu companheiro Maurício, que enfrentou tudo ao meu lado, ansiedade, noites mal dormidas, sempre comigo, levantando minha autoestima. Minha admiração pelo ser humano que tu é, não cabe aqui. Cada conquista alcançada, é em parte tua também, me guiaste e por mais cansados que estivéssemos, tu sempre acreditaste em mim. Eu te amo muito.

Minha mãe Sandra, meu anjo da guarda e meu pai Abdel, que acreditaram no meu potencial, investiram em mim e lutaram muito para que eu pudesse chegar até aqui.

Muito obrigada!

1	Sumário	
2	Resumo geral	5
3	Abstract	6
4	Introdução geral	7
5	O curativo Acticoat Flex 3	12
6	Organismo modelo: <i>C. elegans</i>	14
7	Toxicidade das nanopartículas de prata	16
8	Objetivo geral	20
9	Objetivos específicos	20
10	Manuscrito	21
11	Title page	22
12	Abstract	23
13	1. Introduction	24
14	2. Materials and methods	26
15	2.1. Coated dressings acquisition	26
16	2.2. Observation of silver crystals by Scanning Electron Microscopy	26
17	2.3. Observation of silver crystals by Transmission Electron Microscopy	26
18	2.4. Zeta potential measurement	26
19	2.5. Ionic release of silver from nanoparticles	27
20	2.6. Silver concentration in the coated dressing	27
21	2.7. Silver in the NGM medium	27
22	2.8. Antibacterial power of coated dressing	28
23	2.9. Animal model and maintenance	28
24	2.10. Preparation of animals for experiments	29
25	2.11. Plate preparation	29
26	2.12. Growth assessment	31
27	2.13. Fertility assessment	32
28	2.14. Reproduction assessment	32
29	2.15. Reactive oxygen species concentration (ROS) dosage	32
30	2.16. Statistics	33
31	3.1. Results and discussion	33
32	3.1. Physico-chemical results	33
33	3.1.1. Characterization of silver-coated dressing	33
34	3.1.2. Ionic release of silver	35
35	3.2. Toxicity evaluation in <i>C. elegans</i>	35
36	3.2.1. Reactive oxygen species concentration (ROS) dosage	35
37	3.2.2. Physiologic parameters	36
38	4. Conclusions	38
39	References	38
40	Figures captions	42
41	Tables	44
42	Figures	45
43	Supplementary material	53
44	Discussão geral	62
45	Conclusão	65
46	Bibliografia geral	66
47		
48		
49		

50 **Resumo geral**

51 Uma crescente demanda na utilização de nanomateriais tem ocorrido nos últimos anos
52 abrangendo produtos como cosméticos e fármacos. No entanto, as informações sobre a
53 toxicidade dos produtos advindos das nanotecnologias ainda são limitadas. As
54 nanopartículas de prata são utilizadas como bactericida e se fazem presentes em
55 fármacos, materiais cirúrgicos, curativos, tecidos, entre outros. Dentre eles temos o
56 Acticoat Flex 3, um curativo utilizado em ferimentos como queimaduras e, segundo o
57 fabricante Smith e Nephew, é elaborado a base de prata nanocristalina. Após a
58 utilização destes produtos, o descarte de maneira incorreta pode causar efeitos
59 toxicológicos nos organismos presentes no ambiente. Visando avaliar a potencial
60 periculosidade ambiental deste curativo, foi escolhido como organismo teste
61 *Caenorhabditis elegans*, nematoide de vida livre que mede cerca de 1 mm. Nos ensaios
62 foram utilizadas placas de 24 poços contendo 4 tamanhos diferentes de recortes do
63 curativo, para obtenção de distintas concentrações onde animais em estágio larval L1 e
64 L4 foram expostos. Estes recortes estiveram dispostos entre 2 camadas de ágar durante
65 3 dias e então a bactéria *Escherichia coli* (cepa OP50) foi adicionada como alimento
66 para os vermes. Após o período de exposição, foram avaliados o crescimento, a
67 reprodução, a fertilidade e a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no
68 verme. No curativo foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e
69 de transmissão, além de análises de prata liberada no meio, do potencial zeta, da
70 liberação iônica e do poder antibacteriano em duas cepas bacterianas (*Pseudomonas*
71 *aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). Foi verificado o poder antibacteriano do curativo
72 para as duas cepas testadas, e a caracterização do curativo mostrou nanopartículas
73 heterogêneas; Resultados como maior concentração de ERO, redução no crescimento,
74 fertilidade e reprodução no verme indicam o potencial tóxico deste produto.

75 **Palavras chave:** Nanotecnologia, Antibacteriano, Estresse oxidativo, Toxicidade,
76 Nanopartículas de prata

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89 **Abstract**

90 There has been growing demand for nanomaterials has occurred in recent years
91 covering products such as cosmetics and pharmaceuticals. However, information on the
92 toxicity of nanotechnology products is still limited. Silver nanoparticles are used as a
93 bactericide and are present in drugs, surgical materials, dressings, tissues, among others.
94 Inside them are Acticoat Flex 3, a coated dressing used on wounds such as burns and,
95 according to manufacturer Smith and Nephew, is made of nanocrystalline silver. After
96 the use of these products, improper disposal may cause toxicological effects on
97 organisms in the environment. To evaluate the potential environmental hazard of this
98 dressing, the *Caenorhabditis elegans* test organism, a free-living nematode measuring
99 about 1 mm, was chosen as a test organism. The tests were performed in 24-well plates
100 containing 4 different sizes of coated dressing to obtain different concentrations where
101 L1 and L4 larval stage animals were exposed. These cutouts were placed between 2
102 layers of agar for 3 days and then the *Escherichia coli* bacteria (strain OP50) was added
103 as food for the worms. After the exposure period, growth, reproduction, fertility, silver
104 concentration in the medium, and the concentration of reactive oxygen species (ROS) in
105 the worm were evaluated. Scanning and transmission electron microscopy analyses
106 were performed, as well as analysis of zeta potential, ionic release and antibacterial
107 power in two bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*).
108 The antibacterial power of the dressing was verified for all two strains tested, and the
109 characterization of the dressing showed heterogeneous nanoparticles. Results such as
110 the higher concentration of ROS, reduction in growth, fertility, and reproduction
111 indicate the toxic potential of this product.

112 Keywords: Nanotechnology, Antibacterial, Oxidative Stress, Toxicity, Silver
113 Nanoparticles

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

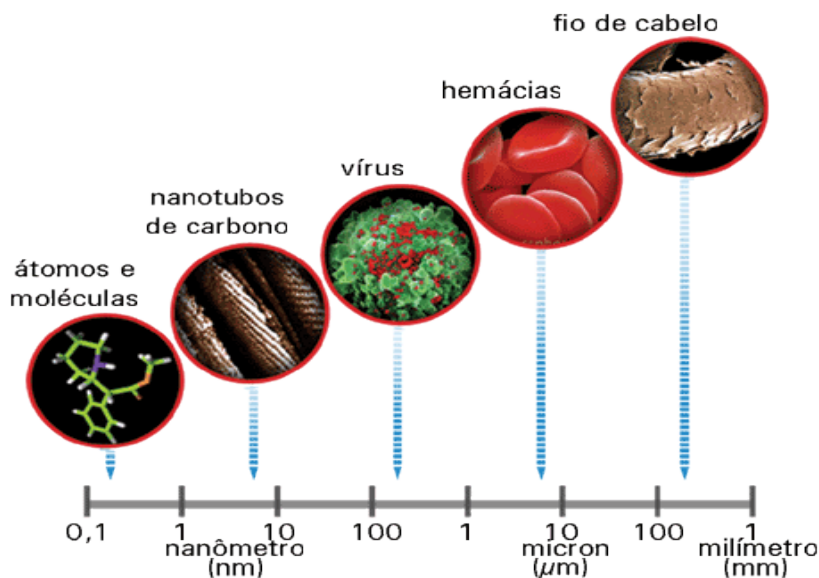
124

125

126

127 **Introdução Geral**

128 A nanociência é um ramo do conhecimento voltado ao estudo de moléculas e
129 estruturas no seu princípio fundamental. Um nanômetro é uma medida correspondente à
130 bilionésima parte do metro (10^{-9}), e os nanomateriais são considerados aqueles com,
131 pelo menos, uma dimensão nesta faixa de tamanho (Ratner et al., 2003) (**Figura 1**). Na
132 escala nanométrica, os materiais podem apresentar características químicas e físicas
133 distintas daquelas apresentadas pelo mesmo em escala superior (ISO 27.628/2007). As
134 nanopartículas podem ocorrer de maneira natural ou antropogênica e, quando
135 fabricadas, podem ser classificadas em diferentes grupos, como nanopartículas
136 inorgânicas não metálicas, nanopartículas metálicas como as nanopartículas de prata,
137 nanomateriais a base de carbono como os nanotubos de carbono, dentre outras
138 classificações (Future Markets, 2015).



139

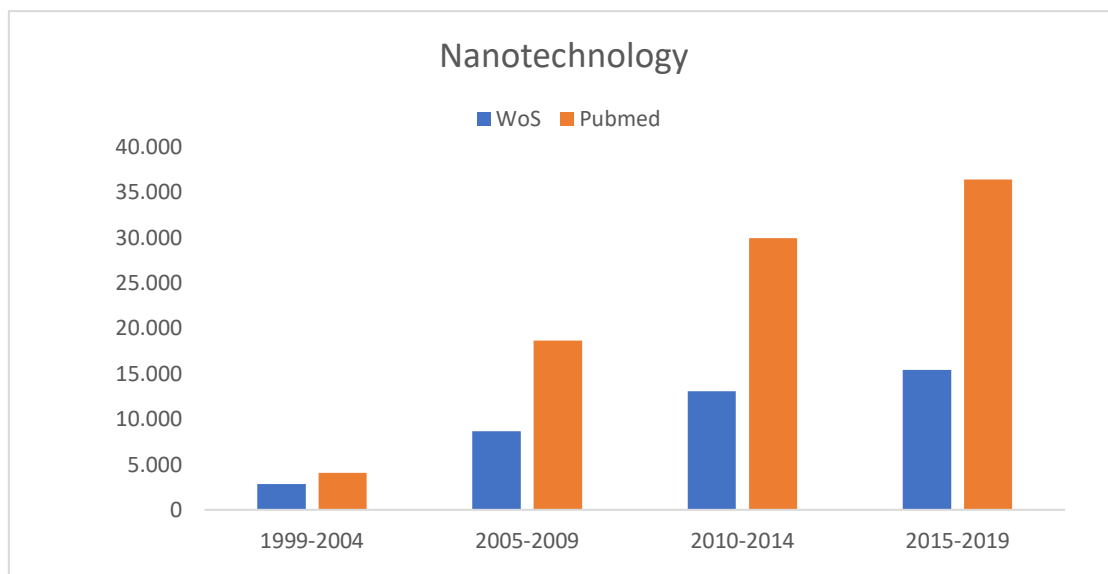
140 Figura 1. Escala de comparação de tamanhos da escala nanométrica à milimétrica. Imagem retirada do
141 site <https://nanomateriais.wordpress.com/2015/09/14/nanomateriais/>

142

143 Realizando uma análise do contexto atual e no futuro próximo, é incontestável o
144 papel fundamental desempenhado pelas nanotecnologias, no entanto esta área científica

145 multidisciplinar requer uma regulamentação para ser utilizada com segurança (Ferreira
146 et al., 2015). Ao longo dos últimos anos observou-se uma crescente aplicação das
147 nanotecnologias em uma vasta gama de produtos, gerando um aumento da produção de
148 nanomateriais, o que de um ponto de vista econômico impulsionou o mercado (Oliveira
149 et al., 2015).

150 Em uma breve pesquisa efetuada entre os dias 29/05/2019 e 09/06/2019 em
151 algumas plataformas de indexação de artigos científicos como a Pubmed e a Web of
152 Science, podemos observar um crescente interesse dentro dessa área nos últimos 20
153 anos, usando como palavras chave: “nanotechnology” (**Figura 2**).

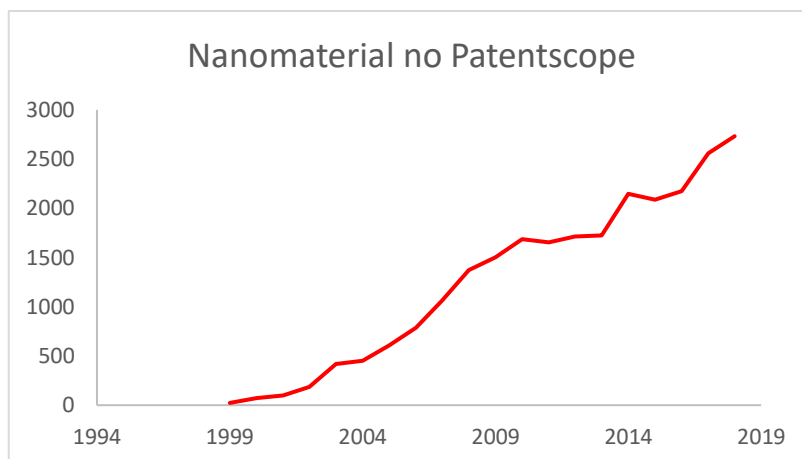


154

155 Figura 2. Publicações nas áreas de nanotecnologia, ao decorrer dos últimos 20 anos, nas plataformas de
156 indexação de artigos científicos Web of Science (WoS) e Pubmed. Pesquisa efetuada entre os dias
157 29/05/2019 e 09/06/2019

158

159 Os dados relacionados a patentes respondem exponencialmente, quando
160 pesquisados com a palavra-chave “nanomaterial”, como mostra pesquisa realizada no
161 site Patentscope (banco de dados Globais), realizada em junho de 2019 (**Figura 3**).



162

163 Figura 3. Patentes que fazem uso de nanomateriais, indexadas no site Patentscope
 164 (<https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf>)

165

166 Observando o atual contexto em que se encontram as nanotecnologias, é
 167 inegável o papel que as mesmas têm desempenhado no desenvolvimento econômico
 168 mas, ao mesmo tempo, o Brasil não possui legislação que regule o uso seguro
 169 destes materiais. Existem alguns trâmites jurídicos envolvendo a regulamentação da
 170 Nanotecnologia como o projeto de lei PL 5.076/2005 que dispõe sobre a pesquisa e o
 171 uso da nanotecnologia no País, cria a Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança -
 172 CTNano, institui o Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia - FDNano e dá
 173 outras providências, mas que atualmente encontra-se arquivado. Outro projeto visando
 174 à regulamentação da nanotecnologia é o projeto de lei PL 5.133/2013, em tramitação,
 175 que regulamenta a rotulagem de produtos que fazem uso da nanotecnologia. Além dos
 176 projetos citados, outros encontram-se arquivados (Ferreira et al., 2015).

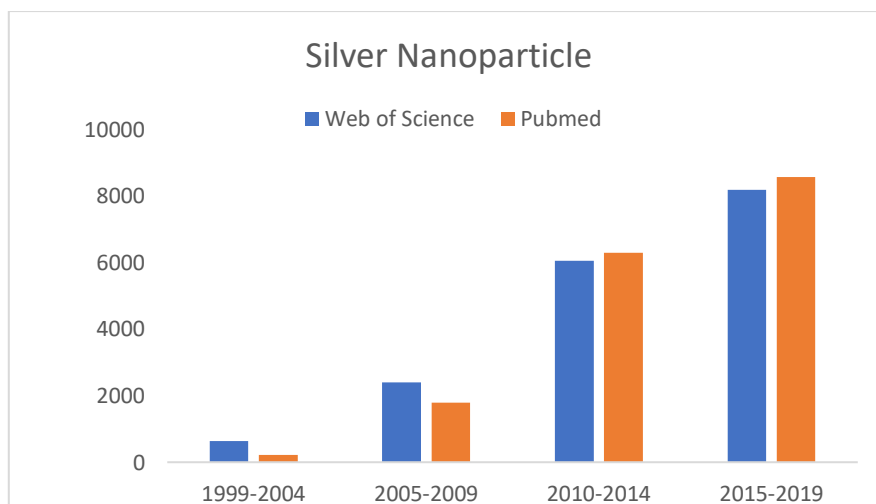
177 Visando uma melhor padronização foi em criado em 2013 o Projeto NANoREG
 178 que trata da regulamentação internacional em nanotecnologia. No ano seguinte o Brasil
 179 oficializou sua participação. Segundo o site do NANoREG:

180 Com o objetivo de fornecer às agências reguladoras e aos legisladores do Brasil
 181 as ferramentas necessárias para que se tenha uma regulamentação em
 182 nanotecnologia embasada em conhecimentos científicos, em consonância com

183 a regulamentação mundial e que dê segurança a trabalhadores, consumidores e
184 ao meio ambiente (MCTI).

185 Segundo Navarro e colaboradores (2008), há inúmeras formas de aplicação
186 destes nanomateriais que, aliados à sua mobilidade, possuem uma maneira facilitada de
187 chegar até o ambiente, podendo então exercer algum tipo de dano. Dentre os
188 nanomateriais mais pesquisados, as nanopartículas de prata se destacam, pela sua
189 aplicabilidade, ligada a produção de fármacos, cosméticos dentre outros (Niska et al.,
190 2018).

191 Pesquisando “Silver Nanoparticle” como palavra-chave em plataformas de
192 indexação de artigos científicos, é possível observar um crescente interesse e aplicação
193 do produto, assim como também é observado o resultado exponencial quando se trata de
194 nanotecnologia e nanomateriais (**Figura 4**).



195

196 Figura 4. Publicações relacionadas a nanopartículas de prata, ao decorrer dos últimos 20 anos, nas
197 plataformas de indexação de artigos científicos Web of Science (WoS) e Pubmed. Pesquisa efetuada entre
198 os dias 29/05/2019 e 09/06/2019.

199

200 A prata tem suas características antimicrobianas conhecidas há muitos anos, seu
201 uso na desinfecção de feridas está documentado desde o século XVIII, durante o qual
202 foi utilizado nitrato de prata (AgNO_3) no tratamento de úlceras mas, com a descoberta

203 da penicilina, o uso da prata como bactericida entrou em declínio (Klasen, 2000; Chopra
204 et al., 2007). Nos últimos tempos, devido ao surgimento de cepas bacterianas com
205 resistência a antibióticos convencionais, a prata novamente ganhou foco no meio
206 científico com o objetivo de desenvolver novos bactericidas eficientes (Chopra et al.,
207 2007; Gurunathan et al., 2014).

208 Com base no já conhecido poder antimicrobiano da prata, a mesma em escala
209 nanométrica, tem ganhado atenção entre os nanomateriais aplicados a indústria, o que
210 ocasionou um aumento na utilização de nanopartículas de prata. Há uma gama de
211 materiais que utilizam nanop prata como matéria prima, incluindo curativos para feridas,
212 instrumentos cirúrgicos, dentre outros (Bosetti et al., 2002; Cohen et al., 2007; Chen et
213 al., 2008).

214 Os curativos hoje disponíveis no mercado internacional e também no Brasil tem
215 presente em sua composição variados níveis de concentração de prata, como exemplo o
216 Acticoat (Smith e Nephew) e Actisorb (Johnson e Johnson) (Chopra et al., 2007;
217 Paladini, et al., 2013). Rigo et al. (2012) realizou um estudo comparando a eficácia
218 antibacteriana em uma cepa resistente *Acinetobacter baumannii*, onde dentre os
219 bactericidas selecionados, estavam a sulfadiazina de prata e o ACTICOAT, sendo que o
220 curativo apresentou maior eficácia antibacteriana.

221 Entre as vantagens relacionadas ao uso de prata nanocristalina em curativos,
222 encontram-se o maior poder de eliminação de bactérias, fácil utilização, melhor
223 cicatrização e liberação prolongada, o que permite trocas de curativos com menor
224 frequência, gerando menor desconforto para o paciente e um efeito antimicrobiano mais
225 eficiente e prolongado (Khundkar et al., 2010).

226

227 **O curativo ACTICOAT FLEX 3**

228 A empresa Smith e Nephew, que é a responsável pela fabricação do curativo
229 Acticoat Flex, comercializa o ACTICOAT® FLEX 3 (número de registro na ANVISA:
230 80804050025) e o ACTICOAT® FLEX 7, com diferenças na concentração máxima de
231 prata declarada (1,64 mg/cm² e 2,0 mg/cm², respectivamente). Os produtos
232 ACTICOAT® FLEX 3 e ACTICOAT® FLEX 7 funcionam como barreira
233 antimicrobiana ativa no mínimo durante 3 e 7 dias, de acordo com as especificações do
234 fabricante.

235



236

237 Figura 5. A imagem mostra o curativo ACTICOAT FLEX 3 em sua respectiva embalagem e sendo
238 manuseado, onde é possível observar elasticidade no material.
239 https://schaanhealthcare.ca/collections/wound-care/wound-care_dressings
240 <http://www.saavedra.com.br/produtos/feridas-crOnicas/4/acticoat/17>

241

242 Segundo o fabricante o produto possui as seguintes especificações que estão
243 contidas em sua bula:

Poliéster flexível	
Fornecedor:	APEX Mills Corp.
Composição:	100% poliéster flexível

Tipo do produto:	XA42C
Peso de Base:	0.663 – 0897 g/100 cm ²
Largura:	40 + 20%
Espessura:	0.378 mm – 0.511 mm
Comprimento:	58 + 20%
Bioburden:	< = 1000 CFU* (NAMSA)*

244 Cfu* – colony-forming units (unidade formadora de colônias): número de células microbianas viáveis
245 coletadas para uma dada amostra. NAMSA* - organização de pesquisa médica

Prata	
Fornecedor:	Academy Group
Composição:	99.99% ou 0.9999
Tipo do produto:	Prata
Bi < 5 ppm (método Dynatec ALAP0258/ALAP0032/ALAP0119)* Cu < 100 ppm Fe < 10 ppm Pb < 10 ppm Pd < 10 ppm Se < 5 ppm	
Impurezas	Te < 5 ppm
Perpendicularidade	Pontas são usinadas dentro de 0.2 mm para minimizar as pontas entre os “tiles”
Tamanho do Grão	< 500 microns em todos os planos com distribuição uniforme (Método sulzer Metco AP – 1089)
Nivelamento	0.8 mm / m linear)
Têmpera	Anelado para uma têmpera suave

246

247 Consultando o site da ANVISA

248 (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351714474201331/>) é possível encontrar os

249 seguintes dados: Consulta ANVISA 26/05/2019

Detalhes do Produto			
Nome da Empresa	Smith & Nephew Comércio de Produtos Médicos Ltda.		
CNPJ	13.656.820/0001-88	Autorização	8.08.040-5
Produto	CURATIVO ANTIMICROBIANO ACTICOAT FLEX		
Modelo Produto Médico			
ACTICOAT FLEX 3 - 66800396 / 66800398 / 66800399 / 66800409 / 66800419 / 66800432 / 66800435, ACTICOAT FLEX 7 - 66800395 / 66800397 / 66800420 / 66800400 / 66800401.			
Nome Técnico	Curativo		
Registro	80804050025		
Processo	25351.714474/2013-31		
Origem do Produto	<ul style="list-style-type: none"> FABRICANTE: SMITH & NEPHEW MEDICAL LIMITED - INGLATERRA (REINO UNIDO) 		
Classificação de Risco	III - ALTO RISCO		
Vencimento do Registro	24/01/2026		

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260 **Organismo modelo: *Caenorhabditis elegans***

261

262

263

264

265

Produtos como esses em questão, após sua utilização, acabam por se tornar lixo hospitalar em potencial. A Resolução do CONAMA 358/2005 trata da disposição adequada desses resíduos, mas, no entanto, a complexidade organizacional do lixo de instituições da saúde pode representar sérios problemas para seus gestores (Camargo, 2009). Caso a gestão do lixo hospitalar for inadequada, esta situação pode causar sérios impactos ambientais, e a inserção de novos materiais, ainda pouco conhecidos em termos de sua toxicidade, poderia agravar essa situação (Cafure e Patriarcha-Graciolli, 2014).

O verme de vida livre *Caenorhabditis elegans* encontrado em solos úmidos (fração líquida) é um nematóide encontrado em todo mundo (Riddle et al., 1997). É um organismo amplamente aplicado em estudos experimentais em função de possuir um ciclo de vida curto, ser transparente e de tamanho pequeno, e de fácil cultivo além de ser muito sensível as alterações do meio, podendo assim apresentar alterações na sua

266 reprodução, ciclo de vida, além de várias outras respostas ao chegar na fase adulta, na
267 qual pode atingir 1,5 mm de comprimento (Brenner, 1974; Brenner, 1988).

268 Os indivíduos são em sua maioria hermafroditas e se autofecundam. Quando
269 grávidos, liberam seus ovos, que após eclodirem, passarão por 4 estágios larvais (L1,
270 L2, L3, e L4) passando logo para jovem adulto e, finalmente, entrar em sua fase adulta
271 (Figura 6) e assim dar origem a uma nova progenia (Gonzalez-Moragas e Laromaine,
272 2015). O ciclo de vida na cepa selvagem N2 Bristol dura aproximadamente 21 dias
273 (Raizen et al., 2008) (Figura 7).

274 O verme se alimenta de bactérias, especialmente da *Escherichia coli* (viva ou
275 morta) (Liu et al., 2012). Quando induzido a situações de estresse, como falta de
276 alimento, variação de temperatura ou alta densidade populacional, os nematoides que se
277 encontram em estágio L1, podem entrar em um estágio de diapausa denominado Dauer
278 (Riddle, 1997) (Figura 7).

279



280

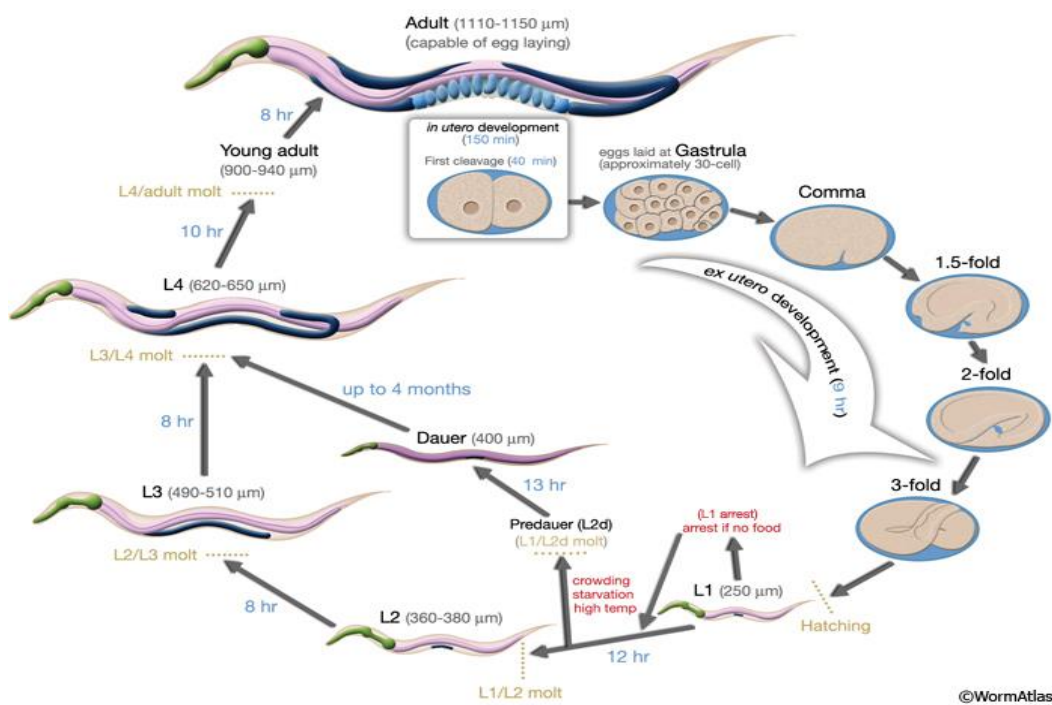
281 Figura 6. Imagem de um verme adulto, onde é possível observar a transparência do animal. Extraído de
282 <http://www.socmucimm.org/overview-model-organism-c-elegans/>

283

284 Gonzalez et al. (2015) salientam os aspectos positivos da utilização da espécie
285 *C. elegans* aplicada da área das nanociências e sua importância em estudos que
286 envolvam nanotoxicidade, trazendo respostas como a compreensão da interação dos

287 nanomateriais com diferentes superfícies biológicas, dentre outras. Ainda, é importante
288 salientar que esta espécie foi, de fato, uma das selecionadas como organismo teste na
289 iniciativa NanoReg (NanoReg, 2017).

290 Como descrito anteriormente, dados demonstram que a exposição as
291 nanopartículas podem ocasionar estresse afetando a sobrevivência do organismo.
292 Segundo Koojiman (2010), o estresse pode desencadear uma adaptação metabólica,
293 como por exemplo, a realocação de energia do crescimento e reprodução para evitar que
294 não seja subtraída energia da manutenção basal do animal.



295

296 Figura 7. Imagem extraída WormAtlas onde é mostrado o ciclo de vida do verme *C.elegans*.

297

298 Toxicidade das nanopartículas de prata

299 A prata, como bactericida, é utilizada em variados produtos, onde as
300 nanopartículas (AgNPs) deste agente se apresentam impregnadas nas superfícies destes

301 produtos, podendo levar a liberação de íons de prata (Ag^+), a qual é associada com a
302 eficácia antimicrobiana (Wijnhoven et al., 2009).

303 Assim como acontece com outras nanopartículas, as AgNPs, apresentam
304 diferente toxicidade de acordo com sua relação tamanho/superfície. Assim, quanto
305 menor a partícula, maior sua toxicidade, já que partículas menores atravessam mais
306 facilmente as membranas celulares. Devido ao seu tamanho pequeno e elevada
307 superfície relativa, a interação com organelas se torna facilitada (Liu et al., 2010; Wang
308 et al., 2013; Gliga, 2014). Quando as nanopartículas chegam até as células podem entrar
309 nas mesmas por duas principais vias: membrana plasmática (através de canais de
310 membrana ou de maneira direta) e/ou por endocitose (Singh et al., 2009). Diversos
311 estudos têm mostrado citotoxicidade de nanopartículas de prata para linhagens de
312 células humanas, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), dano oxidativo, e
313 afetando a viabilidade celular (Arora et al., 2008; Greulich et al., 2009; Kawata et al.,
314 2009). Também foram vistos os mesmos efeitos para células de diversos outros
315 mamíferos (Ahamed et al., 2010). Para melhor visualização da toxicidade que as
316 nanopartículas de prata podem causar em uma célula, a Figura 8, adaptada de AshaRani
317 et al. (2009), resume de maneira clara as vias pelas quais as partículas interagem com a
318 célula. A partir da imagem é possível observar que as nanopartículas podem ingressar
319 na célula via endocitose, difusão ou pelos canais de membrana. Uma vez no interior, as
320 moléculas se acumulam no exterior na mitocôndria, levando a geração de ERO. É
321 possível também que as AgNPs interajam com as organelas, gerando dano oxidativo de
322 proteínas, membrana e DNA. Outro possível mecanismo, ilustrado na Figura 8, envolve
323 a interação das nanopartículas e os íons de prata, na liberação de Ca^{2+} no citoplasma.
324 Essa liberação desencadeia cascatas de sinalização celular que ativam enzimas
325 catabólicas, como fosfolipases, proteases e endonucleases, levando ao dano nas

326 membranas mitocondriais e no citoesqueleto que pode culminar na morte celular
327 programada (Orrenius et al, 1992).

328

329

330

331

332

333

334

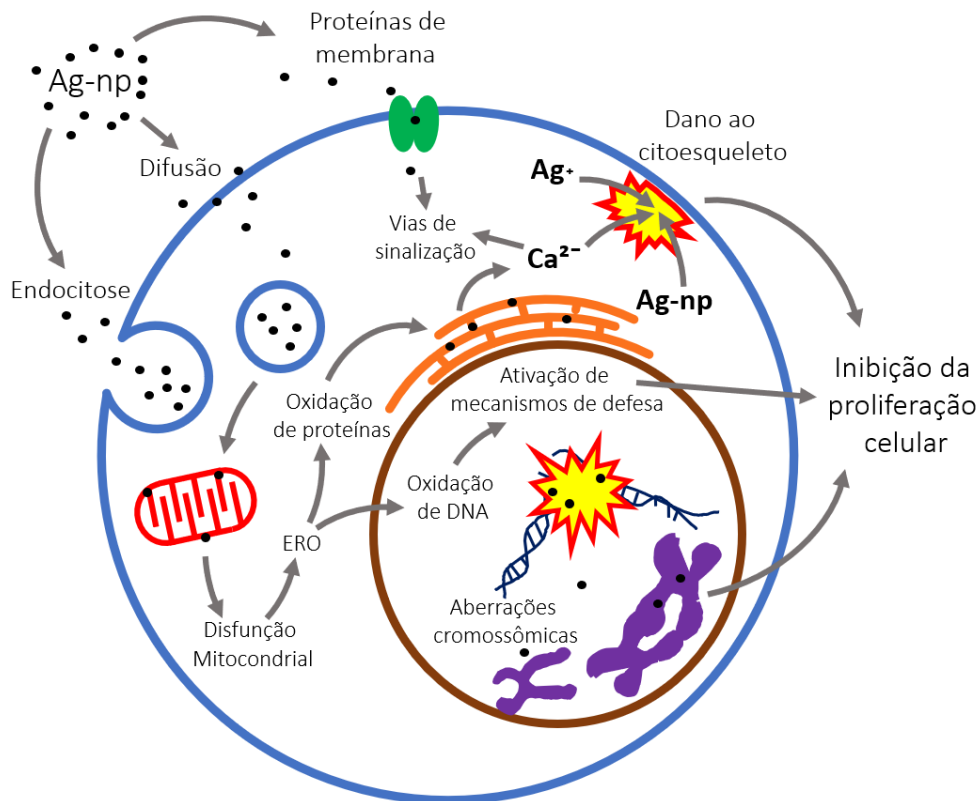
335

336

337

338

339



340 Figura 8. Mecanismos de citotoxicidade induzida por nanopartículas de prata. Imagem adaptada de
341 AshaRani et al. (2009).

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

Já em estudos realizados *in vivo* foram detectados diversos efeitos adversos, para modelos não mamíferos como o nematoide *Caenorhabditis elegans*, e o peixe *Danio rerio* incluindo prejuízos na reprodução e indução de estresse oxidativo (Choi et al., 2010; Roh et al., 2009). Moon (2019), traz em seu trabalho, dados que mostram que *C. elegans*, expostos a uma faixa de concentração de 5 mg AgNPs/kg no solo podem inibir o crescimento do verme e induzir a defeitos reprodutivos. Alguns dados demonstram que a exposição do *C. elegans* a nanopartículas de prata acarreta em uma redução de sua taxa de crescimento, onde concentrações de 0,01 mg AgNPs/L já

352 apresentavam diferenças significativas em seu tamanho comparado a grupos sem
353 exposição ao nanomaterial ou em concentrações menores desta (Kim et al., 2017).

354 Contreras et al. (2014) traz em seu estudo dados que mostram que a fertilidade
355 do *C. elegans* é afetada pela exposição à AgNP, e esta é inversamente ao tamanho das
356 nanopartículas de prata (menores partículas, maior toxicidade em relação a
357 fertilidade). Estudos como o de Roh et al. (2009) mostram que concentrações de 0,1 mg
358 AgNP/l causam severos danos a reprodução do *C. elegans*, tendo redução de até 70% de
359 no número de descendentes, com apenas 24 h de exposição.

360 Estes dados demonstram a potencial toxicidade das nanopartículas de prata, em
361 diferentes organismos, toxicidade esta que segundo autores como Contreras et al (2014)
362 pode ser maximizada por partículas com menor tamanho.

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374 **Objetivo Geral**

375 Com base nas informações apresentadas na **Introdução**, o objetivo geral desta
376 Dissertação foi avaliar a toxicidade potencial do curativo ACTICOAT FLEX 3 no
377 organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.

378 **Objetivos Específicos**

379 1. Caracterizar o curativo em nível químico e físico, para avaliar seus possíveis
380 mecanismos de ação.

381 2. Avaliar o poder antibacteriano do curativo em diferentes cepas bacterianas.

382 3. Avaliar a toxicidade do curativo no verme *C. elegans*, no nível bioquímico
383 (concentração de espécies reativas de oxigênio) e fisiológico (crescimento, reprodução e
384 fertilidade).

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

INDICAÇÃO DO PERIÓDICO DE SUBMISSÃO

397

Toxicology Letters

398

Qualis: A2 - Fator de Impacto: 3,499

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414 **Toxicity evaluation of nanocrystalline silver-impregnated coated dressing on the life cycle**
415 **of worm *Caenorhabditis elegans***

416 ¹Ayech, A., ¹Josende, M.,¹ Ventura-Lima, J., ²Ruas, C., ²Gelesky, M., ³Ale, A., ³Cazenave,
417 J. ⁴Galdopórpora J.M, ⁴Desimone, M.F., ¹Duarte, M., ⁵Halicki, P., ⁵Ramos, D., ⁶Carvalho,
418 L.M., ⁶Leal, G.C., ^{1,*}Montserrat, J. M.

419 ¹Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
420 Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF), Rio Grande, RS,
421 Brasil.

422 ²Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Escola de Química e Alimentos (EQA),
423 Programa de Pós-graduação em *Química Tecnológica e Ambiental* (PPGQTA), Rio
424 Grande, RS, Brasil.

425 ³Instituto Nacional de Limnología (INALI), UNL, CONICET, Santa Fe, Argentina.

426 ⁴Universidad de Buenos Aires (UBA), CONICET. Instituto de Química y Metabolismo
427 del Fármaco (IQUIMEFA). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires,
428 Argentina.

429 ⁵Universidade Federal do Rio Grande- FURG, Faculdade de Medicina (FAMED),
430 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), Rio Grande, RS, Brasil.

431 ⁶Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Química, Programa
432 de Pós-graduação em Ciências Farmacéuticas, Santa María, RS, Brasil.

433

434 * Corresponding author. Universidade Federal do Rio Grande - FURG Instituto de
435 Ciências Biológicas (ICB). Av Itália km 8 s/n - Caixa Postal 474 (96200-970) Rio
436 Grande, RS, BRASIL. Phone: +55 53 32935196. E-mail: montserrat_jm@furg.br

437

438 **Abstract**

439 There has been a growing demand for nanomaterials in recent years due to the
440 production of cosmetics and pharmaceuticals, among other products. Even with this
441 high demand and use, information on the toxicity of nanomaterials is still limited. Silver
442 nanoparticles are used as a bactericide and are present in drugs, surgical materials,
443 coated dressings, tissues and other products. Improper disposal of these items after use
444 may cause toxicological effects on organisms in the environment. To evaluate the
445 potential environmental hazard of nanosilver-coated dressings, the nematode
446 *Caenorhabditis elegans* was chosen as a test organism. The assays were conducted in
447 24-well plates that contain four different sizes of coated dressing to obtain different
448 concentrations. L1 and L4 *C. elegans* larval stages were exposed to these nanosilver
449 concentrations. Dressing cutouts were arranged between two layers of agar for 3 days
450 and *Escherichia coli* (OP 50 strain) was added as food source for the worms. After the
451 exposure period, growth, reproduction, fertility, silver concentration in the medium and
452 the concentration of reactive oxygen species (ROS) in the worms were evaluated.
453 Scanning and transmission electron microscopy analyses were performed on the coated
454 dressings, as well as analyses of zeta potential, ionic release and antibacterial power in
455 two bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*). It was
456 verified the antibacterial power of the coated dressing, in both bacteria strains tested.
457 Characterization of the coated dressing indicated heterogeneous nanoparticles, as well
458 as distinct zeta potentials for the medium in water and saline medium (0.9 % NaCl). L1
459 larval worms exposed to nanosilver-coated dressing showed a high ROS concentration
460 and reductions in growth, fertility and reproduction. Worms exposed to the coated
461 dressing during the L4 stage showed almost no response. Overall, the obtained results
462 indicate the potential environmental hazard of nanosilver-coated dressings.

463 **Keywords:** Nanotechnology, Antibacterial, Oxidative damage, Toxicity, Silver
464 nanoparticle

465

466 **1. Introduction**

467 The antimicrobial properties of silver are well-known, indeed its use in wound
468 disinfection has been documented since the 18th century (Klasen, 2000). Silver nitrate
469 (AgNO_3) has been widely used in the treatment of ulcers but, with the discovery of
470 penicillin, its application as bactericide has declined (Klasen, 2000; Chopra et al.,
471 2007). In recent times, however, due to the emergence of bacterial strains with
472 resistance to conventional antibiotics, silver has again gained attention as an alternative
473 for developing new efficient bactericides (Chopra et al., 2007; Gurunathan, 2014).
474 Based on the same evidence, the development of new nanotechnologies has led to an
475 increase in the use of silver nanoparticles (AgNPs). There is a range of materials that
476 use nanosilver as a raw material, including wound coated dressings, surgical
477 instruments and many other goods and products (Bosetti et al., 2002; Cohen et al., 2007;
478 Chen et al., 2008). The currently available coated dressings contain varying silver
479 concentration. Some examples are Acticoat (Smith and Nephew) and Actisorb (Johnson
480 and Johnson) (Silver et al., 2006). Silver, as a antibacterial, is used in various products;
481 the AgNPs impregnate the surfaces of them, like coated dressing, leading to the release
482 of silver ions (Ag^+). This release is associated with the antimicrobial efficacy
483 (Wijnhoven et al., 2009).

484 Smith and Nephew manufactures the Acticoat Flex coated dressing. It markets
485 ACTICOAT® FLEX 3 (registered in Brazil by national agency ANVISA through
486 number 80804050025) and ACTICOAT® FLEX 7, with differences in the maximum
487 silver concentration (1.64 mg/cm^2 and 2.0 mg/cm^2 , respectively). ACTICOAT® FLEX

488 3 and ACTICOAT® FLEX 7 act as active antimicrobial barrier for at least 3 and 7 days,
489 respectively (Smith & Nephew Medical Ltd.)

490 Like other nanoparticles, AgNPs exhibit toxicity related to the size/surface
491 relationship, where the smaller the particle, the greater its toxicity. Smaller particles
492 more easily cross cell membranes and, because of their high relative surface, interaction
493 with organelles is easier (Liu et al, 2010; Wang, 2013; Gliga, 2014). The entry of
494 nanoparticles into cells occurs either through the plasma membrane (diffusion or
495 membrane channels) or endocytosis (AshaRani et al., 2009; Singh et al., 2009). Once
496 inside, molecules accumulate outside the mitochondria, and promote reactive oxygen
497 species (ROS) generation. AgNPs can also interact with organelles to cause oxidative
498 damage to proteins, membranes, and DNA. Another possible mechanism involves the
499 interaction of nanoparticles and silver ions in Ca^{2+} release in the cytoplasm. This release
500 triggers cell signalling cascades that activate catabolic enzymes including
501 phospholipases, proteases, and endonucleases, all of which damage the mitochondrial
502 membranes and cytoskeleton that can culminate in programmed cell death (Orrenius et
503 al., 1992; Orrenius et al., 2015).

504 The nematode *Caenorhabditis elegans* is widely applied in experimental studies
505 due to its short life cycle, small size and easy cultivation. It is also as it is very sensitive
506 to environmental changes (Hope, 1999; Leung et al., 2008; Rodriguez et al., 2013). The
507 worm feeds on bacteria, especially living or dead *Escherichia coli* (Liu et al., 2012).
508 This species was, in fact, one of the selected test organisms in the NanoReg initiative
509 (NanoReg, 2017). Based on data from the scientific literature cited above, this study
510 aimed to evaluate the potential toxicity of the ACTICOAT FLEX 3 coated dressing on
511 the model organism *C. elegans*.

512

513 **2. Materials and methods**

514 *2.1. Coated dressings acquisition*

515 Acticoat Flex 3 coated dressings from Smith and Nephew were purchased via the
516 internet. To perform the tests, there were used the coated dressings of lots 1715, 1647,
517 1616, and 1819.

518

519 *2.2. Observation of silver crystals by Scanning Electron Microscopy*

520 Small cutouts of the coated dressing were dried by the Autosamdri-815 (Sample
521 Drying at the critical point) and then visualized by a High-Low Low-Vacuum Scanning
522 Electron Microscope (SEM), Jeol, JSM - 6610LV, with EDS probe to analyse the
523 presence of silver on the surface of the coated dressing fibers. With the aid of the free
524 image editing software ImageJ, the crystals were measured and obtained the frequency
525 size distribution.

526

527 *2.3. Observation of silver crystals by Transmission Electron Microscopy*

528 Pieces of the coated dressing were placed in 2 different solutions, one with
529 MilliQ water and the other in 0.9 % NaCl saline solution. After 3 days, drops of these
530 solutions were transferred to carbon grids for electron microscopy for 10 min and then
531 were placed on filter paper to dry for 24 h. The analyses were performed with a Jeol
532 JEM-1400 120 keV Transmission Electron Microscope, coupled with an EDS probe.

533

534 *2.4. Zeta potential measurement*

535 Pieces of the coated dressing were inserted into deionised water and 0.9% saline
536 over 3 d, and the solutions were sonicated at 10% of the total 400 W power of the
537 Bonitech Branson sonicator and then analysed on the equipment (Litesizer 500).

538

539 *2.5. Ionic release of silver from nanoparticles*

540 To perform the release of Ag⁺ ions from silver dressing, four pieces (each one of
541 1 cm²) were included in 15 mL of distilled water. An aliquot of 0.5 mL of media was
542 replaced at each time (1, 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h). Aliquots were evaluated using a
543 VGP 210 atomic absorption spectrophotometer (BuckScientific, East Norwalk, CT,
544 USA) by electrothermal atomization using pyrolytic graphite furnace.

545

546 *2.6. Silver concentration in the coated dressing*

547 To obtain the total silver concentration contained in the coated dressings at cm²
548 of the coated dressing, four pieces of coated dressing (1 cm²) were mineralized using 9
549 mL of nitric acid (96%) and 1 mL of hydrogen peroxide (100%). The mixture was then
550 heated using a micro digester (mls 1200 mega). The silver content was measured by
551 atomic absorption spectroscopy as described above.

552

553 *2.7. Silver in the NGM medium*

554 The Nematode Growth Medium (NGM) that was used to wrap the coated
555 dressing was removed after 3 days and placed in an eppendorf tube and stored in a
556 freezer. After that, samples were melted at 90 °C and analysed by atomic absorption
557 spectroscopy, as described previously.

558

559 2.8. *Antibacterial power of coated dressing*

560 To evaluate the antimicrobial potential of Actinoflex 3 against *Pseudomonas*
561 *aeruginosa* (ATCC 15442) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), an agar
562 diffusion-based method was used as follows: 15 ml of Mueller Hinton agar medium was
563 added to a Petri dish (90 x 15 mm); after solidification of the medium, a MacFarland 0.5
564 bacterial suspension (1.5×10^8 UCF/mL) of each strain was prepared and plated onto the
565 entire surface of the medium using a swab. Then a portion of the circular impregnated
566 bandage (50 mm in diameter, 1.64 mg / cm²) was placed centrally on the surface of the
567 culture medium containing the seeded bacteria. The plates were incubated at 37 °C for
568 24 h and, after the diameter of the inhibition zone was measured. The experiment was
569 performed in triplicate.

570 For the determination of the susceptibility profile of the evaluated strains, a
571 second batch of experiments was carried out with antibiotics, where *P. aeruginosa* was
572 exposed to Ciprofloxacin (5 µg), Ceftazidime (30 µg), Gentamicin (10 µg),
573 Piperacycline-Tazobactam (100mcg-10mcg), and Meropenem (10 µg), and *S. aureus* to
574 Ciprofloxacin (5 µg), Penicillin (10U), and Tetracycline (30 µg). The tests and the
575 interpretation of the results were performed following the Performance Standards for
576 Antimicrobial Susceptibility Testing protocol (CLSI M100).

577

578 2.9. *Animal model and maintenance*

579 Animals of strain N2, Bristol (wild strain) were cultured in Petri cell culture
580 (medium and large) with nematode-appropriate NGM culture medium (NGM: nematode
581 growth media) (3.0 g of NaCl/L; 5.0 g of peptone/L; 5.0 mg of cholesterol/L, 1 mmol of
582 CaCl₂/L; 1 mmol of MgSO₄/L; 25 mmol of KH₂PO₄/L; and 17 g of agar/L diluted in 1 L
583 of autoclaved Milli Q water at pH 6.0 after preparation) and kept under temperature-

584 controlled by incubator set at 20 °C. The plates were seeded with *Escherichia coli*
585 bacteria, non-pathogenic strain OP50, with optical density 1.0 at 600 nm, as a food
586 source for *C. elegans*, according to the traditional maintenance procedures described by
587 Brenner (1974).

588

589 *2.10. Preparation of animals for experiments*

590 To develop the experiment, it was necessary to obtain a population of synchronized
591 animals with the same larval stage. Ovate animals were removed by washing the culture
592 plates using M9 buffer (3.0 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl and 1 mL 1 M MgSO₄
593 diluted in 1 L of sterilized Milli Q water, pH 6) using Pasteur pipettes and then
594 accommodated in 50 mL Falcon tubes for centrifugation 1000 g for 10 min, at 20 °C
595 and pellet formation of animals and disposal of supernatant containing NGM and *E. coli*
596 residues. Then, the bleaching procedure was performed using a caustic solution (NaOH
597 10 M and 2.5% sodium hypochlorite) in which the ovated animals are lysed, releasing
598 their fertilized eggs. At the end of this procedure only the eggs remain alive, being
599 separated by centrifugation (150 g for 15 min at 20 °C with a 30% sucrose solution).
600 Finally, the eggs were transferred to Petri dishes containing M9 medium and incubated
601 at 20 °C for 14 h until the animals hatched and reached their first stage of larval
602 development (L1). The entire synchronization procedure follows the protocol proposed
603 by Stiernagle (2006), which was originally formulated to remove fungal and bacterial
604 contamination from *C. elegans* cultures.

605

606 *2.11. Plate preparation*

607 All the experiments were performed in triplicate using true independent replicates.
608 To assemble the plates, the coated dressings were cut in circles with a 1 cm-diameter
609 and placed in a 24-well plate. To obtain different coated dressing concentrations, it was
610 assumed that the silver concentration was uniform over the entire coated dressing area.
611 The following silver concentrations were selected: 1.64 mg/cm² (whole puddle
612 equivalent = 1/1 or 100%), 1.23 mg/cm² (three-quarter puddle equivalent = 3/4 or 75%),
613 0.82 mg/cm² (half-puddle equivalent = 1/2 or 50%), and 0.41 mg/cm² (quarter-puddle
614 equivalent = 1/4 or 25%) and CTRL for control group with animals exposed only to
615 NGM and *E. coli* OP50. (**Fig.1 Supplementary Material**)

616 CTRL for animals exposed to coated dressings that were released for 6 days, 3 days
617 releasing on the agar, after the agar is removed and the coated dressing washed with
618 autoclaved Milli Q water, after they were put back in the agar for 3 more days. Then the
619 plate was incubated at 37 °C, simulating human body temperature for 3 days, another
620 group of plates was incubated at 20 °C, also for 3 days. This time was selected as this is
621 indicated by the manufacturer for material release, with the bottom of the plate facing
622 up so that the silver released by the coated dressing could be available to the animals on
623 the surface of the NGM during the exposure period. It was observed a darker coloration
624 in the NGM that was in contact with the cuttings that had a larger size (higher
625 concentrations). At the end of the third day of incubation, the exposure plates were
626 removed from the 37 °C incubator and cooled to 20 °C (exposure temperature).
627 Immediately after, 50 µL of *E. coli* OP50 was pipetted as a food source. Following, *C.*
628 *elegans* in larval stage L1 (an average of 20 animals per puddle) were introduced into
629 the puddles.

630 The average number of animals introduced into each pool was reached by estimating
631 10 aliquots with a volume of 10 µL of a *C. elegans* suspension in the liquid medium,

632 which was performed by counting. The total number of animals among all aliquots was
633 divided by the estimated aliquots to determine the volume to be pipetted into each pool
634 at the time of exposure (Solis and Petrascheck, 2011).

635 After incubation, the plates were kept in an incubator at 20 °C for 96 h, the
636 necessary time for the animals to complete their developmental cycle through the larval
637 stages L1, L2, L3, and L4 and reach the adult stage, so they are able to grow and
638 reproduce, giving rise to the first progeny (Hope, 1999). Then, their evaluation of
639 growth, fertility rate, and reproduction was performed.

640 In the case of animal exposure in L4, the plate assembly procedures were
641 repeated, with incubation modifications, where it occurred only at 20 °C (both during
642 the dressing release period and during the 3-day exposure), using only a pool with a
643 nominal concentration of 1.64 mg/cm² (100%).

644 All the analyses performed in this work were based on the international standard
645 ISO 10872: 2010 adopted as reference for the toxicity tests evaluated by NANoREG.
646 For the analysis, photos were taken of the puddles, using a magnifying glass coupled
647 with a camera (Leica, model S8 APO). All analyses were performed with the help of
648 free image editing software ImageJ. For better visualization of the animals in the
649 evaluation of growth, reproduction, and fertility, the photo acquisition procedures were
650 performed after staining of the animals with Rose Bengal dye.

651

652 *2.12. Growth assessment*

653 After taking the pictures of the adult animals stained with Rose Bengal, the subjects
654 were measured with the ImageJ software. The growth rate (in mm) was measured by
655 subtracting adult animal size from L1 larval stage animal size.

656

657 *2.13. Fertility assessment*

658 In order to calculate the fertility percentage, the presence or absence of eggs within
659 the body of adult animals was observed individually. An animal was considered
660 pregnant (fertile) if the number of eggs within its body is ≥ 1 . After counting the
661 number of pregnant hermaphrodite worms and subtracting the number of male worms
662 from the total adult animals, the fertility percentage was calculated by dividing the
663 number of fertile animals by the number of adult animals and multiplying by 100.

664

665 *2.14. Reproduction assessment*

666 To proceed with the reproduction calculation, the number of L1 larval stage animals
667 counted in each pool was divided by the number of adult fertile animals in the
668 respective pool. Results were expressed as the number of larvae per exposed adult.

669

670 *2.15. Reactive oxygen species concentration (ROS) dosage*

671 It was performed via fluorescence microscopy using the whole worm exposed to the
672 probe H₂DCF-DA (SIGMA), according to Büchter et al. (2013). After 1 h- incubation,
673 photos were taken with the Dino-Lite microscope (AM4115T-GFBW). Subsequently,
674 using the ImageJ software, the area of the animals was measured, together with
675 fluorescence intensity and, around the animals, the background was also measured and
676 the following expression calculated: $ROS = (FI-BG)/A$, where FI stands for worm
677 fluorescence intensity, BG for background and A for the animal area.

678 *2.16. Statistics*

679 Data were expressed as mean \pm 1 standard error of the mean (SEM). L1 worm
680 growth, reproduction, fertility, and ROS concentration data were analysed by a mixed

681 model analysis of variance (ANOVA), being the random factor, the different plates
682 employed in the independent experiments and fixed the factor was nanosilver
683 concentration (Searle et al., 2006). Previously, normality and homoscedasticity
684 assumptions were evaluated through Shapiro-Wilks and Levene tests, respectively, and
685 mathematical transformations applied if at least one of these was violated (Zar, 1984).
686 The same procedure was employed to analyse L4 worms data. Statistical differences
687 among means treatment were performed using the post-hoc test of Newman-Keuls. In
688 all cases, a significance level (α) of 0.05 was adopted.

689

690 **3. Results and discussion**

691 *3.1. Physico-chemical results*

692 *3.1.1. Characterization of silver-coated dressing*

693 Through SEM analysis, it was possible to observe the structure of the dressing
694 with the entangled polyester fibers (**Fig. 2a and b**). there were particles randomly
695 dispersed and impregnated in the dressing fibers (**Fig. 2c and d**). To perform a size
696 distribution analysis, silver nanoparticles from the coated dressing samples were
697 analysed through TEM (**Fig. 3**) From the EDS analysis performed on the ACTICOAT
698 FLEX 3 coated dressing, it was possible to detect the following compounds: silver
699 (75.4%), oxygen (18.5%) and carbon (5.78%) (**Fig. 4 Supplementary Material**).

700 The coated dressings immersed in the 0.9% saline solution showed greater
701 agglomeration than the ones immersed in Mili Q water. Measurements performed with
702 ImageJ software demonstrated that the particles immersed in the 0.9% saline solution
703 had a larger size (mean of *c.a.* 80 nm) than the particles that were immersed in MilliQ
704 water (mean of *c.a.* 40 nm), which were much less crowded (**Fig. 3 and 4**). Reports

705 including Doty et al. (2005) and Michaels et al. (2000) revealed that high NaCl
706 concentrations cause AgNPs to aggregate. The zeta potential of the nanoparticles
707 immersed in 0.9% saline solution averaged -17.8 mV, whereas those immersed in
708 deionised water averaged -25 mV. Some guidelines show that zeta potential values
709 between \pm 20-30 mV are moderately stable (Patel et al., 2011; Bhattacharjee, 2016).
710 Thus, the obtained results indicated that the nanoparticles released by the coated
711 dressing in saline solution have a tendency to be less stable than those in deionised
712 water. This data is consistent with the TEM results. Interestingly, the manufacturer's
713 use instructions state that the coated dressing must be moistened in potable water and
714 not in saline, an advisory that once again corroborates our results.

715 AgNP toxicity towards bacteria was reported in several studies (Lok et al., 2006;
716 Choi et al., 2008; Choi and Hu, 2008). Pal et al. (2007) evaluated the effects of
717 bactericidal activity in different exposure media. The authors observed that exposure in
718 agar presents greater toxicity compared to liquid medium. The use of silver is
719 advantageous when compared to other classes of antibiotics because microorganisms, in
720 general, do not show resistance to this compound (Romero-Urbina et al., 2015;
721 Sangappa and Thiagarajan, 2015). Baker et al. (2005) and Panáček et al. (2006)
722 presented data on the antimicrobial capacity of silver against *E. coli* and *Staphylococcus*
723 *aureus*. Baker (2005) found that particles with a higher surface-to-volume ratio provide
724 a more efficient means for antibacterial activity against *E. coli*, and Panáček et al.
725 (2006) found similar results, where 25 nm sized-AgNPs show greater antimicrobial and
726 bactericidal activities compared to larger particles including against highly multidrug-
727 resistant strains such as methicillin-resistant *S. aureus*. Mohan et al. (2014) also
728 reported a high antimicrobial activity of AgNPs against *Pseudomonas aeruginosa*. The
729 AgNP antibacterial capacity was also observed in the present work, is that there is

730 evidence that silver diffuses in the medium and that there is an antimicrobial action
731 against these two microorganisms that we evaluated, because there is a halo of
732 inhibition (**Tables 1 and 2 of Supplementary Material**).

733

734 *3.1.2. Ionic release of silver*

735 The total silver content of the dressing was 1.44 mg/cm². The coated dressing
736 analysed in this study presented a controlled silver release over time. Indeed, 34% of the
737 total silver content of the dressing was released after 72 h (Figure 5). It is worth to
738 mention that the release of the bactericide agent is required to achieve antimicrobial
739 activity in wound dressings (Mebert et al., 2016). AgNP have the ability to release silver
740 ions, and this property contributes to the bactericidal effect already provided by silver
741 (Morones et al., 2005). In recent work using *C. elegans*, it was found that also the shape
742 of agNP (nanoparticles, nanowires and nanoplates) influences toxicity (Moon et al.,
743 2019).

744

745 *3.2. Toxicity evaluation in C. elegans.*

746 *3.2.1. Reactive oxygen species concentration (ROS) dosage*

747 The Fenton reaction, ion release and ROS generation occur on the surface of
748 nanoparticles, thus very small molecules (< 30 nm) have a relatively large surface area
749 and then, also have higher toxic effects than the larger ones (Auffan et al., 2009). With a
750 highly variable particle distribution, as seen in **Fig. 3**, it can be inferred that at a
751 concentration of 100% there should provide enough small nanoparticles to induce
752 higher ROS concentration in worms, as shown in **Fig. 6D**. The obtained results agree
753 with Yang et al. (2018), who found high ROS concentration in *C. elegans* exposed to

754 commercial AgNPs and explained that oxidative stress is the main toxic mechanism
755 generated by these particles. The augmented ROS concentrations could affect the
756 metabolism of energy in *C. elegans*, since oxidative chemicals as in this case results to
757 be the coated dressing, generate mitochondrial malfunction, and consequently, the
758 oxidative stress in the cytoplasm may increase inducing cell apoptosis (Luo et al.,
759 2017).

760

761 3.2.2. Physiologic parameters

762 Kim et al. (2017) evaluated the effect of AgNPs on *C. elegans* growth and
763 reported that concentrations of 0.01 mg/L already induces significant differences,
764 reducing size. Data from Contreras et al. (2014) showed that concentrations between 1
765 and 10 mg AgNPs/L significantly reduce in *C. elegans* growth, however, after
766 continuous exposure through several generations, growth return to normal. Then, a
767 pattern of acclimatisation was evidence when worms are exposed to 100 mg AgNP/L.
768 The *C. elegans* fertility is also affected by AgNPs, where smaller particles induce the
769 greatest toxicity effects. Roh et al. (2009) provided data where concentrations of 0.1 mg
770 AgNPs/L impairs *C. elegans* reproduction, and reduces the number of offspring by up to
771 70% after a 24 h-exposure. In this study, we verified that all evaluated physiological
772 parameters were compromised when the organisms were exposed to the coated dressing
773 (**Fig. 7**). The data from in this study corroborate those already found in the literature,
774 where exposure to silver nanoparticles also reduced the size of adults and reduced
775 fertility and reproduction of worm *C. elegans*.

776 Stage L4 was less prone to show toxic effects after nanosilver-coated dressing
777 exposure than the L1 (**Table 1**). The obtained results may indicate that stage L4 is more
778 resistant than the initial L1 larval stage. Chaweeborisuit et al. (2016) exposed all *C.*

779 *C. elegans* larval stages to plumbagin (a nematicide). These authors reported that L4 is
780 least sensitive, while L1 shows the highest sensitivity. Chu and Chow (2002) also
781 observed that L1 animals are more susceptible when exposed to different cadmium
782 concentrations than animals at more advanced stages. Overall, the use of the L1 stage
783 offers greater sensitivity to observe potential deleterious effects of chemical stressors.
784 *C. elegans* has a cuticle that is a layered internal structure with surface specializations
785 and is known to undergo changes in its composition and structure during the life stages
786 of the worm (Kramer, 1997). Probably the permeability in L4 is lower due to its thicker
787 cuticle (Chaweeborisuit et al., 2016).

788 As previously mentioned, to obtain different exposure concentrations, the
789 dressings were cut into different sizes. The data showed that there was high variability
790 among same-sized dressings with regards to the silver concentrations released into the
791 NGM, this can be easily observed by the high standard deviation of the samples (**Fig.**
792 **8**), especially in the 100% cut (1.64 mg silver/cm²). This finding could indicate that the
793 silver is not homogeneously distributed in the coated dressing.

794 The dressings that released their contents for 3 days in the NGM, were washed
795 and added to a new NGM medium, and they still released silver, as verified by atomic
796 absorption spectroscopy (211.33±33.64 µg/g). However, no toxic effects were observed
797 in worms exposed to these dressing (**See Table 3 of Supplementary Material**).

798

799

800

801 **4. Conclusions**

802 It was observed that in water the particles were less agglomerated and more
803 stable as verified in zeta potential, unlike the saline medium (0.9 % NaCl), where the
804 particles were more agglomerated, which is expected situation under those
805 physiological conditions. Results indicated that Acticoat Flex 3 has an antibacterial
806 effect as do antibiotics in the strains tested (*P. aeruginosa* and *S. aureus*). Nanosilver-
807 coated dressing impaired reduced reproduction, growth and fertility and induced higher
808 ROS concentration in L1 larval stage animals, unlike L4 stage animals, which showed
809 lower susceptibility or no changes in the measured parameters Finally, the obtained
810 results suggest that improper disposal of this coated dressing has the potential to cause
811 damage to organisms, including *C. elegans*, and this finding highlights its
812 environmental hazard.

813

814 **Conflict of interest**

815 The authors declare that there are no conflicts of interest

816

817 **Acknowledgments**

818 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
819 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

820

821 **References**

822

823 AshaRani, P. et al. BMC Cell Biology. 17(10): 65, 2009.

824 Auffan, M. et al. Nature Nanotechnology. 4: 634-641, 2009.

825 Baker, C. et al. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 5 (2): 244-249, 2005.

826 Bhattacharjee, S. et al. Journal of Controlled Release. 2016.

827 Bosetti, M. et al. Biomaterials. 23: 887-892, 2002.

828 Brenner, S. Genetics. 77 (1) 71-94, 1974.

829 Büchter, C. et al. International Journal of Molecular Sciences. 14, 11895-11914, 2013.

830 Chaweeborisuit, P. et al. *Z. Naturforsch.* 121-131, 2016.

831 Chen, X. e Schluesener, H. *Toxicology Letters.* 176 (2008): 1–12, 2008.

832 Choi, O. e Hu, Z. *Environmental Science & Technology.* 42: 4583–4588, 2008.

833 Choi, O. et al. *Water Research.* 42(12): 3066–3074, 2008.

834 Chopra, I. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 59(4): 587–590, 2007.

835 Chu, K. W. e Chow, K. L. *aquatic toxicology.* 61: 53-64, 2002.

836 CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.* 27th ed. CLSI
837 supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

838 Cohen, M. S. et al. *Surgical Infections.* 8: 397-403, 2007.

839 Contreras, E. et al. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 33 (12): 2716–2723,
840 2014.

841 Doty, R. et al. *Chemistry of Materials.* 17(18): 4630-4635, 2005.

842 Gliga, A. R. et al. *Particle and Fibre Toxicology.* 11: 11, 2014.

843 Gurunathan, S. et al. *Nanoscale Research Letters.* 31: 9 (1): 373, 2014.

844 Hope, I. A. Oxford University Press, NY. 1999.

845 Instructions for use ACTICOAT FLEX [https://www.smith-](https://www.smith-nephew.com/global/assets/pdf/products/brasil/2016-04/80804050025-acticoatflex-ifu0025-revb.pdf)
846 [nephew.com/global/assets/pdf/products/brasil/2016-04/80804050025-acticoatflex-](https://www.smith-nephew.com/global/assets/pdf/products/brasil/2016-04/80804050025-acticoatflex-ifu0025-revb.pdf)
847 [ifu0025-revb.pdf](https://www.smith-nephew.com/global/assets/pdf/products/brasil/2016-04/80804050025-acticoatflex-ifu0025-revb.pdf) accessed 09/12/2019

848 Kim, J. et al. *Scientific Reports.* 7(40225): 1-11, 2017.

849 Klasen, H. J. *Burns.* 26: 117-130, 2000.

850 Kramer, J.M. In: Riddle, D. L. et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 471–500,
851 1997.

852 Leung, M. et al. *Toxicological Sciences.* 106: 5–28, 2008.

853 Liu, H. et al. *Nature Communications.* 3:1073, 2012.

854 Liu, W. et al. *Nanotoxicology.* 4(3): 319-330, 2010.

855 Lok, C. et al. *Journal of Proteome Research*. 5: 916–924, 2006.

856 Luo, X., et al. *Chemosphere*. 168: 648-657, 2017.

857 Mebert, C. *Journal of Materials Chemistry B*. 4: 3135, 2016.

858 Michaels, A. et al. L. E. *The Journal of Physical Chemistry B*. 104, 119-165, 2000.

859 Mohan, S. et al. *Journal of Carbohydrate Polymer*. 106: 469-474, 2014.

860 Moon, J. *Chemosphere*. 2019.

861 Morones J. *Nanotechnology*. 16 (10): 2346- 2353, 2005.

862 NANoREG, a common European approach to the regulatory testing of nanomaterials.

863 Final Report (part 1). November 2016 / updated 2017/02/21.

864 Orrenius, S. et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 460: 72-81,

865 2015.

866 Orrenius, S. et al. *Toxicology Letters*. 64-65: 357-364, 1992.

867 Pal, S. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6): 1712-1720, 2007.

868 Paladini, F. et al. *Journal of Materials Science*. 24: 2461-2472, 2013.

869 Panáček, A. et al. *The Journal of Physical Chemistry B*. 110 (33): 16248-16253, 2006.

870 Patel, V. R. e Agrawal, Y. K. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology &*

871 *Research*. 2: 81-87, 2011.

872 Rodriguez, M. et al. *Trends in Genetics*. 29: 367-374, 2013.

873 Roh, J. et al. *Environmental Science and Technology*. 43: 3933–3940, 2009.

874 Romero-Urbina, D. G. et al. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 6: 2396-2405, 2015.

875 Sangappa, M., and P. Thiagarajan. 2015. *Indian Journal Pharmaceutical Sciences*.

876 77:151–155, 2015.

877 Searle, S. R., Casella, G., McCulloch. Hoboken, New Jersey, 2006.

878 Silver, S. et al. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 33: 627-634, 2006.

879 Singh, N. et al. *Biomaterials*. 30: 3891-3914, 2009.

880 Solis, G. M., Petrascheck, M. *Journal of Visualized Experiments*. 18(49), 2011.
881 Stiernagle, T. *Wormbook*. 11:1-11, 2006.
882 Wang, Z. et al. *Environmental Toxicology Chemistry*. 31(10): 2408-2413, 2013.
883 Wijnhoven, S. et al. *Nanotoxicology*. 3(2): 109-138, 2009.
884 Yang et al. *Ecotox Environ Saf* 165(15): 291-298, 2018.
885 Zar, J. H. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984.

886

887

888

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904 **Figure captions**

905 **Figure 1.** A schematic of the employed procedure to expose *Caenorhabditis elegans* to
906 nanosilver coated dressings. The scheme shows the different cutouts of the coated
907 dressing used to obtain different nanosilver concentrations and the insertion of the
908 NGM in the plate, forming a with two layers of NGM with the coated dressing inserted
909 in the middle. The photo at the bottom shows the 24 well plate prepared to receive the
910 worms.

911 **Figure 2.** Scanning electron microscopy (SEM) images of the nanosilver-coated
912 dressing. White arrows indicate the silver particles impregnated in the coated dressing
913 fibers.

914

915 **Figure 3.** Transmission electron microscopy (TEM) images of the nanosilver-coated
916 dressing immersed in saline solution (0.9% NaCl; a and b) or MilliQ water (c and d).

917

918 **Figure 4.** The frequency size distribution of nanosilver-coated dressing immersed in
919 0.9% NaCl saline solution (a) or in MilliQ water (b).

920

921 **Figure 5.** Silver (Ag) release versus time. (a) Ag release expressed as a percentage (Ag
922 in solution/Ag in the coated dressing). (b) Ag release expressed as the Ag concentration
923 (mg/ml).

924

925 **Figure 6.** Reactive oxygen species (ROS) concentration measured through fluorescence
926 emission using the H₂DCF-DA probe, where greater fluorescence intensity indicates a
927 higher ROS concentration. (a) *Caenorhabditis elegans* exposed to a coated dressing

928 with 1.64 mg silver/cm² at stage L1. (b) *C. elegans* from control group. (c) Fluorescence
929 intensity in *C. elegans* stage L1 for the different treatments: 1.64 mg silver/cm² (whole
930 puddle equivalent = 1/1 or 100%), 1.23 mg silver/cm² (three-quarter puddle equivalent
931 = 3/4 or 75%), 0.82 mg silver/cm² (half-puddle equivalent = 1/2 or 50%), 0.41 mg
932 silver/cm² (quarter-puddle equivalent = 1/4 or 25%) and the control group (Ctrl). Values
933 are expressed as mean + 1 standard error. Equal letters indicate the absence of
934 significant differences ($p > 0.05$).

935

936 **Fig. 7.** Physiological responses in *Caenorhabditis elegans* after 3-day exposure to the
937 following treatments: 1.64 mg silver/cm² (whole puddle equivalent = 1/1 or 100%), 1.23
938 mg silver/cm² (three-quarter puddle equivalent = 3/4 or 75%), 0.82 mg silver/cm² (half-
939 puddle equivalent = 1/2 or 50%), 0.41 mg silver/cm² (quarter-puddle equivalent = 1/4 or
940 25%) or control (Ctrl). Data for (a) growth, (b) fertility and (c) number of larvae
941 generated by an adult are shown. Values are expressed as mean + 1 standard error.
942 Equal letters indicate the absence of significant differences ($p > 0.05$).

943

944 **Figure 8.** Silver concentration in the NGM medium for the different coated dressing
945 concentrations. All the cutouts presented statistically significant differences compared
946 to the control. Values are expressed as mean + 1 standard error. Equal letters indicate
947 the absence of significant differences ($p > 0.05$).

948

949

950

951

952

953 **Table 1.** Evaluation of the physiological parameters of L4 larval stage worms.

L4 Stage		
Physiological parameters	Mean and Standard Error	
	Control	100%
Growth	1.05 ± 0.01 ^a	1.05 ± 0.02 ^a
Fertility	96.67 ± 1.76 ^a	98.99 ± 1.01 ^a
Reproduction	41.52 ± 0.72 ^a	36.15 ± 2.30 ^a
ROS Concentration	33670.94 ± 1730.08 ^a	33882.73 ± 984.47 ^a

954 100% refers to worms exposed to 1.64 mg / cm² (whole puddle equivalent = 1/1 or
 955 100%) for 3 days. Growth is expressed in millimeters, fertility is expressed as a
 956 percentage of fertile animals, reproduction expressed by the ratio of larvae to adult
 957 animals. ROS is expressed by the fluorescence intensity using the H₂DCF-DA probe.
 958 Values are expressed as mean + 1 standard error. Equal letters indicate no significant
 959 differences (p > 0.05) for each physiological variable.

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

970

971

972 **Figure 1.**

973

974

975

976

977

978

979

980

981

982

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997 **Figure 2.**

998

999

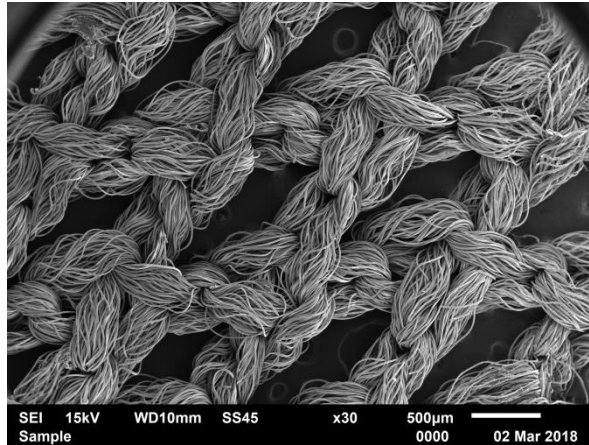
1000

1001

1002

1003

1004



1005

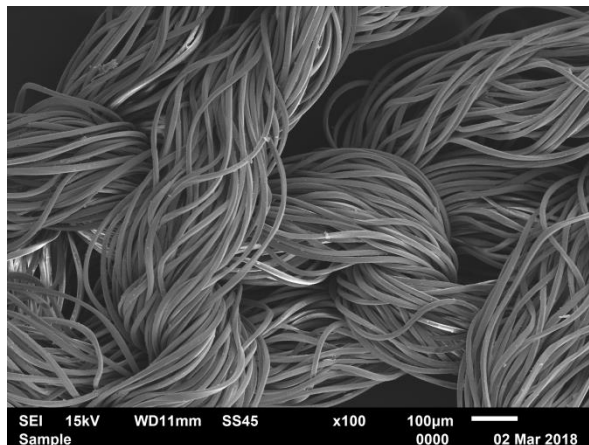
1006

1007

1008

1009

1010



1011

1012

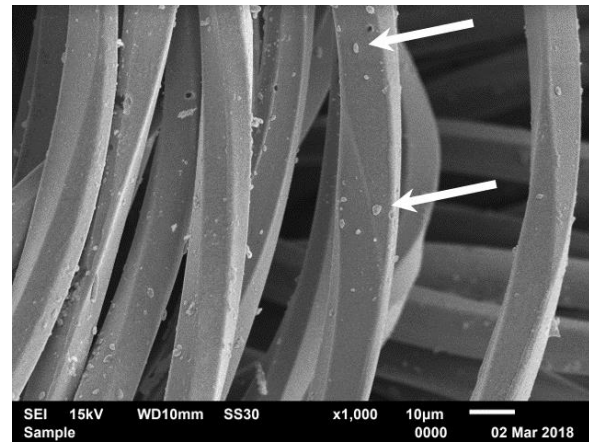
1013

1014

1015

1016

1017



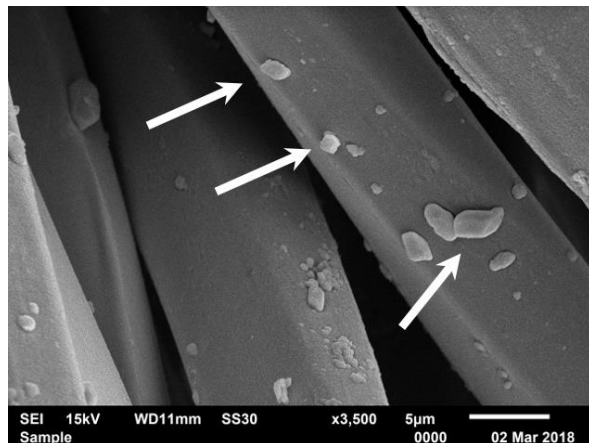
1018

1019

1020

1021

1022



1023 **Figure 3.**

1024

1025

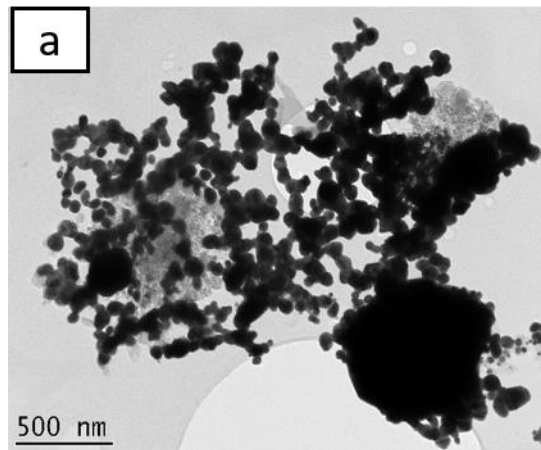
1026

1027

1028

1029

1030



1031

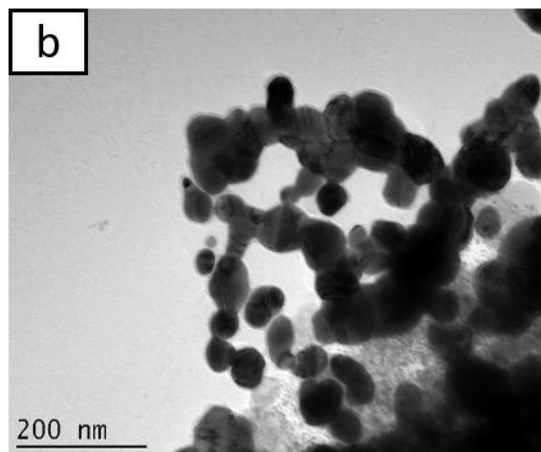
1032

1033

1034

1035

1036



1037

1038

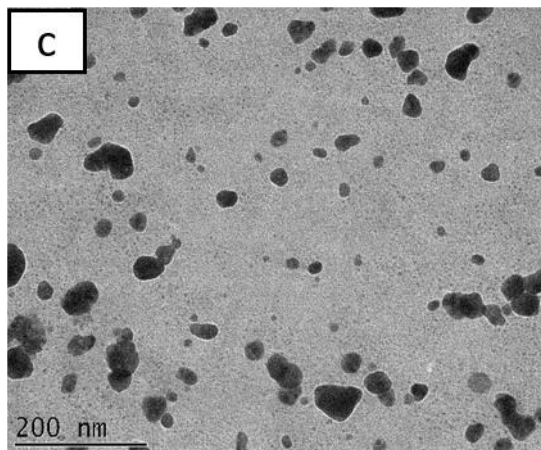
1039

1040

1041

1042

1043

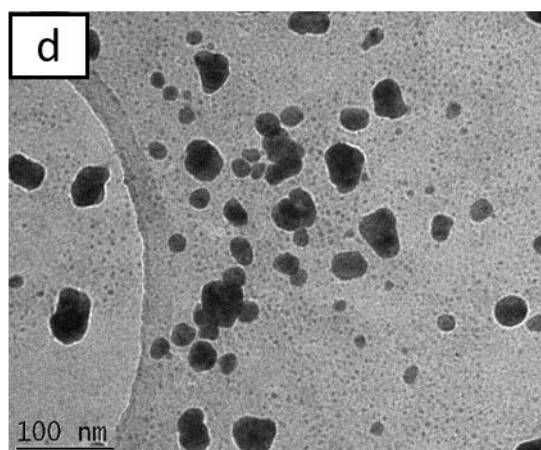


1044

1045

1046

1047



1048 **Figure 4.**

1049

1050

1051

1052

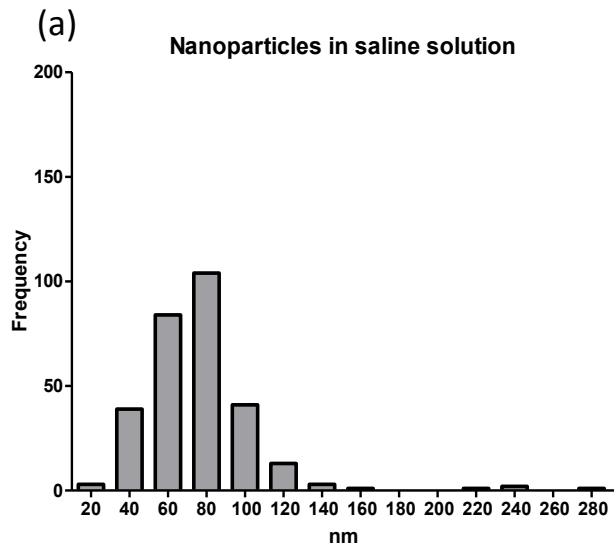
1053

1054

1055

1056

1057



1058

1059

1060

1061

1062

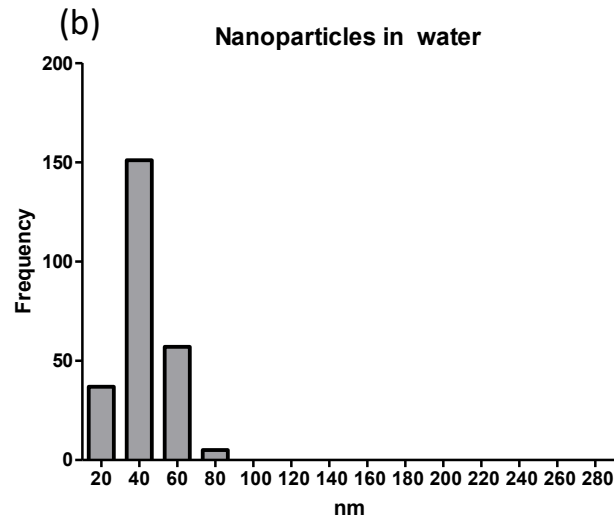
1063

1064

1065

1066

1067



1068

1069

1070

1071

1072

1073 **Figure 5.**

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

1081

1082

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

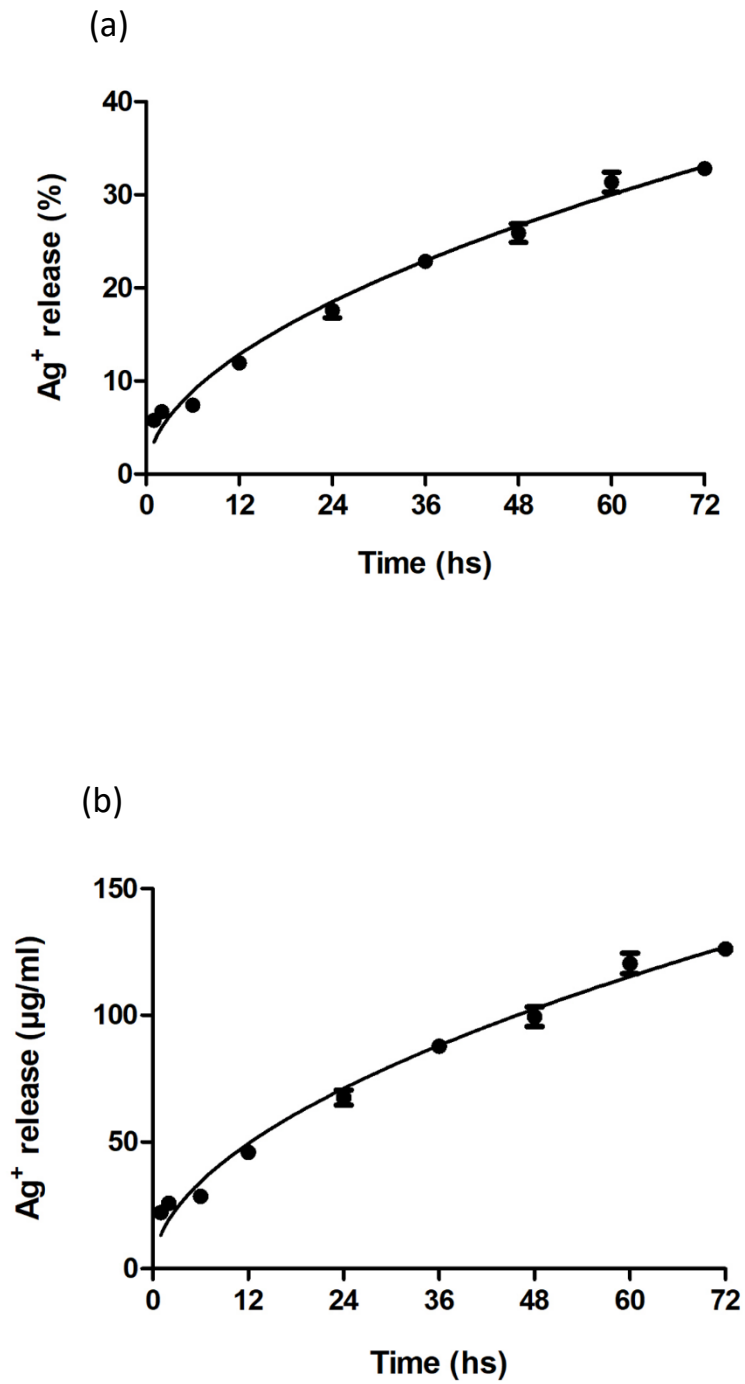
1093

1094

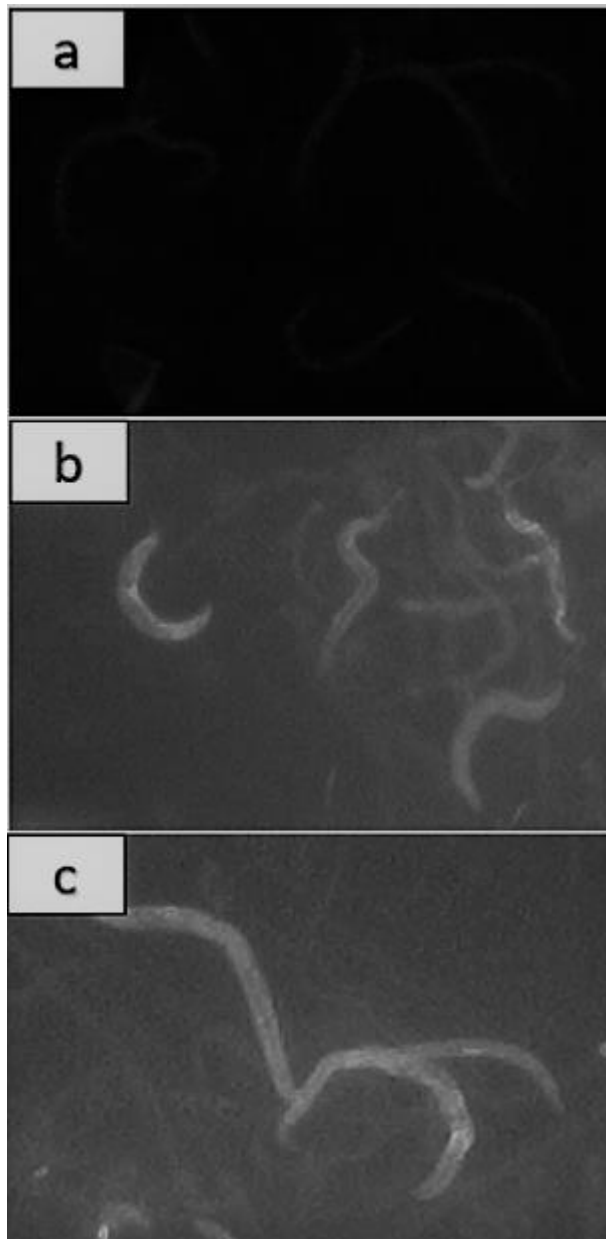
1095

1096

1097



1098 **Figure 6.**



1099

1100

1101

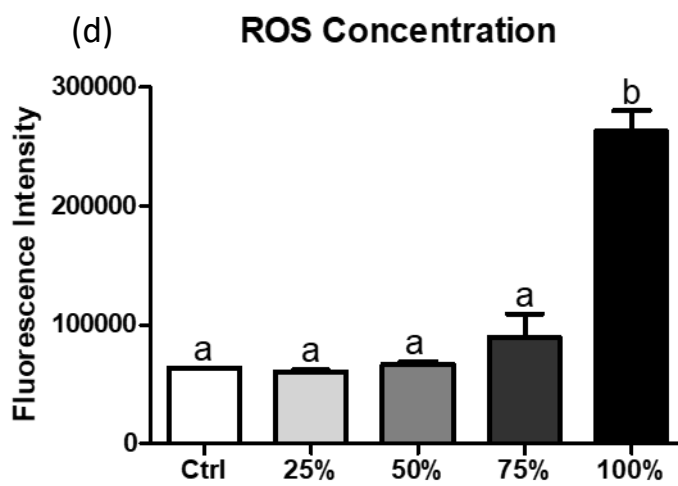
1102

1103

1104

1105

1106



1107 **Figure 7.**

1108

1109

1110

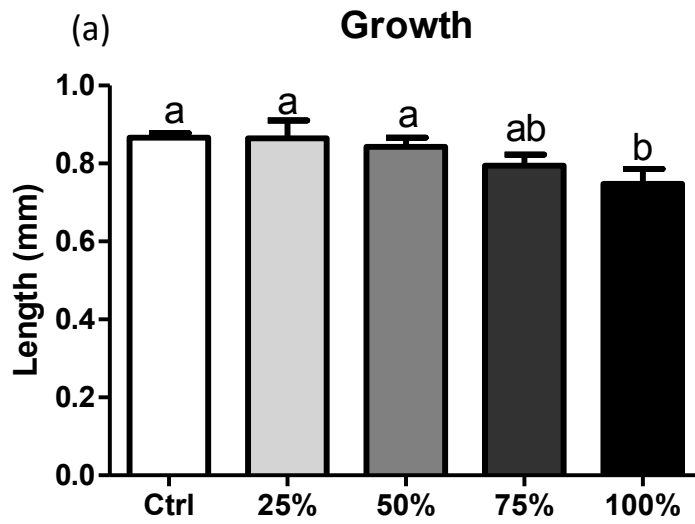
1111

1112

1113

1114

1115



1116

1117

1118

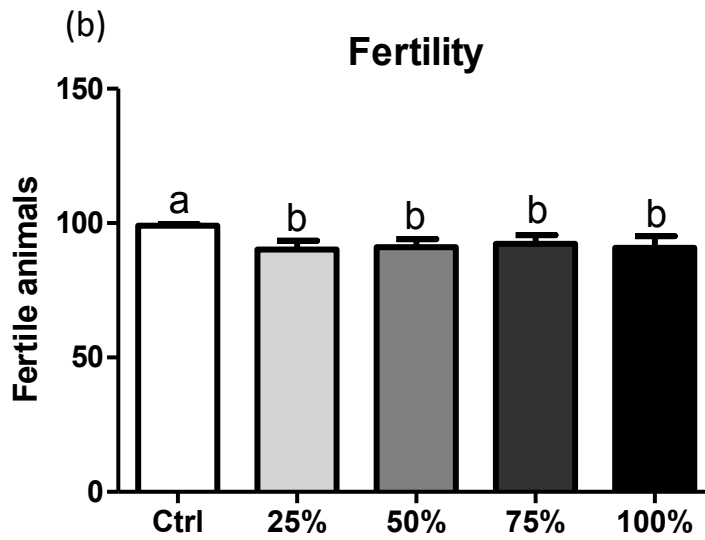
1119

1120

1121

1122

1123



1124

1125

1126

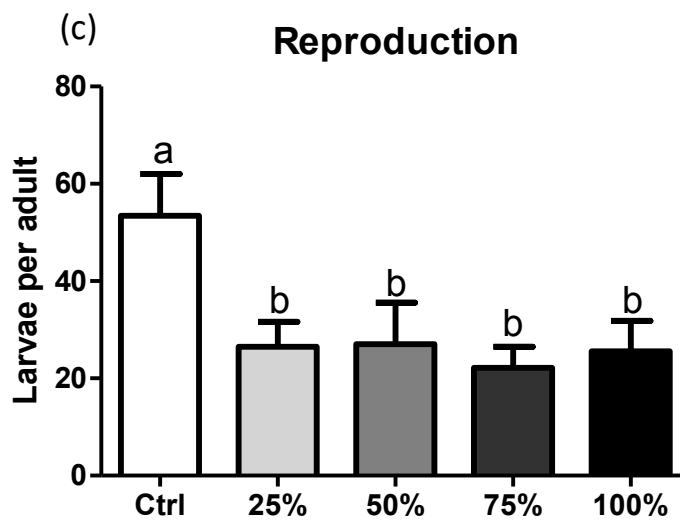
1127

1128

1129

1130

1131



1132 **Figure 8.**

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

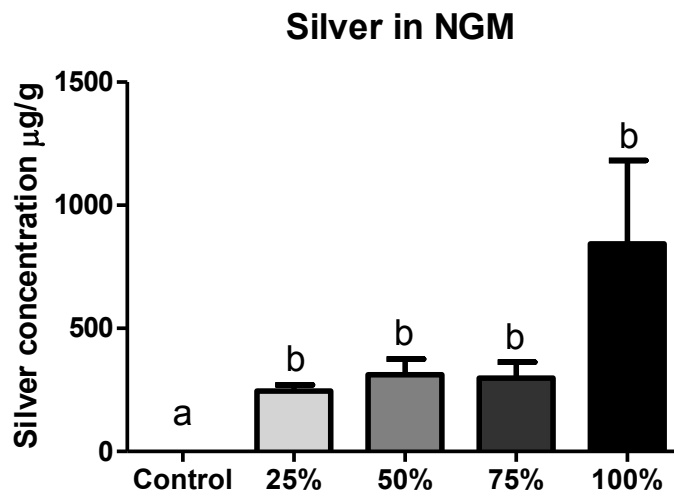
1150

1151

1152

1153

1154



Supplementary material

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166 ~~Fig. 1 Cutouts of the Acticoat Flex 3 dressing on the board with growth from e. coli~~

1167 ~~(OP50) only where there is no material.~~

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

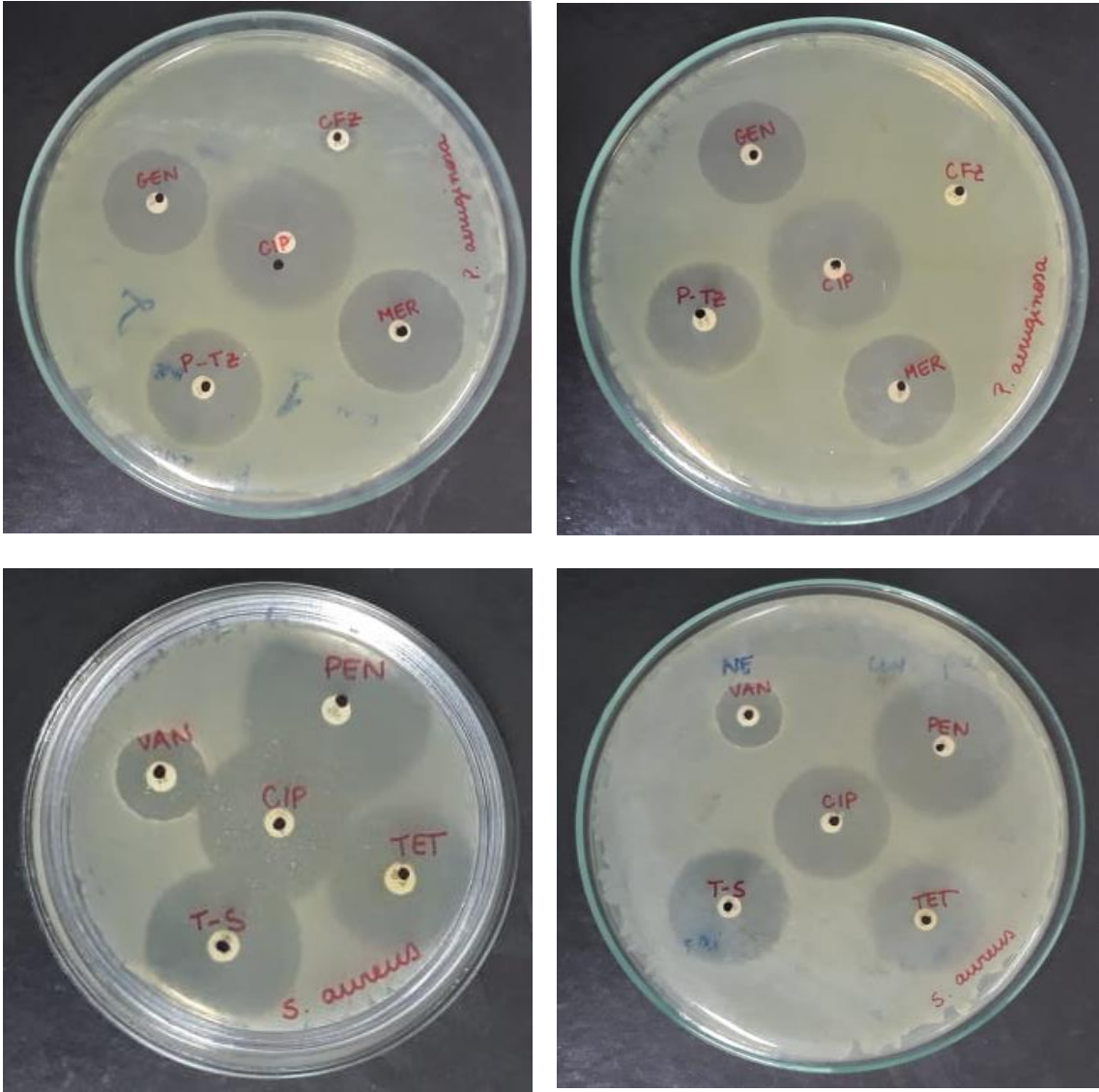
1175

1176

1177

1178

1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197



1198 **Fig.2.** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) was exposed to Ciprofloxacin,
1199 Ceftazidime, Gentamicin, Piperaclycline-Tazobactam, Meropenem, and *Staphylococcus*
1200 *aureus* (ATCC 12598) to Ciprofloxacin, Penicillin, and Tetracycline.

1201
1202
1203
1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

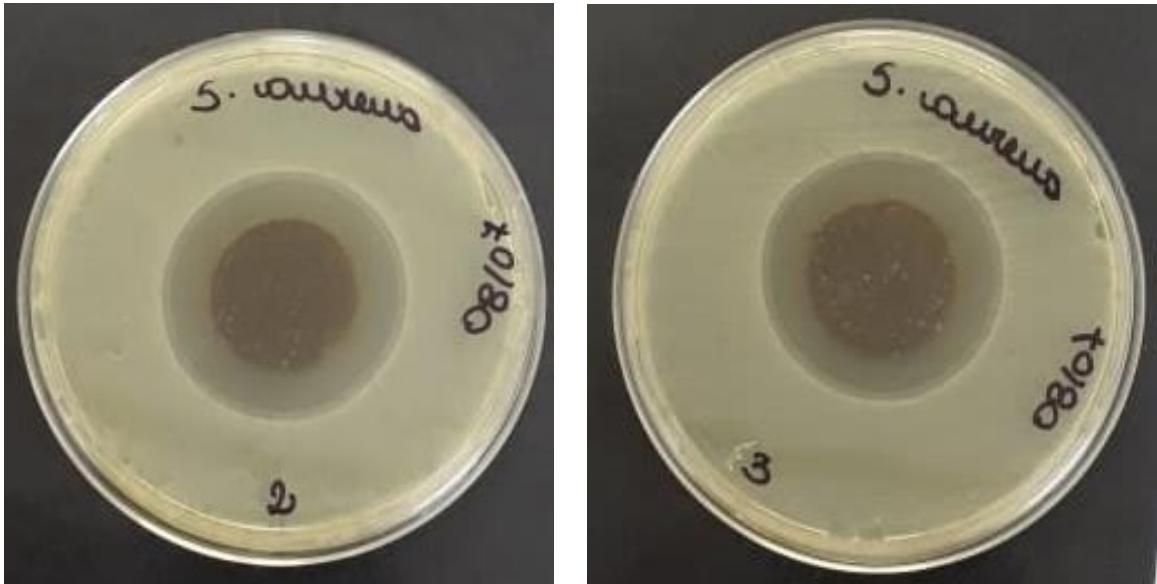
1211

1212

1213

1214

1215



1216 **Fig. 3.** *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) exposed to ACTICOAT FLEX

1217

1218

1219

1220

1221

1222

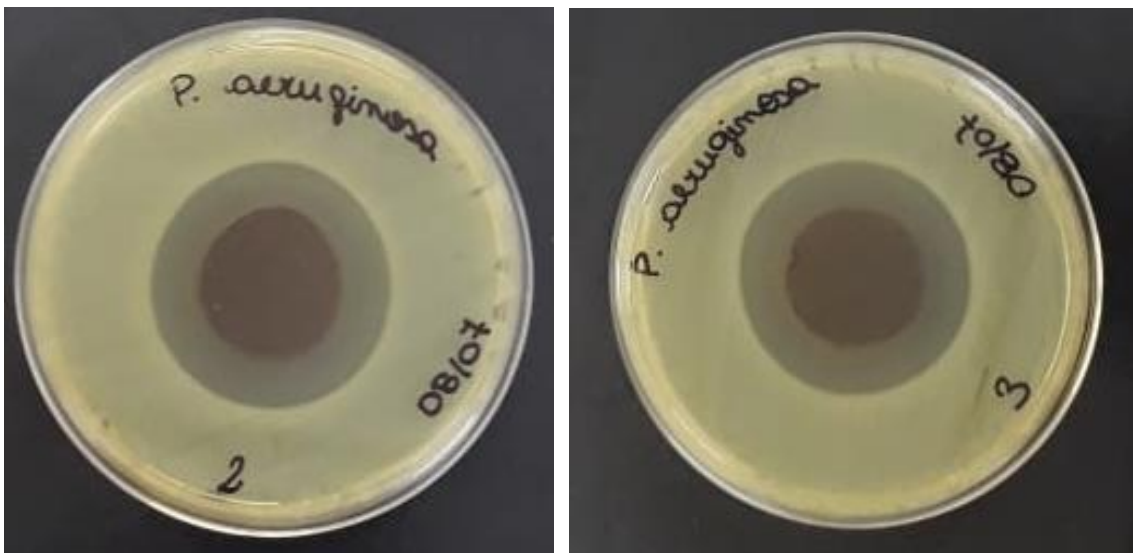
1223

1224

1225

1226

1227



1228 **Fig. 4.** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) exposed to ACTICOAT FLEX 3

1229

1230

1231

1232

1233

1234

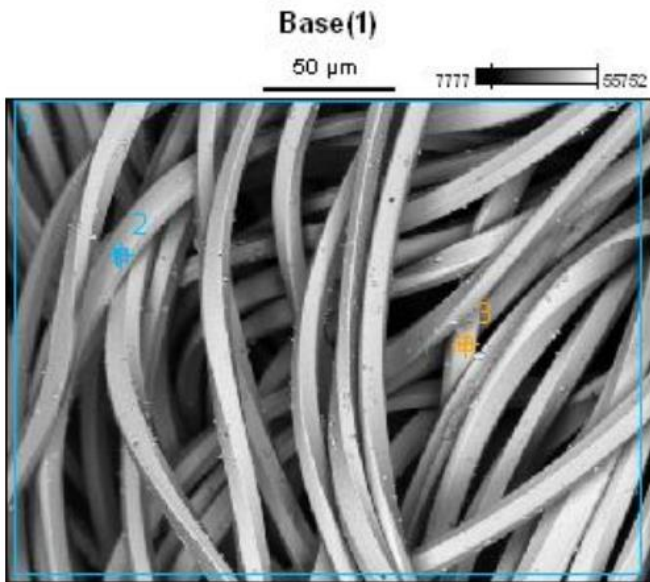
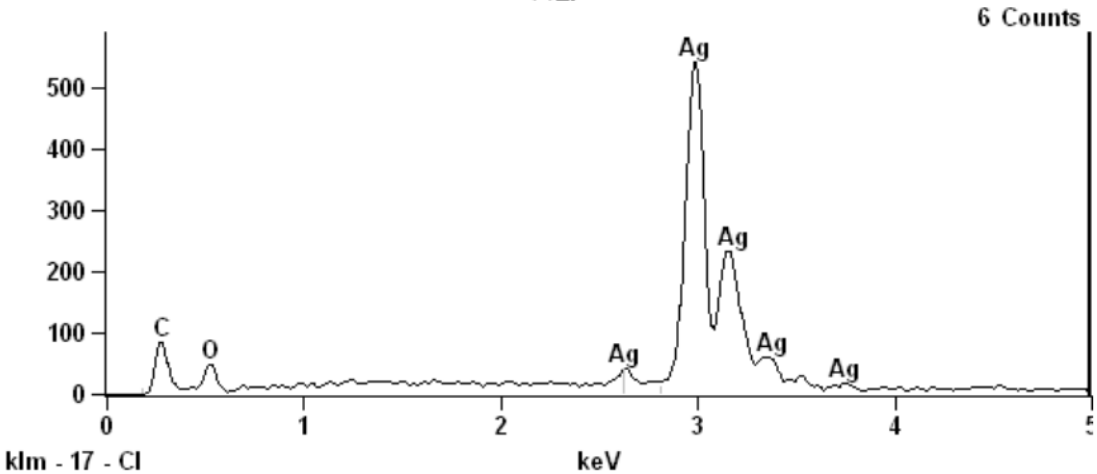


Image Name:	Base(1)
Image Resolution:	512 by 384
Image Pixel Size:	0.47 μm
Acc. Voltage:	15.0 kV
Magnification:	500

1245

A

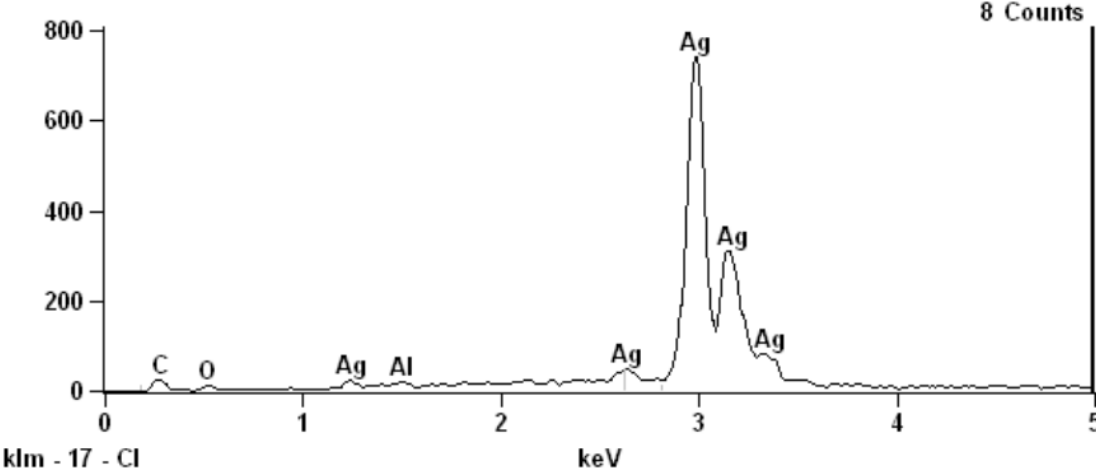


1246

1247

1248

B



1249

1250

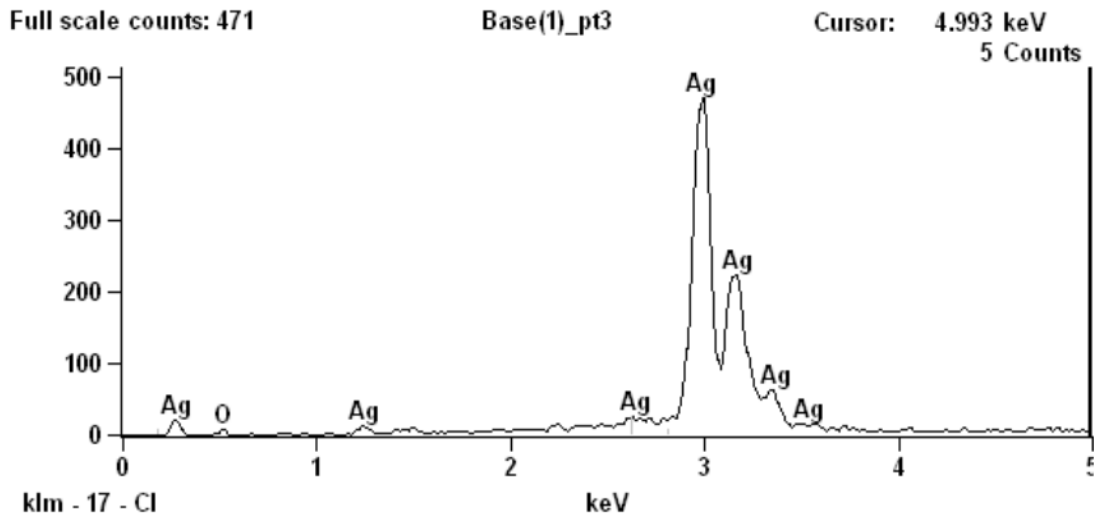
1251

1252

1253

1254

1255

C

1256

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1257				
1258	<i>Base(1)_pt1</i>	+/-0.18	+/-1.71	+/-2.77
1259	<i>Base(1)_pt2</i>	+/-0.07	+/-0.47	+/-2.65
	<i>Base(1)_pt3</i>	+/-0.58		+/-5.49

Atom %

1260

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1261				
1262	<i>Base(1)_pt1</i>	12.68	34.56	52.76
1263	<i>Base(1)_pt2</i>	4.68	9.39	84.83
	<i>Base(1)_pt3</i>		11.47	88.53

Atom % Error (+/- 2 Sigma)

1264

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1265				
1266	<i>Base(1)_pt1</i>	+/-0.97	+/-6.83	+/-1.64
1267	<i>Base(1)_pt2</i>	+/-0.58	+/-2.78	+/-2.30
	<i>Base(1)_pt3</i>		+/-3.53	+/-4.96

Formula

1268

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1269				
1270	<i>Base(1)_pt1</i>	C	O	Ag
1271	<i>Base(1)_pt2</i>	C	O	Al
	<i>Base(1)_pt3</i>		O	Ag

1272

1273

1274

1275

1276

Weight %

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1277	<i>Base(1)_pt1</i>	2.38	8.65	88.97
	<i>Base(1)_pt2</i>	0.60	1.60	97.48
1278	<i>Base(1)_pt3</i>		1.89	98.11

Weight % Error (+/- 2 Sigma)

1279

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1280	<i>Base(1)_pt1</i>	+/-0.18	+/-1.71	+/-2.77
	<i>Base(1)_pt2</i>	+/-0.07	+/-0.47	+/-2.65
	<i>Base(1)_pt3</i>		+/-0.58	+/-5.49

1281

Normalized Wt. %

	<i>C-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Al-K</i>	<i>Ag-L</i>
1282	<i>Base(1)_pt1</i>	2.38	8.65	88.97
	<i>Base(1)_pt2</i>	0.60	1.60	97.48
1283	<i>Base(1)_pt3</i>		1.89	98.11

1284 **Fig. 5.** Qualification of the existing silver in the dressing performed through

1285 energy dispersion spectroscopy (EDS).

1286

1287

1288

1289

1290

1291

1292

1293

1294

1295

1296

1297 **Table 1.** Antibacterial power against *Pseudomonas aeruginosa* of different antibiotics.
 1298 The values refer to the diameter in mm of the generated halo. Data of three independent
 1299 assays are shown, as well as the mean and standard error of the mean (SEM). The
 1300 interpretation of the results obtained in the antibiogram followed the Performance
 1301 Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing protocol (CLSI M100).

***Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) Halo - Diameter (mm)**

Antibiotic	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Mean ± SEM	Susceptibility Profile
Ciprofloxacin	39	40	38	39.0 ± 0.58	Susceptible
Ceftazidime	0	0	0	0	Resistant
Gentamicin	30	31	31	30.7 ± 0.33	Susceptible
Piperacycline- Tazobactam	38	38	33	36.3 ± 1.67	Susceptible
Meropenem	34	35	31	33.3 ± 1.20	Susceptible
Acticoat Flex 3	84,5	83,5	-	84.0 ± 0.71	Susceptible

1302
 1303
 1304
 1305
 1306
 1307
 1308
 1309
 1310

1311 **Table 2.** The table shows data regarding the action of antibiotics in relation to bacteria
 1312 *Staphylococcus aureus*. The values expressed refer to the diameter in mm of the
 1313 generated halo. Data of three independent assays are shown, as well as the mean and
 1314 standard error of the mean (SEM).

Staphylococcus aureus (ATCC 12598) Halo - Diameter (mm)

Antibiotic	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Mean and SEM	Susceptibility Profile
Ciprofloxacin	38	33	39	36.7 ± 1.86	Susceptible
Penicillin	39	40	40	39.7 ± 0.33	Susceptible
Sulfametoxazol- Trimeptoprima	38	33	38	36.3 ± 1.67	Susceptible
Tetracycline	30	33	33	32.0 ± 1.00	Susceptible
Acticoat Flex 3	80,3	81,6	81,1	81.0 ± 0.65	Susceptible

1315
 1316
 1317
 1318
 1319
 1320
 1321
 1322
 1323
 1324

1325 **Table 3.** L1 animals exposed to dressing controls, where there was no statistical
 1326 difference compared to control group (0 %).

	ctl 100%	ctl 75%	ctl 50%	ctl 25%	0%
Growth (mm)	0.86 ± 0.004	0.86 ± 0.006	0.87 ± 0.013	0.86 ± 0.005	0.87 ± 0.008
Reproduction (n larvae/adult)	45.12 ± 0.855	44.06 ± 2.057	45.02 ± 1.502	45.53 ± 1.758	45.19 ± 1.625
Fertility (%)	96.67 ± 2.722	99.33 ± 0.544	100.00 ± 0.000	97.44 ± 2.094	99.33 ± 0.544

1327

1328

1329

1330

1331

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341 **Discussão Geral**

1342 Diversos produtos que contém nanopartículas de prata estão em ampla
1343 disponibilidade no mercado. Por exemplo, o curativo ACTICOAT FLEX 3 foi
1344 adquirido com facilidade através de compra via internet e, como já mencionado,
1345 encontra se autorizado a ser comercialização pela ANVISA. Foi possível constatar que
1346 este produto atendeu a hipótese inicial desta pesquisa, demonstrando toxicidade ao
1347 organismo *C. elegans*.

1348 O curativo, que é recortável, quando adquirido para uso doméstico pode não ser
1349 usado na sua totalidade, e pedaços ainda impregnados com os nanocristais de prata
1350 podem acabar sendo descartado em lixo comum. Desta forma existe a possibilidade de o
1351 curativo atingir diferentes compartimentos ambientais onde poderá exercer sua
1352 toxicidade. Como mencionado na **Introdução**, já foi comprovada a toxicidade das
1353 nanopartículas de prata ao verme mencionado por inúmeros autores como Roh et al
1354 (2009) que corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

1355 Para elucidar o que realmente havia na malha do curativo, foi realizada a
1356 microscopia eletrônica de varredura, onde foi possível observar as partículas. Logo
1357 após, com microscopia eletrônica de transmissão foi possível medir os nanocristais de
1358 prata e encontrar uma gama variada de tamanhos destas. A lavagem do curativo em
1359 solução salina (0,9 % de NaCl) mostrou uma tendência a aglomerar. Este fato foi
1360 reforçado pelos valores encontrados no potencial Zeta, de -17,8 mV em solução salina e
1361 -25 mV em água deionizada respectivamente. Alguns autores mostram que os valores
1362 do potencial zeta entre \pm 20-30 mV são moderadamente estáveis (Patel et al., 2011;
1363 Bhattacharjee, 2016).

1364 Esta aglomeração era esperada já que que o NaCl, no meio, gera esta tendência
1365 (Michael, 2000; Doty et al., 2005). O que pode nos levar a inferir, que dependente do
1366 meio onde o produto é descartado, este fator pode influenciar na disponibilidade deste
1367 material. Autores como Auffan et al. (2009) indicam que partículas menores que 30 nm
1368 são mais tóxicas, fato associado com a área de contato, gerando maior interação. Isto
1369 nos leva a efetuar uma segunda inferência: pelo fato das partículas aglomeradas
1370 apresentarem um maior tamanho, poderiam elas serem menos danosas, do que as
1371 liberadas em água deionizada, onde estariam mais dispersas

1372 Cientes de dados que demonstravam a participação não só da toxicidade das
1373 nanopartículas de prata, mas também dos íons de prata (Morones et al., 2005), foi
1374 quantificado a liberação destes íons do curativo, verificando uma liberação de 34 %
1375 durante 72 h, algo esperado em função da atividade antimicrobiana apresentada pelo
1376 produto (Mebert et al., 2016).

1377 Para verificar a concentração que é teoricamente liberada com uso se optou por
1378 utilizar uma metodologia que simulasse o efeito tópico do curativo através da inserção
1379 do produto em meio NGM, sendo este processo efetuado a 37 °C e a também 20 °C
1380 (temperatura ótima para o verme). Em ambas as temperaturas houve liberação de prata
1381 se mostrando uma estratégia apropriada para expor ao organismo alvo.

1382 Os diferentes recortes de curativos liberaram diferentes concentrações de prata.
1383 Visto que os curativos foram cortados em quatro tamanhos proporcionais era esperado
1384 resultados gradativamente maiores em relação ao tamanho do curativo. As diferentes
1385 concentrações obtidas nessas análises poderiam indicar diversas hipóteses, entre elas,
1386 maior liberação em função da metodologia de recorte, mas também, poderia indicar que
1387 a concentração dos nanocristais não é homogênea na malha.

1388 Uma preocupação encontrada era se após os três dias de uso o produto poderia
1389 ainda conter prata. Desta forma foi feito um teste onde, após os três dias de liberação, o
1390 meio NGM rico em prata foi removido e um novo foi acrescentado. Foi possível
1391 observar com isso que após mais 3 dias em um NGM novo, ainda houve liberação de
1392 prata, o que a princípio é um achado problemático do ponto de vista ambiental, toda vez
1393 que o produto poderá continuar liberando prata no local onde for descartado.

1394 De modo a medir não só a prata liberada, mas também a prata total presente no
1395 curativo foi realizada uma análise onde o curativo foi mineralizado e foi avaliada a prata
1396 total via espectroscopia atômica de absorção. Foi verificada uma concentração de prata,
1397 muito próxima ao indicado pelo fabricante o que de novo traz questionamentos a sua
1398 segurança ambiental após seu descarte.

1399 Visando avaliar o poder bactericida, cepas bacterianas foram expostas ao
1400 curativo, confirmando então a eficácia da atividade antimicrobiana, já que ele
1401 apresentou halos assim como os dos obtidos com antibióticos específicos.

1402 Pelo viés ambiental, o material estudado, tem potencial de causar dano ao
1403 organismo teste aqui utilizado, mas que pode levantar a hipótese de ser extrapolado a
1404 outros organismos, levando em consideração que o nematoide em questão, possui 60-
1405 80% dos genes humanos têm um ortólogo no genoma de *C. elegans* (Kaletta e
1406 Hengartner, 2006). Autores como Contreras et al. (2014), observam em seus estudos
1407 redução do crescimento do *C. elegans*, quando expostos a nanopartículas de prata,
1408 outros autores, também observam danos na reprodução e fertilidade (Roh, 2009; Kim, et
1409 al., 2017), dados estes também observados neste estudo, onde desde os menores recortes
1410 no caso de reprodução e fertilidade, demonstraram danos ao organismo. Yang et al.
1411 (2018) explica que um dos mecanismos das nanopartículas de prata é uma maior

1412 produção de espécies reativas de oxigênio, o que também foi encontrado no caso dos
1413 vermes expostos ao curativo, onde a concentração de 100% apresentou uma acentuada
1414 fluorescência.

1415 Para se aproximar de um cenário ambiental, além dos vermes em estágio L1,
1416 vermes em um estágio larval mais avançado, o L4, também foram expostos, e estes
1417 demonstraram maior resistência a toxicidade, não demonstrando diferença dos seus
1418 controles, sugerindo uma menor permeabilidade à prata no estágio L4 devido à sua
1419 cutícula mais espessa (Chaweeborisuit et al., 2016).

1420

1421 **Conclusão**

1422

1423 Os resultados indicaram que o ACTICOAT FLEX 3 tem um efeito
1424 antibacteriano nas cepas testadas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*).
1425 O curativo revestido com nanocristais de prata induziu redução na reprodução,
1426 crescimento e fertilidade e maior concentração de ERO nos animais em estágio larval
1427 L1, diferentemente dos animais em estágio L4, que apresentaram menor suscetibilidade
1428 e não apresentaram alterações. Com os resultados obtidos, podemos inferir que o
1429 descarte inadequado deste curativo revestido tem o potencial de causar danos a
1430 organismos como *C. elegans*, apontando para o risco ambiental, e levantando algumas
1431 questões como: Quanto tempo o curativo pode liberar seu conteúdo no ambiente? Em
1432 meio líquido a liberação poderia ser maior? Os animais em L4 que foram expostos por
1433 96 h, não sofreram toxicidade, expostos por mais tempo sofreriam? Os ovos dos animais
1434 caso expostos, teriam a viabilidade comprometida? E os animais que estão ou já
1435 passaram por fase dauer, teriam uma suscetibilidade diferenciada dos L1, assim como os
1436 L4 tiveram?

1437

1438 **Referências Bibliográficas**

- 1439 Ahamed, M. et al. **Clinica Chimica Acta**. 411: 1841–1848, 2010.
- 1440 Arora, S. et al. **Toxicology Letters**. 179 (2): 93–100, 2008.
- 1441 AshaRani, P. et al. **BMC Cell Biology**. 17(10): 65, 2009.
- 1442 Auffan, M. et al. **Nature Nanotechnology**. 4: 634-641, 2009.
- 1443 Bhattacharjee, S. et al. **Journal of Controlled Release**. 2016.
- 1444 Bosetti, M. et al. **Biomaterials**. 23: 887-892, 2002.
- 1445 Brasil, projeto de lei nº 5.076 de 2005.
- 1446 Brasil, projeto de lei nº 5.133 de 2013.
- 1447 Brenner, S. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, 1988
- 1448 Brenner, S. **Genetics**. 77 (1) 71-94, 1974.
- 1449 Cafure V. e Patriarcha-Graciolli S. **Interações**. 16 (2): 301-314, 2015.
- 1450 Camargo, M. E. et al. **Scientia Plena**. 5 (7): 1-14, 2009.
- 1451 Chaweeborisuit, P. et al. **Z. Naturforsch.** 121-131, 2016.
- 1452 Chen, X e Schluesener, H. **Toxicology Letters**. 176 (2008:) 1–12, 2008.
- 1453 Chen, X. e Schluesener, H. **Toxicology Letters**. 176 (2008): 1–12, 2008.
- 1454 Choi, J. et al. **Aquatic Toxicology**. 100: 151–159, 2010.
- 1455 Chopra, I. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 59(4): 587–590, 2007.
- 1456 Cohen, M. S. et al. **Surgical Infections**. 8: 397-403, 2007.
- 1457 Contreras, E. et al. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 33 (12): 2716–2723,
1458 2014.
- 1459 Doty, R. et al. **Chemistry of Materials**. 17(18): 4630-4635, 2005.
- 1460 Ferreira, A., e Sant'Anna, L. **Revista Uniandrade**.
- 1461 Gliga, A. R. et al. **Particle and Fibre Toxicology**. 11: 11, 2014.
- 1462 Gonzalez-Moragas, L., Roig, A., Laromaine A. **Advances in Colloid and Interface
1463 Science**. 219: 10–26, 2015.
- 1464 Greulich, C. et al. **Langenbeck's Archives of Surgery**. 394: 495–502, 2009.
- 1465 Gurunathan, S. et al. **Nanoscale Research Letters**. 31; 9(1):373, 2014.

- 1466 <https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf> acessado em 15 de junho de 2019.
- 1467 ISO, 27.628/2007. Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosol exposure
1468 characterization and assessment.
- 1469 Kaletta, T. e Hengartner M. O. **Nature Reviews Drug Discovery**. 5: 387-398, 2006.
- 1470 Kawata, K. et al. **Environmental Science and Technology**. 43 (15): 6046–6051, 2009.
- 1471 Khundkar, R. et al. **Burns**. 36(6):751-8, 2010.
- 1472 Kim, J. et al. **Scientific Reports**. 7(40225): 1-11, 2017.
- 1473 Klasen, H. J. **Burns**. 26: 117-130, 2000.
- 1474 Kooijman, S. A. **Cambridge University Press, Cambridge, U.K.** 2010.
- 1475 Liu, H. et al. **Nature Communications**. 3:1073, 2012.
- 1476 Liu, W. et al. **Nanotoxicology**. 4(3): 319-330, 2010.
- 1477 MCTI- mcti.gov.br
- 1478 Mebert, C. **Journal of Materials Chemistry B**. 4: 3135, 2016.
- 1479 Michaels, A. et al. L. E. **The Journal of Physical Chemistry B**. 104, 119-165, 2000.
- 1480 Moon, J. **Chemosphere**. 2019.
- 1481 Morones J. **Nanotechnology**. 16 (10): 2346- 2353, 2005.
- 1482 NANoREG, a common European approach to the regulatory testing of nanomaterials.
1483 Final Report (part 1). November 2016 / updated 2017/02/21.
- 1484 Navarro, E. et al. **Ecotoxicology**. 17: 372–386, 2008.
- 1485 Niska, K. et al. **Chemico-Biological Interactions**. 295: 38-51, 2018.
- 1486 Oliveira, L. et al. **Amazon’s Research and Environmental Law**. 3 (3): 36-51, 2015.
- 1487 Orrenius, S. et al. **Toxicology Letters**. 64/65:357-364, 1992.
- 1488 Paladini, F. et al **Journal of Materials Science**. 24: 2461-2472, 2013.
- 1489 Patel, V. R. e Agrawal, Y. K. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology &**
1490 **Research**. 2: 81-87, 2011.
- 1491 Raizen, D. et al. **Nature**. 451: 569-572, 2008.
- 1492 Ratner, M., e Ratner, D. **Prentice Hal: Upper Saddle River, New Jersey**, 2003.
- 1493 Riddle, C. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, 1997.
- 1494 Rigo, C. et al. **Burns**. 38 (8): 1131-1142, 2012.
- 1495 Roh, J. et al. **Environmental Science and Technology**. 43: 3933–3940, 2009.

- 1496 Singh, N. et al. **Biomaterials**. 30: 3891-3914, 2009.
- 1497 The Global Nanomaterials Market to 2025 (procurar como citar)
- 1498 Wang, Z. et al. **Environmental Toxicology Chemistry**. 31(10): 2408-2413, 2013.
- 1499 Wijnhoven, S. et al. **Nanotoxicology**. 3(2): 109138, 2009.
- 1500 Yang et al. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 165(15): 291-298, 2018.