

Daniela Lúcia Silva Gomes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents”

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview on its Characteristics, Toxicity and Environmental Risk” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respectivamente do Dr. Pedro Baptista, Dr. César Gonçalves e Professora Doutora Eliana Souto, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Lúcia Silva Gomes

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An overview on its characteristics, toxicity and environmental risk*” referentes à unidade curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Pedro Baptista, Dr. César Gonçalves e da Professora Doutora Eliana Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



Declaração de Autoria

Eu, Daniela Lúcia Silva Gomes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013145028, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An overview on its characteristics, toxicity and environmental risk” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 06 de setembro de 2018

(Daniela Lúcia Silva Gomes)



Agradecimentos

Ao Dr. Pedro Baptista, pela acessibilidade que demonstrou desde o primeiro momento e todo o apoio e confiança que em mim depositou.

À equipa de Farmácia Universal, mais concretamente à Dra. Rita Peixoto, Dra. Sofia Ferreira, Dra. Gilda Marques e Dr. Carlos Antunes, pela forma como me acolheram, profissionalismo e ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. César Gonçalves, Dr. Ricardo Andrade e a toda a equipa da Owlpharma pela oportunidade de estágio e pela partilha de conhecimentos.

À Doutora Eliana Souto pelo apoio, disponibilidade e orientação na realização da monografia.

À Dra. Joana Campos pelos esclarecimentos e auxílio prestados na realização da monografia.

À Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra pelo enorme contributo prestado à minha formação académica, cívica e desenvolvimento pessoal.

A todas as pessoas que partilharam comigo este percurso e que fizeram dele a etapa mais feliz e plena da minha vida.

Dedico um agradecimento especial à minha família, por todos os conselhos e apoio incondicional. A eles dedico todas as conquistas da minha vida.

A todos, o meu sincero...

Muito Obrigado!



“

Sabemos muito mais do que julgamos,
podemos muito mais do que
imaginamos.

”

- José Saramago -

ÍNDICE

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
NOTA INTRODUTÓRIA.....	9
FARMÁCIA UNIVERSAL.....	9
ANÁLISE SWOT.....	10
PONTOS FORTES.....	10
I. <i>Localização privilegiada</i>	<i>10</i>
II. <i>Estágio estruturado e acompanhado</i>	<i>11</i>
III. <i>Diversidade de tarefas realizadas.....</i>	<i>11</i>
IV. <i>Horário de estágio flexível</i>	<i>12</i>
V. <i>Equipa Técnica.....</i>	<i>12</i>
VI. <i>Qualidade do atendimento.....</i>	<i>12</i>
VII. <i>Sistema de Cashguard</i>	<i>13</i>
VIII. <i>Prescrição por DCI</i>	<i>13</i>
IX. <i>Receita eletrónica desmaterializada</i>	<i>14</i>
PONTOS FRACOS.....	14
I. <i>Fraca formação em dermocosmética e veterinária</i>	<i>14</i>
II. <i>Espaço físico e stocks reduzidos.....</i>	<i>15</i>
III. <i>Receitas manuais.....</i>	<i>15</i>
IV. <i>Preparação de medicamentos manipulados</i>	<i>16</i>
OPORTUNIDADES.....	16
I. <i>Cartão da Farmácia Universal</i>	<i>16</i>
II. <i>Acompanhamento farmacoterapêutico</i>	<i>17</i>
III. <i>Gestão e merchandising</i>	<i>17</i>
AMEAÇAS.....	18
I. <i>Reduzida familiarização com nomes comerciais de medicamentos</i>	<i>18</i>
II. <i>Rutura de stocks nos armazenistas/distribuidores.....</i>	<i>18</i>
III. <i>Proximidade com outras farmácias</i>	<i>19</i>

CASOS CLÍNICOS	20
<i>Caso 1 – Sintomas gripais versus constipações</i>	20
<i>Caso 2 – Manejo da tosse em crianças pequenas</i>	21
<i>Caso 3 – Tratamento da obstipação (prisão de ventre)</i>	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
PART II – Relatório de Estágio na OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.	27
LISTA DE ABREVIATURAS	28
NOTA INTRODUTÓRIA	29
OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.	29
ANÁLISE SWOT	30
Pontos Fortes.....	30
I. <i>Acolhimento na Owlpharma</i>	30
II. <i>Equipa de colaboradores</i>	31
III. <i>Plano de formações Internas</i>	31
IV. <i>Ampla espectro de tarefas realizadas</i>	32
V. <i>Desenvolvimento de Competências</i>	32
VI. <i>Autonomia e reconhecimento</i>	33
I. <i>Volume de trabalho incerto</i>	33
II. <i>Formação em Farmacovigilância e Publicidade de Medicamentos</i>	34
III. <i>Falta de feedback inicial</i>	34
Oportunidades.....	34
I. <i>Realização de estágio em Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância</i>	34
II. <i>Conhecimento do mercado farmacêutico</i>	35
III. <i>Empresa em expansão</i>	35
Ameaças.....	36
I. <i>Plano curricular</i>	36
II. <i>Exigências acrescida associada à realização de estágio opcional</i>	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

PART III – Monograph “Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents”	38
RESUMO	39
ABSTRACT	39
List of abbreviations and acronyms	40
Introduction	42
Nanomaterials	43
Metal-based nanoparticles properties.....	43
I. Size.....	44
II. Shape and roughness	44
III. Surface energy	45
Metal-based nanoparticles general mechanisms	46
Metal and metal oxide nanoparticles	47
SILVER NANOPARTICLES (AgNPs)	49
<i>Synthesis</i>	49
<i>Synthesized AgNPs control</i>	51
<i>Characterization</i>	52
<i>Pharmacokinetics</i>	52
Absorption.....	53
Gastrointestinal absorption:	53
Pulmonary absorption:.....	53
Cutaneous absorption:.....	54
Distribution	54
Metabolism and excretion.....	54
<i>Pharmacodynamics</i>	55
COPPER AND COPPER OXIDE NANOPARTICLES (CuNPs and CuONPs)	57
<i>Synthesis</i>	57
<i>Pharmacokinetics</i>	57
<i>Pharmacodynamics</i>	57
GOLD NANOPARTICLES (AuNPs)	58
<i>Synthesis</i>	58
<i>Pharmacokinetics</i>	59
<i>Pharmacodynamics</i>	59

ZINC OXIDE NANOPARTICLES (ZnONPs)	59
<i>Synthesis</i>	60
<i>Pharmacokinetics</i>	60
<i>Pharmacodynamics</i>	61
Limitations.....	61
I. <i>Long-term stability</i>	61
II. <i>Toxicity</i>	62
a) <i>Pulmonary toxicity</i>	63
b) <i>Hepatotoxicity</i>	63
c) <i>Nephrotoxicity</i>	64
d) <i>Neurotoxicity</i>	64
e) Other side effects	65
III. Environmental risk assessment	65
CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS	66
REFERENCES	68
ATTACHMENTS	81

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



FARMÁCIA UNIVERSAL



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>DCI</i>	Denominação Comum Internacional
<i>FFUC</i>	Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra
<i>MICF</i>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<i>MNSRM</i>	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
<i>MSRM</i>	Medicamento Sujeito a Receita Médica
<i>OTC</i>	<i>Over-the-Counter Drugs</i>
<i>RAM</i>	Reações Adversas a Medicamentos
<i>SNS</i>	Serviço Nacional de Saúde
<i>SWOT</i>	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>

NOTA INTRODUTÓRIA

A profissão de farmacêutico em Portugal remonta à idade média (séc. XIII). Os Boticários, eram considerados especialistas na manipulação em pequena escala de fármacos de origem vegetal, animal e mineral [1]. Desde então, a profissão passou por várias transformações, culminando numa expansão significativa do número de farmacêuticos recém-formados nas últimas décadas. Atualmente a profissão conta com mais de 15 000 farmacêuticos com uma distribuição maioritariamente do sexo feminino e de faixas etárias jovens (68% com idade inferior a 45 anos) a exercer atividade não só em Farmácia Comunitária ou Hospitalar, mas também em áreas como Análises Clínicas, Assuntos Regulamentares, Distribuição Farmacêutica, Indústria Farmacêutica, Investigação Científica, entre outras [2].

O farmacêutico é considerado um profissional de saúde altamente competente e especializado, que desempenha um papel de destaque ao longo de todo o ciclo de vida do medicamento. No entanto, nas últimas décadas tem se verificado uma mudança de paradigma na profissão. O farmacêutico deixou de ser apenas o “especialista do medicamento”, e passou a desempenhar um papel de relevo na promoção do conceito de saúde junto das populações. Como resultado dessa transformação, Portugal tem sido considerado nos últimos anos como um dos países da Europa no qual as farmácias oferecem um maior leque de serviços à comunidade, desempenhando um papel de relevo na integração e articulação na rede de cuidados primários de saúde [3].

O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, inserido no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) surge não apenas como uma oportunidade de consolidar e aplicar o conhecimento adquirido ao longo dos 5 anos de formação, mas também como uma oportunidade de aplicar esses conhecimentos na prestação de serviços disponibilizados às populações.

FARMÁCIA UNIVERSAL

A Farmácia Universal encontra-se situada na praça 8 de Maio, em plena Baixa da cidade de Coimbra. Adquirida pelo Dr. Pedro Baptista, atual diretor técnico, em 2014. Atualmente encontra-se aberta ao público de segunda a sexta-feira das 8:00 h as 19:00h e sábados das 9:00h às 13:00h. Para além do horário de expediente normal, a Farmácia Universal é periodicamente destacada como farmácia de serviço, mantendo-se em funcionamento permanente durante a noite.

ANÁLISE SWOT

O estágio na Farmácia Universal contou com a orientação do Dr. Pedro Baptista e teve a duração de 676 horas realizando-se durante o período de 8 de janeiro a 20 de abril. As atividades desenvolvidas durante este período são descritas no presente relatório de estágio sob a forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*).



PONTOS FORTES

I. Localização privilegiada

Por se localizar no coração da Baixa de Coimbra, junto à Câmara Municipal e numa das praças mais movimentadas da cidade, a Farmácia Universal dispõe de uma facilidade de acesso, que lhe confere o estatuto de farmácia de referência não só para a população que passa habitualmente por aquele local ou que ali trabalha, como também para a população sazonal, nomeadamente estudantes e turistas. Serve, por essa razão, uma população com características bastante heterogéneas. Este aspeto levou-me a contactar com um público-alvo muito abrangente, o que me possibilitou não só compreender a necessidade de ser um profissional versátil como também de trabalhar técnicas de abordagem e assim melhor adaptar o discurso ao tipo de utente com o qual me deparava.

II. Estágio estruturado e acompanhado

Por se tratar de uma farmácia relativamente pequena, uma das exigências que desde logo o meu orientador de estágio colocou foi o facto de não aceitar orientar mais do que um estagiário em simultâneo. Esse fator revelou-se uma grande mais valia para mim, no sentido em que me proporcionou uma aprendizagem mais personalizada e direcionada para as minhas necessidades.

O meu estágio passou por várias fases, sendo que numa primeira fase passei algum tempo na área de receção de encomendas e gestão de stocks, onde pude aprender as principais funcionalidades do sistema, necessárias à gestão de produtos na farmácia. Quando o Dr. Pedro Baptista percebeu que já dominava estas ferramentas, colocou-me inicialmente a observar atendimentos, onde fui gradualmente assimilando conhecimentos e técnicas de abordagem do utente junto da restante equipa. Aos poucos fui conquistando alguma autonomia, e o processo foi de tal forma gradual que, quase sem me aperceber já estava a fazer atendimentos de forma totalmente autónoma.

Destaco ainda o esforço da restante equipa técnica que, ao sentir a minha dificuldade em providenciar aconselhamento relativamente às variadas gamas de dermocosmética, por vezes, em períodos de menor movimento da farmácia, aproveitava para me fazer uma breve formação, apresentando as variadas gamas disponíveis na farmácia.

III. Diversidade de tarefas realizadas

Considero a diversidade de tarefas realizadas como um ponto forte do meu estágio na Farmácia Universal uma vez que a sua execução me permitiu compreender o funcionamento integrado da farmácia e dos seus subsectores. Assim, participei na realização de tarefas de gestão de stocks, onde me foi explicado pelo meu orientador como avaliar a rotatividade dos produtos, e em que situações os stocks deveriam ser aumentados ou reduzidos. Ainda neste âmbito, aprendi a importância do controlo de inventário e da gestão de prazos de validade que, quando realizados de forma eficaz permitem diminuir substancialmente as quebras anuais. Adicionalmente trabalhei com o sistema de Gestão de Devoluções do *Sifarma 2000*[®], onde me foi dada autonomia para realizar devoluções a fornecedores quando necessário. Para além destas tarefas de *back office*, realizei variadas atividades junto da população, nomeadamente dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e aconselhamento e dispensa de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e de dermocosméticos. Adicionalmente, realizei determinação de parâmetros bioquímicos.

IV. Horário de estágio flexível

Enquanto meu orientador, o Dr. Pedro Baptista sempre foi bastante flexível relativamente ao número de horas diárias de estágio, dando-me liberdade desde o primeiro dia para gerir o meu horário da forma que mais me conviesse, nesse sentido, optei por fazer um horário das 9h às 19h. No entanto sempre que me surgiu algum compromisso simultâneo ao período de estágio, este nunca se opôs à alteração do mesmo. Isto permitiu realizar estágio curricular naquelas instalações, sem comprometer atividades extracurriculares nas quais estava integrada.

V. Equipa Técnica

A equipa técnica, desde cedo se revelou bastante coesa e organizada, onde cada membro era responsável por determinadas tarefas, embora todos estivessem aptos para desempenhar outras tarefas quando tal se revelasse necessário. Um dos aspetos que considero como um fator de distinção e que acresce valor ao serviço prestado na Farmácia Universal é o facto dos farmacêuticos que integram o seu staff, apesar de constituírem uma equipa jovem, partilharem de um espírito de união e entreajuda notável. Considero que este trunfo constituiu uma mais valia não só para o bom ambiente que se transmitia na farmácia, como também para a minha fácil adaptação à nova rotina de trabalho. Desde cedo, o grupo se mostrou amplamente disponível para me transmitir os seus conhecimentos e ajudar, colocando-me bastante à vontade para expor qualquer dúvida, e apoiando o atendimento numa fase de aprendizagem inicial.

VI. Qualidade do atendimento

Com uma equipa de excelência que prima pela simpatia e pelo atendimento de qualidade, eram muitos os utentes que, pela relação de proximidade criada com os profissionais de saúde afirmavam com manifesta satisfação que gostavam muito de frequentar aquela farmácia, ou que, embora não fossem de Coimbra e tivessem farmácia nas proximidades de sua casa, vinham à Farmácia Universal sempre que podiam. Assim, destaco o profissionalismo e o cuidado com a satisfação do cliente como dois pontos fortes por serem aspetos que acrescentam valor aos serviços prestados pela Farmácia Universal e elevam os padrões de qualidade junto da população. Ao mesmo tempo, este aspeto permitiu-me perceber ao longo do estágio a importância da fidelização de utentes conseguida não só através da variedade de serviços prestados à comunidade como também através promoção da

melhoria contínua. Considero, por isso, este aspeto como um fator diferenciador que alterou bastante a minha visão do trabalho em farmácia comunitária.

VII. Sistema de Cashguard

A Farmácia Universal dispõe de um sistema de Cashguard que armazenava todo o dinheiro resultante das transações efetuadas durante o horário de expediente, ao mesmo tempo que disponibilizava de forma fácil e instantânea o troco durante uma venda. Este sistema simplificou não só o atendimento, uma vez que facilitava a transação financeira, como também o rastreamento de qualquer erro humano que existisse. Quando comecei a realizar atendimentos ao público foi-me atribuído um código de estagiário no *Sifarma 2000*[®] que coincidia com o código do sistema de Cashguard assim, por comparação das vendas diárias registadas no *Sifarma 2000*[®] com os movimentos registados no Cashguard era possível ter um maior controlo, e desta forma prevenir/corrigir possíveis erros durante o desempenho das minhas funções. Considero que a possibilidade de usufruir deste sistema ao longo do estágio revelou-se bastante vantajosa uma vez que, não só eliminava o risco de erro no manuseamento do dinheiro, permitindo-me focar mais no utente e nas suas necessidades e, como também agilizava bastante o processo de encerramento de caixa ao fim do dia. Adicionalmente, proporcionou-me uma maior perceção do volume de vendas diário que realizava no dia-a-dia.

VIII. Prescrição por DCI

Após a publicação da lei nº 11/2012, de 8 de março foram alteradas as regras de prescrição e dispensa de medicamentos. Este documento veio implementar as normas de prescrição de medicamentos pela Denominação Comum Internacional (DCI), forma farmacêutica, dosagem, apresentação e posologia, podendo em casos excecionais devidamente justificados pelo médico aparecer também a denominação comercial [4]. Desta forma, durante a fase de dispensa o utente pode optar entre medicamentos de marca ou medicamentos genéricos. Esta medida visou promover uma mudança de paradigma nos hábitos de consumo de medicamentos proporcionando um aumento do consumo de medicamentos genéricos que, mesmo apresentando eficácia, segurança e qualidade equivalente aos medicamentos de marca são comercializados a preços mais acessíveis. Esta alteração, permitiu que os utentes passassem a assumir um papel mais proativo na gestão do seu tratamento [5].

Para além disso, uma vez que ao longo do MICEF, o estudo dos agentes farmacológicos é essencialmente lecionado tendo por base as substâncias ativas, a transformação da prescrição anteriormente por nome comercial para prescrição por DCI facilitou bastante o momento da sua interpretação uma vez que me encontrava mais familiarizada com os termos. Nesse

sentido, a prescrição por DCI permitiu-me melhorar a minha capacidade de resposta às questões colocadas pelo utente.

IX. Receita eletrónica desmaterializada

Tendo em vista a agilização e uniformização do processo de prescrição foi publicado em Diário da República a 25 de fevereiro de 2016 o DESPACHO N.º 2935-B/2016, que estabelecia que, a partir do dia 1 de abril de 2016 a prescrição exclusiva através de receita eletrónica desmaterializada (receita sem papel) seria obrigatória. Esta medida visava conferir ao processo de prescrição uma maior autenticidade, segurança e fiabilidade ao mesmo tempo que promovia a implementação de práticas ambientais sustentáveis junto do (SNS) [6].

Nesta nova modalidade, após prescrição, o doente recebe o número da receita eletrónica juntamente com dois códigos de acesso: o “Código de Acesso e Dispensa” que permite ao farmacêutico aceder à receita e o “Código de Direito de Opção” necessário caso utente opte por um determinado medicamento e queira fazer uso desse direito. Estes dados podem integrar a guia de tratamento dada ao doente ou podem ser enviados via e-mail ou número telefónico. Apesar da lei ter entrado em vigor há mais de 2 anos, existem ainda algumas pessoas que nos chegam à farmácia um pouco confusas relativamente ao modo de funcionamento deste sistema. Este método teve, no entanto, uma boa aceitação por parte do público em geral uma vez que com este passou a ser possível aviar apenas os medicamentos que eram necessários, permitindo uma dispensa faseada. Apesar de, no passado, pouco ter contactado com este tipo de receitas, rapidamente compreendi o seu funcionamento uma vez que estas são bastante intuitivas comparativamente com as tradicionais receitas manuais, ou mesmo as receitas eletrónicas materializadas. Este novo sistema representa uma mais valia para as farmácias uma vez que permitiu a diminuição significativa do erro humano inerente à prática farmacêutica aumentando a confiança de profissionais de saúde e utentes. A nível pessoal, sinto que este formato eletrónico simplificou bastante o momento do atendimento e, em particular a aquisição de experiência ao longo do estágio.

PONTOS FRACOS

I. Fraca formação em dermocosmética e veterinária

Uma das dificuldades com as quais me deparei ao longo do atendimento consistiu no elevado número de pessoas que entravam na farmácia à procura de artigos de dermocosmética, nomeadamente cremes e que, quer devido ao elevado número de gamas disponíveis na farmácia, quer devido meu relativo desconhecimento dos produtos de cada

gama, acabava por não conseguir disponibilizar um aconselhamento mais completo. Embora a equipa me fosse prestando alguns esclarecimentos ao longo do estágio, o tempo acabou por se revelar escasso para a quantidade de produtos disponíveis no mercado. Considero que seria uma mais valia alargar o plano curricular na área de dermofarmácia, uma vez que esta pode constituir um fator diferencial para as farmácias. Por outro lado, essas falhas poderiam ter sido colmatadas com a presença em mais formações que me permitissem tomar conhecimento das gamas de produtos disponíveis no mercado e das suas indicações, algo que não se revelou possível durante o período em que decorreu o estágio.

II. Espaço físico e stocks reduzidos

A Farmácia Universal localiza-se num prédio histórico da baixa de Coimbra, que apresenta uma área bastante reduzida. Este facto limita não só o número de balcões de atendimento, como também o espaço disponível para exposição de OTC's (Over the Counter drugs), bem como de artigos de dermocosmética, puericultura, dietética, entre outros. Durante o meu estágio pude verificar a dificuldade que a equipa sentia, relativamente à gestão do espaço de exposição sempre que chegavam encomendas de produtos novos.

Do mesmo modo, o espaço disponível para armazenamento de medicamentos igualmente reduzido obrigava a uma gestão apertada, com stocks reduzidos de medicamentos. Este fator faz com que a Farmácia Universal se torne muito suscetível a oscilações de aprovisionamento dos distribuidores/armazenistas, acontecendo por diversas vezes rutura de stocks de alguns medicamentos que se encontravam rateados ou esgotados junto destes. Do mesmo modo, por vezes os utentes tinham preferência por um determinado laboratório que não estava disponível na farmácia no momento. Embora na maior parte dos casos fosse possível contornar a situação, por vezes os utentes eram obrigados a esperar até à próxima entrega do armazenista para obterem os medicamentos de que precisavam.

Considero que este aspeto constituiu um ponto fraco ao longo do meu estágio uma vez que, por diversas vezes a farmácia ficou sem stock de um determinado produto causando sempre algum constrangimento no momento do atendimento, quer para o farmacêutico que fica bastante limitado quer para o utente que não consegue obter o medicamento de que necessita.

III. Receitas manuais

Embora as receitas manuais tenham feito parte da prática farmacêutica ao longo dos últimos anos, o surgimento das prescrições eletrónicas tornou o ato de dispensa de MSRM bastante mais simples. Com a constante evolução do modelo de prescrição eletrónica,

atualmente a prescrição manual apenas se justifica em casos muito específicos como situações de: “a) Falência do sistema informático; b) Inadaptação fundamentada do prescriptor; c) Prescrição ao domicílio; d) Outras situações até um máximo de 40 receitas médicas por mês” [7].

Uma vez que as receitas manuais são cada vez menos frequentes, ao longo do meu estágio pouco contactei com este tipo de receitas, o que dificultou a minha familiarização com as mesmas. Assim, sempre que, no ato do atendimento, surgiram receitas deste tipo senti-me pouco à vontade uma vez que a probabilidade de erro era considerável. Para além de, ocasionalmente, as receitas virem incompletas (sem número de utente ou sem dosagem), por vezes a caligrafia do prescriptor não permitia a sua clara interpretação. A insegurança e pouco à vontade que sentia perante este tipo de receitas, levou a que, grande parte das vezes optasse por confirmar junto de um membro da equipa, os dados da receita/medicamentos, por forma a minimizar o risco de erros de interpretação.

IV. Preparação de medicamentos manipulados

Apesar da enorme evolução do setor da Indústria Farmacêutica, a manipulação de determinadas preparações pelos farmacêuticos de oficina continua a ser uma ferramenta valiosa na obtenção de formulações que não são produzidas pela indústria. Nestas inserem-se as Fórmulas Magistrais (quando são preparados segundo uma receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina) e os Preparados Oficiais (quando o medicamento é preparado de acordo com uma Farmacopeia ou Formulário) [8].

Embora a Farmácia Universal recebesse alguns pedidos de preparação de manipulados, estes não eram preparados, nas suas instalações, mas noutra farmácia pertencente ao mesmo grupo, a Farmácia Santa Isabel. Como tal não tive oportunidade de assistir à manipulação controlo de qualidade e cálculo de preços de medicamentos em contexto de farmácia de oficina. Considero que a oportunidade de participar na formulação de um medicamento manipulado em ambiente de farmácia de oficina representaria uma mais valia para o enriquecimento da minha formação académica, pelo que este foi um ponto fraco do meu estágio.

OPORTUNIDADES

I. Cartão da Farmácia Universal

A Farmácia Universal dispunha de um cartão de fidelização próprio, para além do cartão das Farmácias Portuguesas. Este destinava-se aos clientes habituais da farmácia e permitia acumular pontos com as vendas de produtos. Os pontos acumulados dariam direito

a um desconto de 10 % em produtos de IVA a 23% - maioritariamente produtos de cosmética e dietética. Este sistema permitia não só criar uma ligação de proximidade com os utentes habituais da farmácia ao mesmo tempo que, ao diminuir o preço dos produtos de venda livre, promovia a sua aquisição. Considero que esta ferramenta de marketing constitui uma oportunidade para aumentar o número de utilizadores da farmácia bem como o volume de vendas de produtos de maior margem de lucro para a farmácia (produtos cosméticos/higiene/dietéticos/etc).

II. Acompanhamento farmacoterapêutico

O acompanhamento farmacêutico é uma das atividades de maior responsabilidade e mais desafiantes da prática farmacêutica. Nos últimos anos este tem sido amplamente promovido dentro do setor farmacêutico. Este permite estudar e acompanhar, de forma contínua e integrada as patologias, a medicação associada e as preocupações de saúde dos utentes [9]. Considero que, num mercado farmacêutico no qual todas as farmácias comercializam os mesmos produtos, o fator diferenciador reside na variedade e qualidade dos serviços prestados. Assim, a componente de acompanhamento farmacoterapêutico surge como forma de preencher uma necessidade já identificada na população. Considerei este aspeto como uma oportunidade por permitir à Farmácia Universal a captação de alguns utentes novos e a prestação de um serviço adicional aos utentes já fidelizados. Para além disso, este permite a promoção do uso racional do medicamento junto do doente como também a deteção de possíveis interações medicamentosas, duplicações de terapêuticas ou reações adversas a medicamentos (RAM), melhorando desta forma a qualidade dos serviços prestados pela equipa farmacêutica. A nível económico pode constituir uma fonte de receita adicional.

Uma vez que uma grande maioria dos utentes da Farmácia Universal são clientes habituais, existe uma maior facilidade de implementação de um sistema de acompanhamento farmacoterapêutico, uma vez que os medicamentos habitualmente comprados pelos mesmo se encontram registados nas fichas de utente arquivadas no sistema *Sifarma 2000*[®].

III. Gestão e *merchandising*

Durante o estágio na Farmácia Universal adquiri conhecimentos práticos sobre técnicas de gestão e de *merchandising* farmacêutico, que vieram consolidar os conhecimentos teóricos adquiridos no âmbito da unidade curricular Organização e Gestão Farmacêutica. Ao longo o estágio pude depreender a importância de uma correta gestão da farmácia, razão pela qual o diretor técnico passava muito do seu tempo ocupado no desempenho dessas tarefas, as quais tive oportunidade de acompanhar.

Do mesmo modo, pude aplicar conhecimentos de *marketing* farmacêutico e de estratégias de vendas como o *cross-selling* ou *up-selling*, mas também de *merchandising*. O *merchandising* é uma ferramenta muito utilizada no *marketing* que tem como finalidade a promoção de um produto através da sua exposição para os utentes da farmácia, aumentando a sua visibilidade e a informação disponibilizada ao cliente, de modo a encorajar o impulso de compra. Na Farmácia Universal o *merchandising* era muito utilizado na apresentação de gamas de cosméticos e produtos de carácter sazonal, materializado sob a forma de cartazes ou mesmo de oferta de amostras dos produtos em questão. Considero que este aspeto se representou uma oportunidade ao longo do estágio já que, embora não fosse o foco central do mesmo, se revelou um complemento ao permitir o reconhecimento das estratégias de vendas empregues nas farmácias portuguesas, ao mesmo tempo que ia desenvolvendo as minhas competências sobre o tema [10].

AMEAÇAS

I. Reduzida familiarização com nomes comerciais de medicamentos

Como referi anteriormente, embora a prescrição por DCI tenha minimizado o problema da reduzida familiarização com os nomes comerciais do medicamento, inicialmente tornou-se um desafio para mim associar os nomes às substâncias ativas. Destaco este aspeto como uma das minhas maiores dificuldades quando iniciei o estágio na Farmácia Universal, não só porque os medicamentos estavam organizados alfabeticamente por nome comercial, como também pelo facto de, durante o atendimento ao público, por norma os utentes conhecerem os seus medicamentos pelo nome de marca o que criou, a princípio, algumas barreiras de linguagem. Considero que existe uma lacuna no plano curricular do MIF que deveria ser colmatada, de forma a ser possível no futuro facilitar a integração dos estagiários, e proporcionar a aplicação dos conhecimentos científicos adquiridos ao longo da sua formação de forma mais eficaz. Identifiquei este aspeto como uma potencial ameaça durante a realização do estágio na Farmácia Universal uma vez que este fator limitou a minha prestação inicial. Por outro lado, sinto que após contacto diário com os medicamentos e esforço adicional fui gradualmente conseguindo estabelecer associações entre termos.

II. Rutura de stocks nos armazenistas/distribuidores

Ao longo do meu estágio deparei-me como várias ocasiões durante as quais me foi solicitado um determinado medicamento, o qual não pude dispensar uma vez que os produtos se encontravam esgotados ou rateados. Por vezes a situação de incerteza arrastava-se por

várias semanas, sendo que algumas pessoas chegavam a dirigir-se praticamente todas as semanas à farmácia para perguntar se o produto já estaria disponível sem que a equipa tivesse informação suficiente para providenciar uma resposta concreta relativamente às previsões de receção do medicamento. Assim, considero que a rutura de stocks de medicamentos junto dos armazenistas e distribuidores constitui uma ameaça para as farmácias, uma vez que pode originar o corte no suprimento de medicamentos essenciais. Por outro lado, este facto causava sempre algum transtorno, não só para os profissionais de saúde que acabavam por não conseguir dar respostas às necessidades dos seus utentes ou providenciar-lhe alternativas imediatas, como também para as pessoas envolvidas que muitas vezes eram obrigadas a procurar o medicamento de que precisavam noutras farmácias ou a consultar o seu médico de família para que este lhes pudesse alterar a medicação, tornando-se mais complicado nos casos em que o mercado não dispunha de alternativas terapêuticas.

Como forma de minimizar a ocorrência destes eventos, a Farmácia Universal dispunha de um sistema de aprovisionamento que contava com cerca de cinco dos principais distribuidores a nível nacional.

III. Proximidade com outras farmácias

Apesar de dispor de uma localização privilegiada, a Farmácia Universal partilha essa localização com mais duas farmácias que se encontram bastante próximas, a Farmácia Luciano & Matos e a Farmácia Central. Considerando as farmácias como instituições privadas inseridas num setor de mercado bastante complexo cuja sustentabilidade está diretamente dependente do volume de vendas, embora os farmacêuticos devam privilegiar o dever de prestação de cuidados de saúde de qualidade sobre os interesses económicos inscrito no Artigo 10º “Deveres para com a profissão” do Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos no qual: “*1 – A primeira e principal responsabilidade do farmacêutico é para com a saúde e bem-estar do doente e do cidadão em geral, devendo pôr o bem dos indivíduos à frente dos seus interesses pessoais ou comerciais e promover o direito de acesso a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.*” a proximidade com outras farmácias causa uma certa pressão junto dos profissionais de saúde para atingirem determinadas metas de vendas que podem comprometer a qualidade dos serviços prestados [11].

Após a crise financeira na Europa e sobretudo a partir de 2007 as farmácias têm sofrido com o resultado de medidas políticas que vieram alterar não só a lei de exclusividade de propriedade das farmácias como também determinaram a redução do preço dos medicamentos resultando na diminuição das margens de lucro das farmácias. Estas medidas do governo, adicionadas às várias campanhas de utilização de medicamentos genéricos

promovidas nos últimos anos têm reduzido significativamente as margens de lucro das farmácias, tornando estas instituições bastante vulneráveis a variáveis económicas [12].

Estas medidas tiveram um profundo impacto económico e a Farmácia Universal não foi exceção. A sua proximidade com outras farmácias acentua ainda mais a sua debilidade económica e promove um ambiente de competitividade. A nível pessoal, considero que este aspeto constituiu uma ameaça ao meu estágio uma vez que nos momentos de maior afluência havia uma certa pressão sobre a equipa para acelerar o atendimento por forma a atender todas as pessoas que entravam na farmácia. Por outro lado, durante esses períodos senti uma maior dificuldade em colocar algumas questões que me surgiam à equipa.

CASOS CLÍNICOS

Caso 1 – Sintomas gripais versus constipações

Uma vez que o meu estágio decorreu durante os meses frios, era frequente chegarmos à farmácia doentes com sintomas comuns de gripe ou de constipações. Embora os sintomas se possam confundir, é importante distinguir estes dois tipos de infeções respiratórias, por forma a conseguir adequar e otimizar o tratamento a cada situação. Embora ambas as infeções sejam autolimitadas, o tratamento adequado pode aliviar o desconforto sintomático associado. Antes de apresentar os casos práticos com os quais me deparei durante o período de estágio farei uma breve introdução sobre as principais diferenças entre uma gripe e uma constipação.

Ambas as doenças resultam de uma infeção viral do trato respiratório, no entanto a constipação é uma infeção do trato respiratório superior causada por rinovírus. Embora cause sintomas semelhantes aos da gripe, por norma assumem um carácter mais leve. Os principais sintomas incluem tosse seca, dor muscular ligeira, congestão nasal, espirros, dor de garganta sem febre e os sintomas persistem normalmente durante de 2 a 4 dias.

Por outro lado, a gripe é provocada pela transmissão do vírus influenza. Os sintomas têm normalmente um início abrupto podendo perdurar entre 7 a 10 dias. Os sintomas mais comuns incluem mal-estar geral, febre elevada, tremores, dores musculares e cefaleias, tosse seca, congestão nasal [13].

Um dos casos com os quais me deparei foi o de um homem de cerca de 30 anos que se dirigiu à Farmácia Universal para solicitar o conhecido antigripal *Antigrippine trieffect*[®] por considerar que estaria com sintomas gripais. Perante esta solicitação iniciei o diálogo com o utente que referiu sintomas respiratórios de início abrupto há cerca de 2 dias que incluíam tosse seca, dor de garganta e “nariz entupido”, sem episódios de febre nem “dificuldade em engolir”. Uma vez que o doente não apresentava febre nem prostração e/ou dor de cabeça,

descartei o diagnóstico de gripe e expliquei-lhe provavelmente se trataria apenas de uma constipação. Por essa razão optei por aconselhar um tratamento focado no alívio dos sintomas que o doente tinha descrito. Por forma a evitar possíveis interações medicamentosas, ou duplicações de terapêutica, perguntei ao doente se se encontrava a tomar algum tipo de medicação e se já tinha experimentado algum produto terapêutico para alívio dos sintomas, o qual respondeu negativamente. Aproveitei também para perguntar se o doente era diabético por forma a excluir possíveis produtos que contenham açúcar na sua composição, o que não foi necessário uma vez que o doente negou sofrer de diabetes. Perante os sintomas considerei um diagnóstico de constipação. Embora esta condição não requeira tratamento farmacológico (autolimitada: 2-4 dias) é frequente os doentes procurarem produtos para alívio do desconforto associado aos sintomas da doença. Neste caso optei por recomendar 1 pastilha de *Strepsils® Tosse Associada a Constipações e Dor de Garganta* de 3 em 3 horas, para alívio dos sintomas de tosse e dor de garganta durante um período máximo de 3 dias. Adicionalmente, para alívio do sintoma de congestão nasal recomendei o produto *Vibrocil Actilong®* com efeito constritor dos vasos sanguíneos nasais (proporciona uma ação de descongestionamento nasal até 12 horas após a administração) aconselhando 1 pulverização em cada narina até 3 vezes ao dia. Para além destes produtos, aconselhei o doente realizar uma correta hidratação (aumento da ingestão de líquidos) e a inalação de vapores de água.

As infeções respiratórias são bastante comuns principalmente durante as estações frias (outono e inverno). Embora as constipações e gripes possam muitas vezes ser confundidas pela população em geral, os profissionais de saúde devem procurar estabelecer o diagnóstico diferencial, bem como providenciar o melhor aconselhamento em cada situação. Apesar de, na sua grande maioria ser autolimitada, consoante a virulência da estirpe circulante em cada ano a gripe pode representar um risco acrescido para a população, principalmente se considerarmos pessoas mais vulneráveis como idosos, crianças ou indivíduos com problemas respiratórios, grávidas ou imunodeprimidos. É importante informar a população da importância da vacinação anual contra a gripe. Assim, a Direção-Geral de Saúde recomenda a vacinação a todas as pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, doentes crónicos e imunodeprimidos, com 6 ou mais meses de idade, grávidas, profissionais de saúde e outros prestadores de cuidados [14].

Caso 2 – Manejo da tosse em crianças pequenas

A tosse é provavelmente o sintoma mais frequente na criança e é considerada um mecanismo de defesa do organismo pois elimina secreções e material estranho aspirado pela criança podendo também resultar de uma resposta inflamatória (infeções ou alergias), por essa

razão é também um dos principais fatores que levam os progenitores a procurar aconselhamento clínico. As infecções virais agudas do aparelho respiratório ocupam o topo da tabela de possíveis causas para a tosse em pediatria, no entanto outras causas não podem ser excluídas à partida, nomeadamente situações de asma. Durante o manejo da tosse em crianças é importante ter em consideração que estas não são “mini adultos”, e como tal a tosse na criança é diferente da do adulto, por essa razão esta população requer especial atenção, e a sua abordagem terapêutica requer uma avaliação com base em diretrizes específicas que devem ser adequadas a cada caso [15].

Durante o estágio fui confrontada com o caso de uma mulher de cerca de 35 anos que se dirigiu à farmácia com o intuito de adquirir um xarope para alívio da tosse do seu filho, um menino de 3 anos de idade. Durante o diálogo com a utente, esta referiu a presença de uma tosse húmida de início à pouco mais de uma semana. Referiu ainda que o seu surgimento coincidiu com o aparecimento de outros sintomas como “pingo no nariz” e febre baixa, sintomas que encarou como resultado de uma constipação e que melhoraram ao fim poucos dias refere, no entanto, que a tosse não registou abrandamento. Apesar de referir a ausência de febre, ou de dificuldades respiratórias na criança, resolveu procurar aconselhamento farmacêutico por considerar que a tosse comportava um desconforto considerável para a criança pequena, o qual procurava desta forma aliviar.

Uma vez que não existe evidência do benefício da utilização da maioria dos MNSRM (ex.: antitússicos, anti-histamínicos, descongestionantes) comparativamente ao placebo no tratamento da tosse aguda associada a constipações em crianças pequenas, a sua utilização é desencorajada em crianças de idade inferior a 2 anos de idade [16]. Existem, no entanto, alguns medicamentos no mercado que podem ser aconselhados de forma segura e permitem o alívio da tosse. São exemplos disso produtos à base de mel, que constituem uma opção terapêutica natural e segura em crianças com mais de 2 anos de idade [17].

Nesta situação em particular optei por aconselhar a administração de 5 ml (1 colher doseadora) do xarope Grintuss Pediatric® 3 vezes ao dia. Este produto é um dispositivo médico para uso pediátrico a partir de um ano de idade. Contém na sua composição mel e complexos moleculares de grindélia, tanchagem e helicriso que atuam no alívio da tosse promovendo uma ação calmante e protetora da mucosa [18]. Aproveitei o momento para informar a senhora da importância de promover algumas medidas não farmacológicas como a adequada hidratação das mucosas com recurso a ingestão de bebidas quentes e/ou inalações de vapores, ou evitar ambientes que contenham poeiras ou fumos que possam provocar uma irritação adicional da mucosa. Por último adverti a progenitora para a importância de contactar o médico pediatra caso não observe uma melhoria dos sintomas, uma vez que pode ser

necessário reavaliar a etiologia da tosse através da realização de alguns exames complementares de diagnóstico como raio-X ao tórax, ou testes de despiste de asma.

Caso 3 – Tratamento da obstipação (prisão de ventre)

A obstipação é uma disfunção do trânsito intestinal relativamente comum e é caracterizada por dificuldade de evacuação, evacuação incompleta ou pouco frequente (1 evacuação a cada 3-4 dias ou menos). Esta patologia pode ter várias origens como alterações na dieta ou estilo de vida, RAMs ou doenças causadoras de obstrução intestinal (ex.: cancro colorretal, diverticulose, etc) [19].

Uma jovem de 23 anos, dirigiu-se à farmácia com queixas de prisão de ventre com duração de 2-3 dias, referindo ainda sensação de inchaço e desconforto abdominal. Mencionou um estilo de vida sedentário com alteração da dieta nos últimos dias para alimentos ricos em gordura, nomeadamente *fast-food*. A utente não se apresentava a realizar qualquer tipo de medicação.

Uma vez que se tratava de uma situação pontual, associei a ocorrência ao estilo de vida da utente associado à alteração nos padrões alimentares. Recomendei-lhe a alteração da dieta para produtos com elevado teor de fibras (ex.: leguminosas, frutas, hortícolas, cereais, etc) acompanhada do aumento de ingestão de líquidos, nomeadamente água. Paralelamente reforcei a importância de contrariar o estilo de vida sedentário, e o benefício da prática de exercício físico para a ativação do trânsito intestinal, associada à promoção de hábitos defecatórios. Como medida farmacológica aconselhei a toma de um comprimido de Advancis® Easylax ao deitar com água. Este produto é um suplemento alimentar de origem natural (extratos de plantas, fibras, frutos e organismos probióticos) com propriedades laxativas e que promovem a regulação do trânsito intestinal [20]. Por fim, reforcei a importância de, como forma de evitar episódios futuros, prolongar as medidas não farmacológicas enumeradas anteriormente e de evitar a ingestão de produtos promotores de obstipação e de desenvolver hábitos defecatórios.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio na Farmácia Universal, proporcionou-me não só a aplicação e consolidação dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso, como também a aquisição de novas ferramentas de trabalho valiosas que vou certamente transportar comigo para desafios futuros.

Embora ao longo do curso nos seja transmitido o valor da intervenção farmacêutica junto da comunidade, sinto que só compreendi verdadeiramente a sua essência após contactar diariamente com as pessoas que nos chegavam à farmácia.

Uma vez que a Farmácia Universal se encontra situada numa das ruas mais movimentadas de Coimbra, é por isso muito frequentada não só pela população local, como também por pela população estudantil ou de turistas. Esse facto levou-me a contactar, ao longo do meu estágio, com uma população com características bastante heterogéneas, embora a sua grande maioria fosse constituída por população idosa (>65 anos).

Considerando os idosos como a população que acumula maior número de patologias crónicas, é expectável que sejam também estes os principais consumidores de produtos/serviços de saúde. Algumas pessoas pertencentes a esta população vivem bastante isoladas, com dificuldades económicas e/ou com dificuldade de acesso ao SNS tendo, por isso, o farmacêutico comunitário como profissional de saúde de referência.

O farmacêutico comunitário reúne as competências e conhecimentos necessários para detetar não só potenciais carências terapêuticas como também, erros de prescrição, erros de administração, interações com medicamentos/alimentos ou RAMs, assumindo um papel preponderante na otimização da terapêutica. Por ser uma faixa etária bastante complexa, a população idosa em particular lançou-me muitos desafios ao longo do estágio, no entanto considero que este aspeto se revelou uma oportunidade para desafiar os meus conhecimentos e abordagem, ao mesmo tempo que me proporcionou uma aprendizagem contínua.

Termino com um agradecimento especial a toda a equipa da Farmácia Universal pelo contributo que prestaram à minha formação e por fazerem do seu profissionalismo, simpatia e amizade uma inspiração para mim.

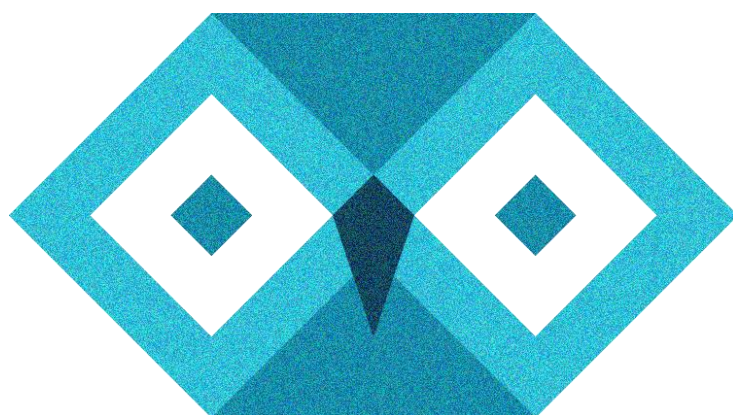
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Museu da Farmácia - **Idade Média - O aparecimento do Boticário em Portugal**. [Acedido a: 2018/08/19]. Disponível em: <https://www.museudafarmacia.pt/detalhe.aspx?area=storymap&f=119&bid=83>
- [2] Ordem dos Farmacêuticos - **Valor do Farmacêutico**. [Acedido a: 2018/08/18]. Disponível a: <http://www.valordofarmaceutico.com/>
- [3] Ordem dos Farmacêuticos - **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a: 2018/08/18]. Disponível a: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
- [4] Assembleia da República - **Lei n.º 11/2012 de 8 de março**. Diário da Republica, 1.ª série. n.º 49 (2012) 978-979. Disponível em: <https://dre.pt/application/dir/pdf/sdip/2012/03/04900/0097800979.pdf>
- [5] Gabinete de Imprensa do Infarmed - **Nota de Imprensa - Prescrição por DCI**. Infarmed, (2012) Disponível em: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1122117/8668118.PDF/a1bae77c-f8d1-4eac-99a9-0cf89a578f00?version=1.0>
- [6] Gabinete do Secretário de Estado da Saúde - **Despacho n.º 2935-B/2016**. Diário da República, n.º 39/2016, 1º suplemento (2016) 6702-(2), 6702-(3). Disponível em: <https://dre.pt/application/file/73726006>
- [7] Ministério da Saúde - **Portaria n.º 224/2015**. Diário da República, n.º 144/2015 (2015) 5037-5040. Disponível em: <https://dre.pt/application/conteudo/69879391>
- [8] Infarmed - **Medicamentos manipulados**. [Acedido a: 2018/08/18]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/inspecao/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
- [9] AcF - **Acompanhamento Farmacoterapêutico**. [Acedido a: 2018/08/19]. Disponível em: <http://ac-ft.pt/servicos/>
- [10] Barros, Tatiana Ferrara - **Merchandising e layout para farmácias e drogarias: impulsionando as vendas**. 1ª edição. Contento, 2015. [Acedido a: 2018/08/20]. Disponível em: http://www.contento.com.br/news/Contento/Loja_Virtual/Amostra/merchandising-amostra.pdf.
- [11] Ordem dos Farmacêuticos - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos** (2001) Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf
- [12] Aguiar, António Pedro de Figueiredo Hipólito de; Martins, Luís Manuel; Marques, Francisco Batel - **Pharmacies and the Economic Crisis in Portugal: A Case-Study**. *International Journal of Health Sciences*. Vol. vol. 3. n.º no. 2 (2015). p. pp.43-47. [Acedido a: 2018/08/19]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15640/ijhs.v3n2a7>. ISSN: 2372-5060 (Print), 2372-5079 (Online)
- [13] GlaxoSmithKline - **Qual a Diferença entre Gripe e Constipação?** [Acedido a: 15/08/2018]. Disponível em: <https://www.panadol.pt/sintomas/gripe-constipacao/diferenca.html>
- [14] Direção-Geral de Saúde - **Vacinação contra a gripe. Época 2017/2018**. Serviço Nacional de Saúde, n.º 018/2017 (2017) 1-6. Disponível em: <file:///C:/Users/dlsgl/Downloads/i023988.pdf>
- [15] Martins, Susana; de Moura, Marta Carneiro; Neves, Ana Margarida; Trindade, José Costa - **Tosse em pediatria**. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. Vol. 14. n.º 4 (2008). p. 517-526. Disponível em:

- <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215915302567>>. ISSN: 0873-2159
- [16] Shields, M. D.; Bush, A.; Everard, M. L.; McKenzie, S.; Primhak, R. - **Recommendations for the assessment and management of cough in children**. *Thorax*. Vol. 63. n.º Suppl 3 (2008). p. iii. Disponível em: <http://thorax.bmj.com/content/63/Suppl_3/iii1.abstract>.
- [17] Alsubaie, Haya; Al-Shamrani, Abdullah; Alharbi, Adel S.; Alhaider, Sami - **Clinical practice guidelines: Approach to cough in children: The official statement endorsed by the Saudi Pediatric Pulmonology Association (SPPA)**. *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine*. Vol. 2. n.º 1 (2015). p. 38-43. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352646715000344>>. ISSN: 2352-6467
- [18] Aboca - **Grintuss Pediatric Xarope**. [Acedido a: 16/08/2018]. Disponível em: <http://grintuss.pt/grintuss/grintuss-pediatric-xarope/>
- [19] World Gastroenterology Organisation - **Constipation: a global perspective**. (2010) 1-13. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/constipation-english-2010.pdf>
- [20] Advancis - **Advancis EasyLax**. [Acedido a: 2018/08/20]. Disponível em: <https://www.advancispharma.com/pt/sistema-digestivo/advancis-easylax/>

PARTE II

Relatório de Estágio OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.



Assuntos Regulamentares Farmacovigilância e Garantia de Qualidade



LISTA DE ABREVIATURAS

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
CTD	<i>Common Technical Document</i>
EME	Estados Membros Envolvidos
ERA	<i>Environmental Risk Assessment</i>
FI	Folheto Informativo
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
IPN	Instituto Pedro Nunes
MedDRA	<i>Medial Dictionary for Regulatory Activities</i>
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PSUR	<i>Periodic Safety Update Report</i>
QRD	<i>Quality Review of Documents</i>
RAM	Reações Adversas a Medicamentos
RCM	Resumo das Características do Medicamento
SMUH-ALTER	Sistema de gestão de Medicamentos de Uso Humano – submissão electrónica de pedidos de alteração aos termos de AIM
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
EU	<i>European Union</i>
XEVMPD	<i>Extended EudraVigilance medicinal product dictionary</i>

NOTA INTRODUTÓRIA

Contrariamente ao que se verificava anteriormente, em que o farmacêutico se encontrava restringido à Farmácia de Oficina ou à Farmácia Hospitalar, nos dias de hoje, muito graças ao alargamento do plano curricular, o ato farmacêutico tornou-se bastante abrangente com importante intervenção em valências como farmácia de oficina e hospitalar, indústria farmacêutica, química e alimentar, análises clínicas, assuntos regulamentares relacionados com o medicamento e produtos de saúde, bem como outras ligadas ao doentes, medicamento e saúde pública [1].

Como forma de acompanhar o progresso da profissão, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, considerada uma instituição na vanguarda do ensino farmacêutico em Portugal, tem-se destacado não apenas pelo seu plano curricular bastante abrangente como também pelo facto de proporcionar aos seus alunos finalistas a oportunidade de realizarem estágio curricular opcional em outras áreas de intervenção para além do habitual estágio em Farmácia Comunitária. Assim os alunos podem optar por realizar um estágio adicional numa outra área de interesse, como por exemplo na Produção, Controlo de Qualidade, Garantia de Qualidade, Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância ou Farmácia Hospitalar.

Após reflexão e, perante a oportunidade proporcionada pela FFUC percebi que as áreas que me despertavam interesse e nas quais gostaria de realizar estágio curricular incluíam a área da Indústria Farmacêutica e Assuntos Regulamentares. Por essa razão, quando surgiu a possibilidade de estagiar na consultora farmacêutica Owlpharma – Consulting, LDA. sediada em Coimbra, aceitei a oportunidade de imediato.

OWLPHARMA – CONSULTING, LDA.

A OWLPHARMA – CONSULTING, LDA. é uma empresa de consultoria direcionada para o sector farmacêutico com atividade nos ramos dos Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância e Garantia de Qualidade. Presta serviços especializados essencialmente relacionados com medicamentos de uso humano, dispositivos médicos, suplementos alimentares e cosméticos, ao longo de todo o seu ciclo de vida, em articulação com autoridades competentes a nível nacional e internacional e em conformidade com a legislação aplicável [2].

Embora relativamente recente, a Owlpharma primou desde cedo pelo seu carácter inovador, apresentando uma evolução notável ao longo dos últimos 5 anos. Fundada a 20 de setembro de 2013, originalmente com o nome BLUEOWL – Consulting, LDA, contou com o apoio inicial da Incubadora de Empresas do Instituto Pedro Nunes (IPN), uma instituição de direito privado sem fins lucrativos sediada em Coimbra, cujo objetivo é apoiar o

desenvolvimento de ideias e empresas inovadoras e/ou de base tecnológica e de serviços avançados. Em 2014 viu a sua denominação alterada para o que viria a ser a atualmente conhecida OWLPHARMA – CONSULTING, LDA. Atualmente a Owlpharma conta com uma equipa jovem e dinâmica de catorze colaboradores distribuídos pelas diferentes áreas de intervenção apoiados por uma alargada rede de peritos subcontratados [3].

ANÁLISE SWOT

O estágio na Owlpharma – Consulting, LDA. contou com a orientação do Dr. César Gonçalves e teve a duração de três meses realizando-se durante o período de 14 de maio a 14 de agosto. As atividades desenvolvidas durante este período são descritas no presente relatório de estágio sob a forma de uma análise SWOT (do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*).



Pontos Fortes

I. Acolhimento na Owlpharma

O acolhimento dos estagiários na empresa revelou-se como um dos pontos fortes desde o início. No primeiro dia de estágio fui recebida pelo meu orientador, o Dr. César Gonçalves, que prontamente me apresentou a toda a equipa, disponibilizou todas as ferramentas de trabalho necessárias e colocou à vontade para colocar qualquer questão. Por se tratar de uma empresa pequena foi possível a convivência com todos os colaboradores que

integravam aquela unidade não só durante o período laboral como também durante os momentos de pausa que tínhamos ao longo do dia, mostrando-se todos bastante recetivos à nossa presença e à transmissão dos seus conhecimentos.

II. Equipa de colaboradores

Durante o meu estágio pude testemunhar a união e bom ambiente que descrevem a equipa. Por se tratar de uma equipa jovem, dinâmica e bastante bem organizada, conseguiram introduzir-nos rapidamente na sua dinâmica de trabalho, colocando-nos à vontade para colocar questões e fazer sugestões sem qualquer constrangimento. Ao mesmo tempo, o facto de não fazerem grande distinção entre estagiários, colocava em nós um pouco mais de responsabilidade, o que se revelou essencial para a nossa evolução ao longo do estágio.

III. Plano de formações Internas

Este plano contemplou sessões de formação iniciais, que visaram promover um enquadramento base em algumas das suas principais áreas de intervenção da Owlpharma. Estas formações decorreram essencialmente durante uma fase inicial do estágio ou sempre que se revelavam necessárias para a execução de uma nova tarefa.

Nas semanas iniciais recebemos uma formação interna de Assunto Regulamentares com a Dr.^a Ana Andrade, que permitiu não só consolidar alguns dos conhecimentos aprendidos na unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento, mas também contactar diretamente com um CTD (*Common Technical Document*), uma vez que após a formação nos foi solicitado que aplicássemos a informação disponibilizada durante a formação através do apoio na consolidação de um dossier (em formato CTD) de um medicamento de um cliente. Adicionalmente, na sequência de um pedido de um cliente para realização de um Teste de Legibilidade a um folheto informativo de um medicamento, a Dr.^a Lígia Ferreira deu-nos formação que permitiu a aquisição de competências necessárias para a execução dessa tarefa que posteriormente nos foi delegada. Embora o volume de trabalho não tenha permitido a realização de mais formações inicialmente previstas, foi-nos disponibilizado material de leitura adicional, nomeadamente relativamente à Farmacovigilância e Publicidade de Medicamentos junto do público e junto dos profissionais de saúde.

Neste contexto, o comprometimento e dedicação dos colaboradores da Owlpharma foram essenciais para a aquisição de novas competências essenciais para a realização das mais variadas tarefas ao longo do estágio.

IV. Amplo espectro de tarefas realizadas

Visto que a Owlpharma desempenha tarefas em várias áreas, nomeadamente em Assuntos Regulamentares, Farmacovigilância e Garantia de Qualidade, ao longo do meu estágio tive oportunidade de desempenhar tarefas de âmbito farmacêutico muito variadas sob a supervisão dos vários colaboradores de cada área.

Dentro da área de Assuntos Regulamentares pude colaborar na realização de tarefas como a preparação e gestão de pedidos de submissão e de alteração de autorização de introdução no mercado (AIM) através da plataforma online do INFARMED (SMUH-ALTER), a introdução de dados dos produtos na plataforma do EudraVigilance via XEVMPD, a preparação e revisão de dossiers de AIM e conversão de dossiers de AIM em formato CTD, a revisão de peças publicitárias, a elaboração de relatórios de avaliação do risco ambiental do medicamento (ERA), a elaboração e revisão de resumo das características do medicamento (RCM), folheto informativo (FI) e rotulagem de medicamentos segundo o formato QRD (Quality Review of Documents) e também na realização de Testes de Legibilidade.

Na área de Farmacovigilância colaborei na realização de pesquisa nacional e internacional de reações adversas a medicamentos (RAM) na literatura com periodicidade semanal e mensal, tradução e resumo de artigos de relatos de casos de RAM com recursos a termos MedDRA (*Medical Dictionary for Regulatory Activities*) e colaborei na realização de relatórios periódicos de segurança (PSUR).

Para além destas funções desempenhei ainda outras atividades como pesquisa de suporte para alegações de produtos cosméticos, revisão de *graphic artworks* e colaboração na resposta a pedidos de elementos enviados pelos estados membros envolvidos (EME) durante um procedimento de pedido de AIM por reconhecimento mútuo.

Considero a variedade de tarefas nas quais estive envolvida como sendo um dos principais pontos fortes do estágio numa empresa de consultoria farmacêutica.

V. Desenvolvimento de Competências

Para além dos conhecimentos científicos que adquiri e que contribuíram para a consolidação da minha aprendizagem académica, este estágio possibilitou-me ainda desenvolver outras competências que considero essenciais para a minha vida futura, nomeadamente competências linguísticas, informáticas e bibliográficas. No que concerne às aptidões linguísticas, nomeadamente no que toca à língua inglesa, embora possua uma boa compreensão oral e escrita, o facto de não ser uma língua que utilize diariamente e também de as áreas de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância possuírem vocabulário técnico-científico específico, lançaram inicialmente alguns desafios que foram sendo gradualmente

ultrapassados. Relativamente às minhas competências informáticas, durante o estágio pude empregar novas funcionalidades do Microsoft Word®, e também do Acrobat Reader DC®. Para além disso, contactei com plataformas totalmente novas para mim como a SMUH-ALTER do INFARMED e o XEVMPD do EudraVigilance. Paralelamente desenvolvi métodos de pesquisa bibliográfica essencialmente em bases de dados como a PubMed® e revistas médicas nacionais e compreendi o funcionamento do programa de gestão de bibliografia ZOTERO®.

VI. Autonomia e reconhecimento

Embora o nosso trabalho fosse sempre revisto por um colaborador da Owlpharma, senti sempre um elevado grau de autonomia e responsabilidade durante a execução das tarefas que me foram sendo delegadas ao longo do estágio, fator que me motivou a aperfeiçoar o meu trabalho. Adicionalmente, este aspeto permitiu o desenvolvimento das minhas capacidades de organização e articulação de prazos, uma vez que por vezes me eram delegadas várias tarefas pelos diferentes colaboradores e éramos obrigadas a priorizar trabalho. Por outro lado, realço o esforço da equipa em geral e dos nossos orientadores em particular em nos transmitirem o feedback relativamente ao trabalho que íamos desempenhando, o que me permitiu não só evoluir e colmatar possíveis incongruências detetadas durante a execução das tarefas como também demonstrou o seu reconhecimento pelo nosso trabalho e serviu como fator motivacional.

Pontos Fracos

I. Volume de trabalho incerto

Visto que a Owlpharma é uma consultora farmacêutica, o volume de trabalho está sujeito a grandes flutuações ao longo do ano, uma vez que este está dependente de pedido/contacto do cliente. Por outro lado, muitas das vezes, embora existisse trabalho pendente, este não podia ser delegado aos estagiários por estes não possuírem as competências necessárias para o realizar. Por essa razão, durante o estágio pude sentir essas oscilações, havendo dias onde o volume de trabalho que nos era delegado era muito reduzido enquanto que, noutros dias nos eram transmitidas várias tarefas em simultâneo. Considero o volume de trabalho incerto um ponto fraco uma vez que, principalmente numa fase inicial do estágio, passávamos algum tempo sem que nos fosse dada qualquer tarefa e como tal acabávamos por não aproveitar esse tempo na empresa.

II. Formação em Farmacovigilância e Publicidade de Medicamentos

Contrariamente ao que se tem verificado em anos anteriores e embora tenhamos contado com algumas formações internas (referidas anteriormente), durante o tempo de estágio não contamos com formações que considero essenciais, nomeadamente no âmbito da Farmacovigilância, uma das principais áreas de atuação da Owlpharma, e Publicidade de Medicamentos. Em vez disso foi-nos disponibilizada informação científica e legislativa sobre os temas e transmitido algum conhecimento à medida que nos eram delegadas as tarefas. Considero este aspeto com um ponto fraco do nosso estágio, uma vez que o conhecimento adquirido ao longo do curso sobre estes temas se cinge a duas unidades curriculares: Farmacovigilância e Farmacoepidemiologia e Deontologia e Legislação Farmacêutica respetivamente sendo bastante superficial e, como tal esta formação inicial seria importante no desempenho das atividades futuras.

III. Falta de feedback inicial

Embora tentássemos realizar o trabalho que nos era delegado de acordo com as indicações que nos eram providenciadas pelos elementos da Owlpharma, o facto de muitas das tarefas serem para nós uma novidade, e de por vezes, devido ao volume de trabalho, os colaboradores não nos conseguirem transmitir o feedback do trabalho realizado por nós bem como o resultado final enviado ao cliente, por vezes tornava-se difícil para nós ir de encontro às expectativas dos mesmos. Este aspeto criou em mim, a princípio algumas incertezas em relação à qualidade do trabalho que realizava. Com o tempo e, como forma de atenuar esse ponto negativo, optei por questionar os membros da empresa sempre que realizava um trabalho pela primeira vez e me sentia insegura em relação ao resultado final. No entanto considero este ponto fraco como um fator limitante à minha evolução e aprendizagem.

Oportunidades

I. Realização de estágio em Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância

Para além dos estágios obrigatórios em Farmácia Comunitária ou em Farmácia Hospitalar discriminados na Directiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013 (Artº 44º, nº 2), o facto de a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra nos permitir a realização de estágios em diferentes áreas de intervenção do farmacêutico como na Indústria Farmacêutica, ou em entidades como o INFARMED ou a Ordem dos Farmacêuticos constitui uma oportunidade não só de contactar com possíveis áreas de emprego novas, como também de enriquecer e desafiar os nossos conhecimentos

científicos. Enveredei pela área de Assuntos Regulamentares e Farmacovigilância (na Owlpharma), uma vez que do contacto que tive com a área ao longo do curso, sempre me interessei pela mesma. Devido á diversidade de tarefas realizadas, este estágio permitiu-me não só consolidar muito do conhecimento que tinha adquirido durante o período letivo como também alargar horizontes, o que me levou a considerar esta área como uma potencial saída profissional no futuro [4].

II. Conhecimento do mercado farmacêutico

A Owlpharma é consultora farmacêutica de intervenção não só a nível nacional como também a nível internacional, por isso, serve diariamente de intermediário/contacto local entre empresas do setor da Indústria Farmacêutica e as autoridades regulamentares nacionais e internacionais. Este estágio permitiu me compreender as várias etapas do ciclo de vida do medicamento e as exigências regulamentares das autoridades competentes que mesmo dentro da UE, por vezes podem divergir entre si, tornando particularmente desafiador para a Indústria ir de encontro a essas exigências. A Owlpharma tem como principal missão ir de encontro às necessidades dos seus clientes encurtando distâncias entre estes e as autoridades regulamentares locais. Assim, durante o estágio pude participar em algumas das principais fases da comercialização de medicamentos. Pude colaborar na preparação de dossiers e submissões de pedidos de AIM a nível local e internacional (pedido de reconhecimento mútuo), bem como apoiar a equipa na resposta a algumas questões colocadas pelos EME. Adicionalmente pude realizar a revisão de RCMs, FI e Rotulagem, participar na elaborar alterações de AIM, proceder a pesquisa de informação de segurança e eficácia adicional durante o período de pós-comercialização, distinguir entre material informativo e de carácter publicitário entre outros, o que me permitiu compreender um pouco melhor a dinâmica de mercado onde se insere o medicamento e produtos de saúde.

III. Empresa em expansão

A Owlpharma, sendo uma empresa jovem, tem crescido bastante nos últimos anos, um indicativo da qualidade do trabalho produzido evidenciada pelo volume crescente de trabalho e de clientes que cada vez mais confiam os seus produtos à Owlpharma. A empresa tem optado por aumentar o número de colaboradores de ano para ano e, se as previsões de crescimento se mantiverem é expectável que nos próximos anos este número continue a aumentar. Considero que isto pode constituir uma potencial oportunidade de continuar a trabalhar nesta área e a aprender com a empresa no futuro.

I. Plano curricular

Um dos aspetos que considero como uma ameaça ao estágio na Owlpharma é facto de o plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), embora bastante diversificado e abrangente, se torne excessivamente superficial em algumas das principais áreas de intervenção da Owlpharma, contando com uma única unidade curricular semestral de Assuntos Regulamentares do Medicamento e uma unidade curricular semestral resultante da fusão da área de Farmacovigilância com Farmacoepidemiologia. Tanto a área de Farmacovigilância como de Assuntos Regulamentares são bastante complexas e, como tal, muita informação essencial a quem quer enveredar por estas áreas acaba por ser um pouco negligenciada ao longo do mestrado integrado. Desta forma, muita da formação básica acaba por ter de ser providenciada pela própria empresa.

II. Exigências acrescida associada à realização de estágio opcional

Uma vez que, este estágio assume um carácter opcional, foi necessário um esforço adicional para o conciliar com o estágio em farmácia comunitária e com a elaboração da monografia/relatórios de final de curso. Assim, de forma a conseguir conciliar os dois estágios vi-me forçada a realizar mais horas do que as 8 horas diárias, bem como a comprometer alguns fins-de-semana com a minha família. A carga horária elevada durante esse período atrasou o desenvolvimento da monografia de final de curso, a qual só consegui terminar durante o estágio na Owlpharma. O meu estágio na Owlpharma iniciou-se assim em maio, tendo se prolongado até a agosto. Desta forma considero que a difícil articulação entre os dois estágios constituiu uma ameaça ao longo do estágio na Owlpharma.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular em assuntos regulamentares e farmacovigilância transformou-se numa experiência bastante enriquecedora, não só a nível académico e profissional como também a nível pessoal, na medida em que me permitiu estabelecer contacto com o mundo empresarial, desenvolver metodologias de trabalho e aplicar conhecimentos técnico-científicos que adquiri ao longo dos cinco anos de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Por outro lado, permitiu o contacto com uma área de atuação farmacêutica diferente e diversificada e a aquisição de uma visão global das atividades desenvolvidas por uma consultora farmacêutica.

Resta-me agradecer à Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra a oportunidade proporcionada, bem como a toda a equipa da Owlpharma de desde o primeiro momento me acolheu com uma enorme receptividade e profissionalismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Universidade de Coimbra - **Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**. [Acedido a: 19, August 2018]. Disponível em: <https://apps.uc.pt/courses/PT/course/1172>
- [2] Owlpharma – Consulting, Lda. - **Sobre nós**. [Acedido a: 2018/08/17]. Disponível em: <http://www.owlpharma.pt/sobre-nos/?lang=pt-pt>
- [3] Raciús - **Owlpharma - Consulting, Lda**. [Acedido a: 2018/08/17]. Disponível em: <https://www.racius.com/owlpharma-consulting-lda/>
- [4] Parlamento Europeu - **Directiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2013**. Jornal Oficial da União Europeia (2013) 354/132-354/170. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0055&from=EN>

PART III

Monograph

METAL-BASED NANOPARTICLES AS ANTIMICROBIAL AGENTS



**An overview on its an overview of its characteristics, toxicity
and environmental risk**



RESUMO

As nanopartículas metálicas têm sido extensamente investigadas nas últimas décadas. Para além do seu tamanho reduzido e relativa seletividade para as células bacterianas, as nanopartículas metálicas revelaram-se bastante eficazes inclusive contra patógenos abrangidos pela PPL (divulgada pela OMS). São várias as nanopartículas metálicas com atividade antibacteriana. Nesta revisão selecionamos quatro das principais nanopartículas metálicas investigadas pelas suas propriedades antibacterianas, que incluíram AgNPs, CuONPs, AuNPs e ZnONPs. De entre estas, as AgNPs foram as que apresentaram menor CMI (concentração mínima inibitória), no entanto a sua toxicidade para os humanos levantou questões sobre a sua utilização. Contrariamente, as AuNPs, como são constituídas por um material relativamente inerte, não apresentaram efeitos adversos significativos embora apresentem uma CMI consideravelmente superior. Paralelamente à sua atividade antibacteriana, ao longo deste artigo aproveitámos para realizar uma revisão dos efeitos adversos reportados na literatura, bem como uma breve avaliação do risco ambiental associados à administração destes agentes.

Palavras-chave: Bactérias, atividade antibacteriana, nanopartículas metálicas, AgNPs, CuONPs, AuNPs e ZnONPs

ABSTRACT

Metal nanoparticles have been extensively investigated in recent decades. In addition to their reduced size and relative selectivity for bacterial cells, metal-based nanoparticles have also proved to be quite effective even against pathogens covered by the PPL (published by the WHO). There are several metal-based nanoparticles with antibacterial activity. In this review we selected four of the major metal nanoparticles investigated for their antimicrobial activities that included AgNPs, CuONPs, AuNPs and ZnONPs. Among these, AgNPs presented lower MIC (minimum inhibitory concentration), however its toxicity to humans raised questions about its use. In contrast, AuNPs, as they are composed of a relatively inert material, did not present significant adverse effects although they present a considerably higher MIC. Parallel to its antibacterial activity, throughout this article we took the opportunity to do a review about the adverse effects reported in the literature, as well as a brief evaluation of the environmental risk associated with the administration of these agents.

Key-words: Bacteria, antibacterial activity, metal-based nanoparticles, AgNPs, CuONPs, AuNPs and ZnONPs

List of abbreviations and acronyms

<i>ADME</i>	Absorption, distribution, metabolism and excretion
<i>AFM</i>	Atomic force microscopy
<i>AgNPs</i>	Silver nanoparticles
<i>ALT</i>	Alanine aminotransferase
<i>AST</i>	Aspartate transaminase
<i>AuNPs</i>	Gold nanoparticles
<i>CAGR</i>	Compound annual growth rate
<i>CNS</i>	Central nervous system
<i>CuONPs</i>	Copper oxide nanoparticles
<i>DLS</i>	Dynamic light scattering
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic acid
<i>EDL</i>	Electric double layer
<i>EDX</i>	Energy-dispersive X-ray
<i>FDA</i>	Food and Drugs Administration
<i>FESEM</i>	Field emission scanning electron microscopy
<i>FTIR</i>	Fourier transform infrared spectroscopy
<i>GGT</i>	Gamaglutamiltranspeptidase
<i>GSH</i>	Glutathione
<i>IMI</i>	Innovative Medicines Initiative
<i>I.V.</i>	Intravenous
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharide
<i>MIC</i>	Minimum inhibitory concentration
<i>MRSA</i>	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>NAG</i>	N-acetylglucosamine
<i>NAM</i>	N-acetylmuramic acid
<i>PBPK</i>	Physiologically Based Pharmacokinetic Models
<i>PPL</i>	Priority Pathogens List
<i>RBC</i>	Red blood cells

<i>ROS</i>	Reactive oxygen species
<i>R&D</i>	Research and Development
<i>SEM</i>	Scanning electron microscopy
<i>TEM</i>	Transmission electron microscopy
<i>tRNA</i>	Transfer ribonucleic acid
<i>USD</i>	United States dollar
<i>UV-Vis</i>	Ultraviolet-Visible
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>XRD</i>	X-ray diffractometry
<i>ZnONPs</i>	Zinc oxide nanoparticles

Introduction

Bacteria have inhabited Earth for billions of years. They are highly adaptable organisms, and only during the period of coexistence with Humans, were responsible for the emergence of many of the major pandemics that afflicted humanity. For this reason, the discovery of antibiotics was considered one of the most significant medical achievements of the 20th century [1]. It began with the discovery of Salvarsan (one of the first medicines capable of curing an infectious disease – syphilis – without being toxic to the patient) in 1907, but it was only with the accidental discovery of penicillin, in 1928, by Alexander Fleming, that a flurry of discovery of new antibiotics have initiated, reaching its peak in the 1950s and 1960s, period that became known as the "golden age" [1]. More than 20 new classes of antibiotics were produced between 1930 and 1962 but with the emergence of new resistant bacteria, discovery of new molecules with antibacterial activity has become more challenging for the Pharmaceutical Industry which slowed its development [2, 3]. Since the “golden age”, only three new classes of antibiotics active against gram-positive bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were discovered and approved: oxazolidinones (linezolid in 2001 and tedizolid in 2014), daptomycin in 2006 (a cyclic lipopeptide) and fidaxomicin in 2011 (a macrocycle drug for *C. difficile*) although numerous analogues of existing classes and antibiotic combinations have reached the market [2, 4].

Despite the tendency for increased need of new antibiotics, global disincentives to the use of antibiotics, especially the launching of new and more expensive ones (which are normally used as last therapeutic option), significantly reduced the sales volume when compared to other drugs, such as those used in chronic diseases [5]. Additionally, it is extremely expensive to discover new antibiotics active against resistant bacteria, an investment is hardly recovered with the low prices practiced [6]. In fact, in recent years, the number of companies involved in the research of new antibiotics has decreased from 25 in 1980 to less than half, with GlaxoSmithKline, Johnson & Johnson, Merck & Co., Pfizer among others, while other large pharmaceutical companies have redirected their resources to the development of drugs for chronic diseases and other areas, such as cancer, where the market share is higher and drugs can be marketed at higher prices [4, 6].

In an attempt to reverse this scenario, in recent years international authorities in various countries have sought to address multi-resistant infection management measures and to promote research and development (R&D) of new therapeutic agents. In February 2017, World Health Organization (WHO) published a Global Priority Pathogens List (PPL) that included bacteria considered to be of greatest concern to public health and for which there is

an urgent need for new therapeutic alternatives. The main objective of this guideline was to guide and help researchers to prioritize the R&D of new antibiotics [7]. This report established Gram-negative bacteria as the most critical pathogens for antibiotic R&D, as a consequence of worldwide emergence of strains that cannot be treated with any of the antibiotics currently on the market [1]. In March 2018, DRIVE-AB, a project consisting of 15 public partners and 7 private partners responsible for setting guidelines for the rational use of antibiotics, funded by the Innovative Medicines Initiative (IMI), published a report setting out four incentives considered most effective in stimulating the pipeline of antibiotics. Grants (for R&D in academic institutions, companies and others), and the pipeline coordinator (governmental or non-profit organizations that track the antibiotic pipeline, identify gaps and actively support R&D projects) are intended to stimulate the early stages of developing and support research groups during the early stages of development. After the development phase is completed, market entry rewards aim to make the antibiotic market more appealing for investment by giving the companies a reward of e.g. \$1 billion per new antibiotic. These incentives have also been set to fill the low sales volume of new antibiotics. DRIVE-AB has proposed a long-term supply continuity model designed to ensure the continuous supply of essential antibiotics through a series of annual fixed payments to the supplier [8].

These new incentives stimulated the interest of industries involved in the development of non-traditional drugs, especially nanotechnology industries, which have invested in the development of new nanomaterials identified as promising agents against bacteria resistant to traditional antibiotic.

Nanomaterials

According to the definition adopted by EU in 2011, “*Nanomaterials’ consist of a natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in size range 1 nm – 100 nm*” [9]. Additionally, they have a high surface-to-volume ratio that gives them unique optical, electronic and mechanical properties [10]. Within this category, nanoparticles of various origins, including organic or inorganic are included. Inorganic nanoparticles, however, are used more often due to their greater stability and ease of handling [11].

Metal-based nanoparticles properties

Metal-based nanoparticles are the most popular inorganic nanoparticles and present a promising solution for resistance to traditional antibiotics. Not only these use mechanisms of

action that are completely different from those described for traditional antibiotics, exhibiting activity against bacteria that have already developed resistances, but also, target multiple biomolecules avoiding the development of resistant strains [12].

Metal-based nanoparticles may be characterized by numerous techniques. These methods provide valuable information about its morphology, physical-chemical and electronic properties which are crucial for its activity. The most frequently reported properties of nanoparticles include aspects as their size, shape and roughness and surface energy [13].

I. Size

As referred above, nanoparticles size is an important characteristic for its antibacterial activity and, therefore, it must be carefully controlled during the synthesis process [13]. Typically, smaller nanoparticles have higher antibacterial activity. This is due to the fact that the decrease in nanoparticles size causes a proportional increase in the surface area susceptible to contact with the bacterial surface and also increases the release of metallic ions involved in its toxicity. Although, theoretically, larger particles are not as cytotoxic to bacteria, in practice this is not always observed. This fact suggests that the size of nanoparticles alone is not a determining factor for its activity [12, 13].

Each metal-based nanoparticle possesses intrinsic properties which are specific, so when a new method of synthesis is idealized it's important to optimize the process by assessing the size ranges within its minimum inhibitory concentration (MIC) is smaller, which corresponds to the range within metal-based nanoparticles are more efficient, so that a lower concentration is required to prevent visible bacterial growth. This value is important since its toxicity is usually dose-dependent. However, smaller metal-based nanoparticles may present a greater risk of adverse effects to humans as will be discussed below [14]. This happens because small nanoparticles can cross membranes and be easily absorbed into the bloodstream from which it can reach other tissues and accumulate [15].

II. Shape and roughness

Shape of nanoparticles may also play a major role in its activity by causing varying degrees of bacterial inhibition and damage. There are nanoparticles of the most varied shapes like spherical, sheets, plates, tubes, cubes, rods or triangles [12]. It is expected that shapes with a greater number of exposed planes (e.g. cubes or tubes) will be more effective, since they have a larger interaction surface with bacteria when compared to spherical nanoparticles [16]. However, this property is hard to control during synthesis, and most of metal-based nanoparticles synthesized have spherical shapes.

Likewise, higher roughness accelerates the release of metal ions. On the contrary, irregularity of their surface may promote complexation and adsorption of bacterial proteins on their surface, culminating in a reduction in bacterial adhesion [13].

III. Surface energy

Metal-based nanoparticles may present positive, neutral or negative charge in its surface, depending on the synthesis conditions and method employed. Although there is no precise method of quantifying the energy at the surface of nanoparticles, zeta potential provides a valuable approximation of the electrokinetic behaviour of nanoparticles in solution [17].

It is known that a negative or positively charged particle in solution affects the distribution of ions in the nearby regions. As a result of this phenomenon a fixed layer (Stern Layer) consisting of ions of opposite charge tightly bound is formed on the surface of charged nanoparticles. Externally to the Stern layer, due to the load potential that is still felt in this region, a diffuse cloud-like area is formed where ions of opposing polarities (Slipping/Shear Plane) agglomerate. The area around the nanoparticle is usually referred to as the Electric Double Layer (EDL). The phenomenon of dissociation of ionogenic groups on the surface of metal-based nanoparticles may also contribute to the formation of EDL [18, 19].

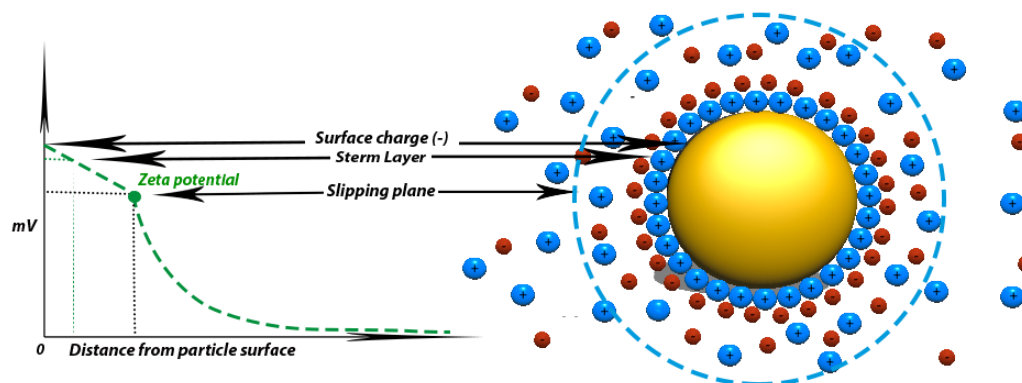


Figure 1: Model of behaviour of a particle with negative surface charge suspended in a dispersion medium and relation between its surface electric charge and zeta potential. (Adapted from:[20].)

When an electric current is applied (e.g. electrophoresis), charged nanoparticles move towards the opposite electrode. In the diffuse layer there is an interface between the moving nanoparticles and the dispersing medium (Slipping Plane). The zeta potential does not measure the potential at the surface of the nanoparticle, but on the surface of that interface. For this reason, it is not considered a real value, but rather an approximation to the surface energy of the nanoparticle [21].

Zeta potential is used in the stability studies as an indicator of stability of colloidal dispersions. Its magnitude provides information on the degree of electrostatic repulsion between adjacent nanoparticles. A widely positive (> 30 mV) or largely negative (< 30 mV) zeta potential generally means that the colloidal suspension is highly stable whereas a small zeta potential may indicate ($\leq |5|$ mV) the existence of attractive forces that can exceed repulsive forces leading to phenomena of aggregation (e.g. flocculation) [18, 22].

Metal-based nanoparticles general mechanisms

Bacteria have specific characteristics that may justify the behaviour of metal-based nanoparticles when in contact with them. Since the major mechanism of bacterial toxicity occurs by direct contact with the cell surface (as explained below), it is important to understand the differences between the cell wall of gram-positive and gram-negative bacteria [13].

Both gram-positive and gram-negative bacteria have a negatively charged surface, although the latter have a broader zeta potential [12, 23]. Gram-positive bacteria present a thick layer of peptidoglycan formed by linear chains of alternating residues of N-acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM) linked together by a sequence of 3 to 5 amino acids that cross-link each other, forming a cohesive mesh. Additionally, negatively charged teichoic acids (with high levels of phosphate groups) extend from the cell wall to the surface of most gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria, on the contrary, present a slightly more complex structure. In addition to the thin layer of peptidoglycan, bacteria have a phospholipid outer membrane with partially phosphorylated lipopolysaccharides (LPS) that contribute to increase the negativity of gram-negative cell membrane [24].

Negatively charged bacterial cells walls attracts cation-rich nanoparticles to their surface due to electrostatic interactions. Positively charged metal-base nanoparticles establish a strong bond with the membranes, resulting in disruption of cell walls and, consequently, increase their permeability. Although some smaller nanoparticles (< 5 nm) can passively penetrate cell walls and membranes, most of them are limited to the extracellular space, where they slowly release metal ions capable of, not only of destroying cell walls and membranes, but also of entering the cell and disruption biological processes [25]. Inside the cell, the cations induce production of reactive oxygen species (ROS). The oxidative stress generated leads to saturation of glutathione, thus suppressing the antioxidant defence mechanism of bacteria against ROS. The cations are then free to interact with cellular structures such as proteins, membranes and DNA, disrupting cell functions [26]. Metal ions can form strong coordination bonds with N, O or S atoms which are abundant in organic compounds and biomolecules.

Since the bond between metal ions and biomolecules is generally non-specific, metal-based nanoparticles generally exhibit a broad spectrum activity [27].

Metal and metal oxide nanoparticles

Metal-based nanoparticles are not a recent technology. The natural production of metal-based nanoparticles by some microorganisms as a mechanism of heavy metals detoxification has been described. However, The Industry has only discovered the versatility of this technology in the last decades, with metal-based nanoparticles being widely used in the production of cosmetics and textiles ever since [28]. Their versatility has aroused the interest of the scientific community, which began an incessant search for new compositions, applications and methods of synthesis. Although in recent years researchers have expanded their research to other less common metals, the most commonly used materials in metal-based nanoparticles include metals such as silver, gold, copper, iron, zinc, and others, [29].

Transition metals are expected to be the best candidates for the synthesis of metal-based nanoparticles since these have partially filled d-orbitals which make them more redox-active (easier to reduce to zerovalent atoms), a feature that facilitates their nanoparticle aggregation [12].

The various synthesis methods developed can be classified as "Physical Methods", "Chemical Methods" or more recently "Biological Methods" [30, 31].

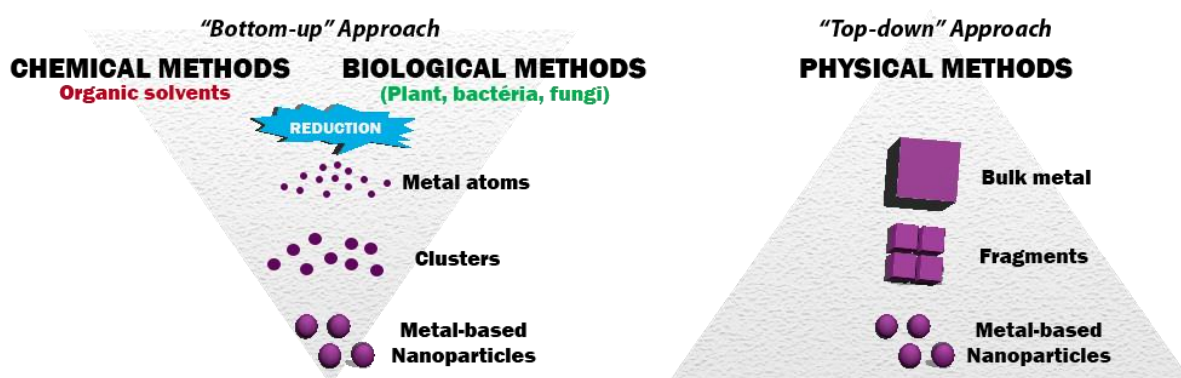


Figure 2: Different methods used to synthesize metal-based nanoparticles. (Adapted from: [32].)

Physical methods use a top-down approach, starting from bulk metal that undergoes fractionation into smaller pieces by mechanical action into successively smaller fragments. Examples of this approach are plasma etching, electron-beam lithography, and others. Although very simplistic, this technique originates nanoparticles with a fairly dispersed size

distribution and is therefore not the most appropriate in the synthesis of metal-based nanoparticles, where size is a determining factor for their activity [33].

On the other hand, chemical methods use a “bottom-up” approach, based essentially on reduction reactions. In these, the synthesis begins with the dissolution of a precursor (a molecule containing atoms of the selected metal) in an appropriate solvent, to which is added a reducing agent. The precursor is reduced to the zero-valent state and nucleates into monodispersed colloids [33]. In order to promote the stabilization of the newly formed nanoparticles and prevent the coalescence, a surfactant is often added. Techniques using this approach include "Thermolysis Methods", "Chemical Reduction Methods", "Biochemical Methods", "Electrochemical Methods", "Wave-Assisted Chemical Methods" and "Cementation Methods" [34].

Biological methods arose from the need to develop new more environmental-friendly techniques that exclude the use of organic solvents and toxic chemicals. Although, in some cases, these may be dependent on the growing periods of microorganisms, in addition to their biocompatibility and moderate synthesis conditions, they have also proved to be safe and economically sustainable alternatives. Critical aspects of the synthesis of metal-based nanoparticles such as their size distribution and crystallinity can be overcome for example by adapting strain selection, incubation temperature and time, concentration of metal precursor and optimal pH conditions [35].

The described biological processes usually include organisms as bacteria, fungi and yeasts, algae or even plants, and take advantage of the defence mechanisms present in these organisms (against high concentrations of metal ions) to produce metal-based nanoparticles of interest. These methods include intracellular mechanisms (e.g., bioaccumulation) or extracellular mechanisms (e.g. bioabsorption, biomineralization, complexation or precipitation) [36, 37].

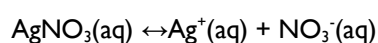
The use of fungi in the production of metal-based nanoparticles offers advantages in industrial scale production when compared to bacteria since these organisms present a higher resistance to the flow pressure and agitation of the bioreactors [38, 39]. However, in the last years most of the researchers have opted for the use of plant extracts because, in addition to the advantages mentioned above, its use facilitates the treatment of samples as well as scale-up production and the collection of the product of interest after reaction.

Synthesis

Silver nanoparticles are the most studied metal-based nanoparticles for its antimicrobial activities. They possess bactericidal activity against either gram-negative or gram-positive bacteria, as showed in table I (see attachments) [15]. Eco-friendly methods of biosynthesis have, gradually, substituted the traditional chemical synthesis with dozens of articles about the subject in the last years. The biosynthesis of AgNPs uses the bases of chemical synthesis, but instead of a chemical entity, this takes advantage of the reductive properties of biological entities.

AgNPs biosynthesis using some bacteria (which produce reductase enzymes) may result from an intra- or extracellular process [40]. The intracellular process encompasses facilitated transportation of Ag^+ ions towards the inside of the bacterial cell and production of AgNPs on silver-resistant bacteria (biomass as the organic base) by conversion of ionic Ag^+ to neutral Ag^0 by reducing agents. In this case, additional steps for recovery of AgNPs such as cell lysis, are required. In the extracellular synthesis, the proteins present on bacterial cell wall or small soluble secreted reductase enzymes (as NADH-dependent nitrate reductase) catalyze the reaction. In the last case, the organic base used is the supernatant which makes it easier to recover AgNPs for example by centrifugation and posterior resuspension in an appropriate solvent if required [41].

One of the first bacteria used for the synthesis of AgNPs by culturing in high concentrations of AgNO_3 was *Pseudomonas stutzeri* AG29, a silver-resistant bacterium isolated from a silver mine which reduces Ag^+ to neutral Ag^0 with accumulation inside the cell [42, 43]. Similarly, in the recent years, Gan et al., Yurttuk et al., and Jang et al. among other authors have also described the utilization of AgNO_3 as AgNPs precursor [44-46]. Usually, AgNO_3 is added to the organic base, and the mixture is incubated at optimized conditions. The ionization of AgNO_3 is described in the next equation:



NADH-dependent nitrate reductase produced by some bacteria is an enzyme activated at alkaline pH in the presence of substrate (NO_3^-). This enzyme catalyzes reduction of nitrate to nitrite, illustrated in [Figure 3](#) [41].

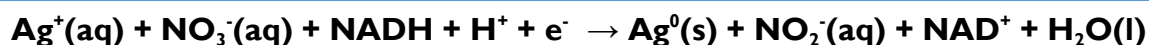


Figure 3: Schematic representation of the reaction of formation of oligomeric clusters of Ag^0 catalysed by NADH-dependent nitrate reductase. (Adapted from: [41]).

Jang et al. have reinforced the importance of pH in AgNPs synthesis. In this study, they have concluded that alkaline pH improves the yield of the reaction with high levels of AgNPs synthesized with smaller sizes in the pH ranges of 8-10. On the contrary, at acidic pH Ag^+ ions precipitate and AgNPs synthesis is hardly observed [45].

Fungi produce lots of extracellular enzymes which are secreted outside the cell and are responsible for extracellular digestion of macromolecules followed by absorption of nutrients. This unique characteristic gives them great relevance in extracellular synthesis of AgNPs. After incubation and growth of colonies, fungi are usually separated from the aqueous medium containing extracellular enzymes. The first ones are rejected and AgNO_3 is added to the medium. This mixture is then incubated usually at temperatures close to room temperature. Production of AgNPs follow the equations described above. The occurrence of the synthesis reaction may be checked by a color change in the medium [47, 48].

Various factors may influence the intrinsic characteristics of fungal-produced AgNPs. These include aspects as medium characteristics, incubation time and temperature, AgNO_3 concentration and biomass concentration and activity. Zhao et al. assessed optimization of extracellular biosynthesis of AgNPs by fungi. He described pH7, at 25 °C with 1mM AgNO_3 and 15-20 g of wet cell filtrate as the optimal conditions for the occurrence of the redox reaction. Under these conditions, nanoparticles obtained spherical shapes with a size ranging between 25 and 30 nm [49].

Synthesis with plant extracts resort to their relatively high levels of steroids, saponin, carbohydrates and flavonoids that act as reducing agents, as well as bio-capping compounds reducing agglomeration of nanoparticles and allowing a better control over size [50, 51]. The general protocol of nanoparticles synthesis from plant extract is quite simple. Despite some protocols may present slight variations, most of them are similar. The first step involves extract preparation. After collecting the sample (plant), usually it is carefully washed 2-3 times with tap water to remove the necrotic parts of the plant, and then it is washed with sterile water to remove associated debris, in case these exist. The clean part of the plant is, then, dried in the shade (for about 10-15 days) and powdered. For preparation of plant extract, the dry powder is boiled in deionized water. The resulted infusion is thoroughly filtered until

no insoluble material is present. A certain amount of plant extract is afterwards added to the solution containing 1 mM AgNO₃. As in the prior techniques, AgNPs synthesis reaction may be checked by a color change of the medium (usually to dark brown) and confirmed with the UV-VIS spectra. AgNPs formed may be easily collected by repeated centrifugation at 12,000 rpm for 15 min [50, 52].

Synthesized AgNPs control

Numerous methods have been used to control and characterize the product of interest. The most often reported are UV-Vis spectrophotometry, X-ray diffractometry (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

UV-Vis spectrophotometry is normally performed at various time intervals during the reaction and provides valuable information about the success of AgNPs synthesis. The presence of a peak at 420 nm (characteristic peak for AgNPs) is evidence that the reaction has occurred [53].

XRD investigates the crystalline nature of AgNPs, recorded in the 2θ range of 30–80° and provides confirmation of the morphology. X-ray diffraction pattern of AgNPs usually reveals the formation of face-centered cubic (FCC) structures of metallic silver. The prominent peaks are observed at 2θ = 38.19°, 44.46°, 64.63° and 77.34°, and correspond to the (111), (200), (220) and (311) planes, respectively [51].

Alternatively, the average size may be calculated by using Debye-Scherrer equation:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

where D is the size (nm), λ is the wavelength of radiation (nm), β is the full width at half maximum (radians), and θ is the half of the Bragg angle (radians) [54].

TEM image allows the visualization of biosynthesized AgNPs morphology. Most of the reports about AgNPs synthesis describe them as morphologically spherical with quite disperse average size, varying a lot with slight changes in the synthesis protocols [52]. The [Figure 4](#) provides an example of images obtained by TEM.

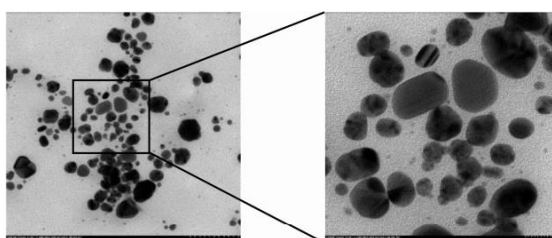


Figure 4: Example of a TEM image of synthesized AgNPs. From: [55].

FTIR is usually carried out to identify key functional groups and to characterize biomolecules bounded specifically on the synthesized AgNPs either by free amine groups, cysteine residues or electrostatic attraction of carboxylate groups [56]. The biologically synthesized AgNPs is mixed with potassium bromide to make a pellet and it is placed into the sample holder. Based on FTIR analysis its assumed that these biomolecules and proteins may be involved in the capping stabilization. FTIR spectra varies with the characteristics of the organism/specie used in the AgNPs synthesis [47, 57].

Other procedures include scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) that provides information on the size and size distribution; dynamic light scattering (DLS) that besides size determination is also used to measure zeta potential; field emission scanning electron microscopy (FESEM) that provides information on the surface morphology; or energy-dispersive X-ray (EDX) that is used for elemental analysis or chemical characterization.

Characterization

The AgNPs more frequently reported are spherical with disperse average size. Although few articles mention the determination of zeta potential, this measurement is a valuable tool for determination of AgNPs' stability and surface charge in aqueous colloidal suspensions. Balakrishnan et al., for example, included zeta potential determination in their extensive AgNPs characterization which was determined to be about -9.56 mV, indicating a slight repulsion of AgNPs [52]. Farhadi, et al., in their turn, obtaining a value of about -35 mV. Since this value is less than -30 mV stability of the colloidal AgNPs suspension is confirmed illustrating the repulsion between synthesized nanoparticles that prevents agglomeration phenomena [58]. Zeta potential values can be either positive or negative, however, its value is, frequently, negative probably due to the possible capping of bio-organic components present in the extract. AgNPs with negative zeta potential are usually associated with an inferior antimicrobial activity, as we will explain below [59].

Pharmacokinetics

Biological membranes provide the first-line defence against toxicants or pathogens. Their selective permeability allows the entrance of some biomolecules, mostly small lipophilic molecules and metallic ions. AgNPs pharmacokinetics has been shown to be dependent of various factors such as dose, exposure route, species, and gender [60]. In order to determine these parameters, Bachler et al. developed a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK) for humans to provide an evaluation about the exposure and risk assessment of AgNPs.

Note that to keep this PBPK models as simple as possible, they considered ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) of AgNPs followed a first-order kinetic [61].

Absorption

There are four potential administration routes for AgNPs. These include oral, dermal, pulmonary or i.v. As new promising agents against bacterial infections, AgNPs are being developed not only for topical, but also for systemic infections. For this reason, it's important to determine their pharmacokinetic parameters. Absorption of AgNPs through biological membranes is mostly dependent on its physicochemical characteristics, like the size and shape.

Gastrointestinal absorption:

During digestion AgNPs undergo a series of changes triggered by high temperatures, variable pH, changes of saline balance and enzymes in the gastrointestinal tract. After gastric digestion the number of nanoparticles drop significantly, rising back to original values after intestinal digestion. Reduction in number of particles is caused by their clustering promoted by the chloride present in the stomach. During intestinal digestion, these clusters are disintegrated back into single AgNPs. This phenomenon is believed to be caused by the increase in pH from gastric to intestinal medium. Results like these indicate that under physiological conditions AgNPs reach the intestine mostly in their original form [62].

Although most of AgNPs reach the intestine, its gastrointestinal absorption rates are extremely low, as proved by Bachler et al. whom concluded that after oral administration of AgNPs, the intestinal absorption fraction was about 0.12% to 0.88% in humans and ionized silver (Ag^+) presented a fraction of approximately 5% in rats [61]. The low absorption of AgNPs after an oral dose may be associated with the binding of nanoparticles to non-digestible food components resulting in a higher faecal excretion of silver [63].

Pulmonary absorption:

Absorption from the alveoli to the bloodstream is mostly dependent on size of the nanoparticles. While ultrafine AgNPs dissociates rapidly and silver spreads to the blood capillaries, larger or agglomerated AgNPs are retained in the lungs. The remaining AgNPs in the alveoli are rapidly eliminated through local macrophages phagocytose [64].

In order to determine absorption fractions of AgNPs, Bachler et al., used as reference the concentrations needed to cause argyria (a condition that occurs after prolonged exposure to silver and is characterized by irreversible purple to grey coloration of skin/eyes) after pulmonary or intestinal uptake previously described by other authors. According to them, this

value can be up to 3.75 times higher to an oral dose when compared to an inhaled dose, which suggests a more extensive lung absorption. During their experiments, Bahler et al. obtained absorption fractions of 20.1% for inhalation and 3.25% for oral absorption, which is consistent with the values referred above [61].

Cutaneous absorption:

There are two major routes proposed for epidermal penetration. The first involves passage through the stratum corneum, either by a transcellular (diffusion through the cells) or by an intercellular pathway (diffusion through the gaps between corneocytes). The second includes the entry via skin appendages as hair follicles and sweat glands [65].

AgNPs, as other metallic nanoparticles, accumulate in the follicle where they form a deposit which can't be removed by natural desquamation or body wash. These deposits allow a gradual absorption of nanoparticles from the follicles to the blood capillaries [65]. According to Larese et al., AgNPs can penetrate intact human skin and damaged skin, however, in compromised skin the median amount capable of penetrate was 5 times greater than in the intact skin [66].

Distribution

In first instance, accumulation of AgNPs in the tissues is dependent on route of administration reaching, for example, high levels in skin after dermal administration or in the lungs during pulmonary administration. In oral administration AgNPs reach high concentrations in small intestine, and stomach. After oral administration and absorption, silver undergoes a first-pass through the liver with excretion into the bile which reduces systemic distribution to body tissues [67].

After i.v. injection concentration-time curves revealed a rapid decline in silver concentration during the first 10 min which indicates a rapidly distribution of AgNPs to tissues, followed by a stabilization of concentration in blood after this period. Although silver distributes to all organs, it achieves higher accumulation in the spleen and liver after a single dose injection. Continuing of the treatment results in a slight decrease in liver accumulation with AgNPs depuration and excretion through the bile and a redistribution of silver to other organs as kidney, heart, lungs, testes and brain [68, 69].

Metabolism and excretion

Stabilization of AgNPs by proteins adsorbed at its surface blocks dissolution of silver making impossible the formation of new soluble silver species. Instead, stable AgNPs undergo

direct complexation into silver sulphide particles which accumulate in the tissues [61]. Activation of metallothioneins in the liver may also be pointed out as a reason for AgNPs accumulation in this organ. These small proteins present a high number of thiol groups which are involved in detoxication of heavy metals in liver but also in other organs as kidneys, intestine and brain [68].

Silver nanoparticles are slowly eliminated from the organism. Although a small fraction of AgNPs are excreted by the kidneys, biliary excretion is the major route of silver depuration. This pathway includes complexation of silver with glutathione (GSH) generating silver-GSH complexes. Since the excretion rates are very small, the amount of silver in the bile and urine is negligible [61].

Pharmacodynamics

Despite several approaches have been made over the years, the precise mechanism of action of AgNPs is still not fully understood. The antimicrobial action of AgNPs is linked to four main mechanisms: (1) attraction to the bacterial surface, (2) destabilization of the bacterial cell wall and membrane with change in its permeability (3) induction of toxicity and oxidative stress by generation of ROS and free radicals and (4) modulation of signal transduction pathways [70].

Adhesion of AgNPs to the surface of bacteria is described by many authors as the first step of a complex mechanism of bacterial inhibition. AgNPs adhesion is highly influenced by its size, but also by its zeta potential. Depending on the synthesis method used, AgNPs may have a positive, neutral or negative zeta potential. Abbaszadegan et al. demonstrated that by varying the surface charge of nanoparticles, a marked fluctuation of the antibacterial activity occur. Since the bacterial surface shows a slightly negative charge, positively charged AgNPs are strongly attracted to the surface of the bacteria, resulting in increased antibacterial activity. On the other hand, neutral or negatively charged nanoparticles have a significantly decreased antibacterial effect. However, an increase in the concentration of AgNPs allows the attenuation of electrostatic repulsion through a bacterial surface saturation method [71].

After adhesion to the bacterial surface, AgNPs can interact with the cell via two different mechanisms. Smaller AgNPs (~ 5 nm) penetrate directly into the cell, while larger nanoparticles are retained outside the bacteria. In both cases, AgNPs continuously release Ag⁺ ions. These ions bind to cell membrane structures destabilizing the membrane potential and causing proton leakage. Cell wall destabilization highly increases bacterial permeability, allowing larger AgNPs to enter the cell [72, 73]. Once inside the cell AgNPs and Ag⁺ ions interact with numerous structures and biomolecules as proteins, lipids and DNA, resulting in

cell dysfunction. AgNPs are well known by its high capacity to produce reactive oxygen species (ROS) and free radicals as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-), and hydroxyl radical (OH^\cdot). Although ROS occur naturally in bacteria as a result of cellular respiration, under normal circumstances bacteria possess defence mechanisms, such as glutathiose (GSH), superoxide dismutase, and catalase that act as antioxidant enzymes and eliminate these toxic species. High concentrations of Ag^+ released by AgNPs produce extreme levels of oxidative stress. Even though antioxidant enzymes link some of the released ions, these are not enough to neutralize the AgNPs amount [73]. These species interact with respiratory chain proteins on the membrane and inactivate enzymes due to its high affinity to phosphates, thiol and carboxyl groups [74]. Its link to phosphate groups inhibits phosphorylation of proteins which is frequently involved in enzymatic activation, ultimately resulting in inhibition of bacterial growth. Dephosphorylation of tyrosine residues of protein was also been implicated in disruption of biosynthesis and transport of exopolysaccharide and capsular polysaccharide to the membrane, and thereby, disruption of cell cycle [70]. Additionally, Ag^+ can intercalate DNA strands forming complexes with nucleic acids between the purine and pyrimidine base pairs, disrupting H-bonds between them [73].

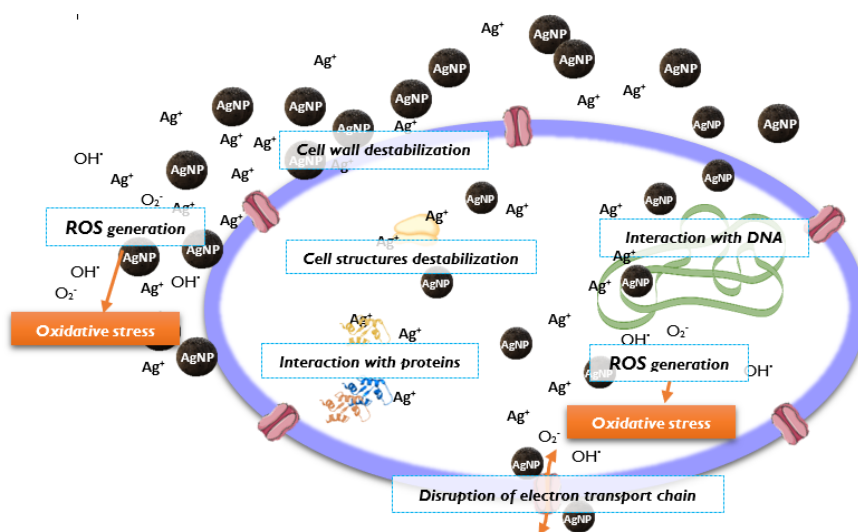


Figure 5: Schematic representation of AgNPs mechanism of antimicrobial activity. (described above). Adapted from: [39].

Although silver nanoparticles are the most extensively studied and well described nanoparticles with antimicrobial applications, other approaches have tried to apply different metals (e.g. copper, gold, zinc, titanium, etc) in nanoparticles synthesis.

COPPER AND COPPER OXIDE NANOPARTICLES (CuNPs and CuONPs)

CuO is a semiconductor material considered to be an excellent candidate for the synthesis of metal-based nanoparticles, because besides being highly resistant to heat, it is also highly robust, stable, cheap and easily synthesized [75, 76].

Synthesis

The synthetic protocols used are similar to those described above. Although both CuNPs and CuONPs can be synthesized by various processes, biocompatible processes emerged as the most investigated in the past few years. Independently of the selected method, during synthesis, CuSO_4 , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ or $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ are the most frequently used copper precursors. Synthesis of CuONPs is divided in two steps illustrated in **Figure 6**.

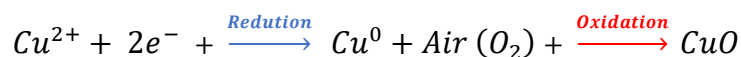


Figure 6: Schematic representation of the two-steps reaction of formation of clusters of CuO. (Adapted from: [76].

The first reaction consists in the reduction of the ionic precursor (Cu^{2+}) with formation of Cu^0 which is highly unstable in the presence of oxygen, and for this reason, it is readily oxidized to CuO. Occurrence of the reaction may be assessed by observing a color change of the solution: bleaching of the solution with Cu^0 formation which changes again, usually to a brownish tone after the conversion to CuO [76].

Pharmacokinetics

Since copper is an essential microelement which is present in all tissues in the human body, its distribution and accumulation is hard to assess [77]. For this reason, to date no work has been published regarding the investigation of pharmacokinetics of CuONPs. A study, however, was performed assessing pharmacokinetics of Cu^{2+} and Zn^{2+} after an intravenous dose of another drug containing these elements in rats after determining the baseline copper concentration in blood (1.09 ± 0.04 mg/mL). Copper concentrations after dose administration were obtained by subtracting basal values from total metal levels. According to this study, copper is distributed to all tissues having affinity to specific transporters that will mediate its entrance in the cells. Similarly, mammalian cells possess Cu-efflux transporters that control the excess of Cu in the intracellular medium, maintaining copper homeostasis. [78, 79].

Pharmacodynamics

Although it has been suggested that CuNPs have a greater ability to inhibit bacterial growth because of their more direct contact with bacterial strains (attributed to better

electron transfer between bacteria and CuNPs), they are more instable and have high susceptibility to oxidation. This problem was overcome by the conversion of CuNPs to CuONPs, the latter having greater stability costing, however, small loss of activity [80].

CuONPs have antioxidant and antimicrobial activity with high clinical interest. Their antibacterial activity has been studied particularly against microorganisms such as *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa*, *S. typhus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis* and *S. faecalis* [81, 82].

The mechanism of antibacterial activity of CuONPs is not well elucidated yet, however it's thought that it involves bacterial cell wall adhesion triggered by electrostatic interactions. Dissociation of Cu^{2+} induces the generation of ROS that contact with cellular membranes. These ions also have the capacity to enter the cell, causing membrane damage which is associated with disruption of cell's internal content and bacterial cell leakage [11, 80].

GOLD NANOPARTICLES (AuNPs)

AuNPs are composed of gold, an inert and biocompatible compound [83]. Their unique characteristics make them a material of extreme interest in the medical field. Some of the major areas of application of AuNPs include biosensors and bio-imaging, drug delivery systems, and also the treatment of some cancers. Meanwhile, some researchers have been interested in the potential antibacterial activity of AuNPs since this material is much less toxic to mammalian cells when compared with AgNPs, the most common nanoparticles employed as antimicrobial agents [84].

Synthesis

Although there are several methods for the synthesis of AuNPs, all of them are based on the reduction reaction of chloroauric acid (HAuCl_4) followed by agglomeration in the presence of a stabilizing agent (**Figure 7**).



Figure 7: Schematic representation of the reduction reaction of formation of AuNPs. (Adapted from: [85].)

The occurrence of the reaction is easily detected by the color change of the solution from pale yellow to pinkish red color caused by the alteration in the surface plasmon resonance of the newly formed AuNPs. This is due to the fact that at nano-size, the surface electron cloud of gold vibrates, absorbing the electromagnetic radiation of a certain wavelength. Generally, these results are confirmed by UV-Vis spectrum analysis. In most cases, a peak absorption of AuNPs between 500 and 600 nm (~ 521 nm) is observed [84, 86, 87].

Pharmacokinetics

AuNPs biodistribution is dependent on many variables, including size and geometry of nanoparticles, surface chemistry and type of stabilizing agent [88].

Although AuNPs distribute through all the organs, they present a distribution pattern size-dependent with smaller nanoparticles showing a more widespread distribution. AuNPs remain in the body for long periods of time, being eliminated very slowly in the faeces and urine.

After i.v. injection it is preferably accumulated in some organs, mostly in the liver, followed by spleen and lungs. The biodistribution of AuNPs presents a first phase of distribution followed by a second phase of redistribution and elimination. Balasubramanian, et al. described a redistribution time of approximately one month after the i.v. injection. During this period, he observed an increase in the levels of gold in the kidneys, testis and blood simultaneous with persistently high levels of gold in the liver, spleen and adrenal glands [89].

Pharmacodynamics

AuNPs are active against gram-negative and gram-positive bacteria, namely *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.typhi*, *Serratia sp*, *K.pneumoniae*, *S.aureus*, *B.subtilis* and *E.faecalis*, among others (see table 2 in attachments).

The fact that AuNPs are relatively inert implies that they exhibit no apparent intrinsic antibacterial activity. Thus, it is understood that their main mechanism of bacterial toxicity is based on direct adherence of AuNPs to the bacterial surface driven by electrostatic forces. This mechanism is highly dependent on nanoparticles size, typically with smaller nanoparticles presenting lower MIC. From their adhesion results alterations of membrane potential, inhibition of ATPase activity (resulting in inhibition of ATP synthesis) and inhibition of tRNA binding in subunit of the ribosome. This phenomenon will block essential metabolic processes which result in loss of integrity of cell [84, 87].

Due to their low reactivity, AuNPs have ion release and ROS production as a minor mechanism of action. Therefore, they need to be present in much higher concentrations to produce the same antibacterial effect as other metal-based nanoparticles (for example AgNPs) [90].

ZINC OXIDE NANOPARTICLES (ZnONPs)

ZnO is a biocompatible semiconductor material recognized by the Food and Drugs Administration (FDA) as one of the safest materials [91]. The fact that zinc is an essential mineral involved in the catalytic activity of numerous enzymes present in the human body and

being widely distributed throughout the body tissue makes it a material of high relevance compared to those mentioned above [92].

Synthesis

ZnONPs are formed in the same manner as the processes described above. In their case the most used precursors are zinc nitrate ($Zn(NO_3)_2$), zinc sulphate ($ZnSO_4$) and zinc acetate ($Zn(CH_3COO)_2$). Zinc oxide is organized spatially in two main forms: hexagonal wurtzite, the most stable form and therefore the most common and cubic zinc blende. In addition to this fixed form, after agglomeration ZnONPs may present varied morphologies (e.g. nanocombs, nanorings, nanocages, etc.) which is determined by the synthetic route used [92]. Formation of ZnONPs is evidenced by a color change of the solution, and the simplified reactions of its synthesis are presented in **Figure 8**.

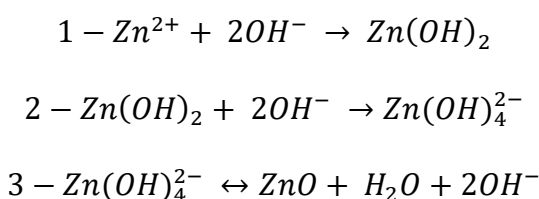


Figure 8: Schematic representation of reactions involved in formation of ZnONPs. (Adapted from: [93].)

Pharmacokinetics

The bioavailability of ZnONPs varies according to the route of administration chosen. While during an i.v. injection the nanoparticles are readily available in the bloodstream, after an oral dose the bioavailability is much lower. This phenomenon can be explained by an incomplete absorption at the level of the gastrointestinal tract, followed by a first-pass hepatic effect [94].

Although the distribution of the nanoparticles is influenced in part by the route of administration and by the intrinsic physicochemical properties of the nanoparticles, as expected, ZnONPs have a wide distribution to organs such as the heart, liver, spleen, lungs and kidneys, with greater accumulation in the liver and kidneys, the main metabolic and / or excretion sites of nanoparticles [95].

Despite being eliminated mainly by biliary clearance and faecal excretion, some smaller ZnONPs are efficiently harvested by the kidneys, being eliminated by renal excretion (minor route) [94].

Pharmacodynamics

ZnONPs possess antimicrobial activity against gram-positive (*S.aureus*, *S.epidermis*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *L.monocytogenes*, *E.faecium*) and gram-negative (*P.aeruginosa*, *E.coli*, *K.pneumoniae* *Salmonella sp.*) bacteria [91, 96-98].

The mechanism of antimicrobial toxicity is related to the dissolution of ZnONPs in aqueous medium with consequent release of Zn^{2+} . Zn^{2+} ions are attracted to the bacterial surface where they cause a change in the membrane potential through the blockage of K^+ ion channel present in the cell membrane. These changes lead to destabilization and increased permeability of the membranes. ROS produced also contribute to this result [94].

In parallel, Zn^{2+} ions can penetrate the bacterial cell wall relatively easily (due to its positive charge). Within the cell they interact with various molecules, such as lipids, proteins and nucleic acids, disrupting important metabolic pathways.

Saliani et al. proved the impact of pH variations in the antibacterial activity of ZnONPs. He concluded that these nanoparticles exhibit excellent stability above pH 7.0. Although, at acidic pH these showed a higher antimicrobial activity as a consequence of the increase in the dissolution and release of Zn^{2+} (as described below) [94, 99].

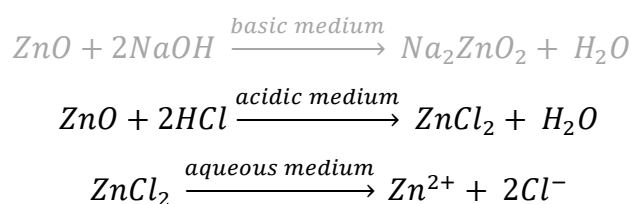


Figure 9: Schematic representation of ZnONPs reactivity under alkaline or acidic conditions. (Adapted from: [100].

Limitations

Despite their many advantages discussed throughout this paper, metal-based nanoparticles, raise some issues, in particular regarding their stability and safety for human and the environment. In the sections below a brief review of the literature up to date on these grounds of concern will be presented.

I. Long-term stability

Nanoparticles stability during storage may be an obstacle difficult to overcome. During their formulation, it was demonstrated the fast“aging” of metal-based nanoparticles even under optimal storage conditions. Nanoparticles are susceptible to normal storage conditions because these undergo changes in physicochemical properties that are important for their

mechanism of antibacterial activity leading to discrepancies in the administered dose and the delivered dose.

Temperature is one of the factors that most affect long-term stability in a colloidal solution of nanoparticles. An elevation of temperature increases system entropy causing a higher number of collisions between nanoparticles and decreasing electrostatic repulsion, which result in faster agglomeration into larger nanoparticles which sediment by gravity usually remaining in solution only smaller well dispersed nanoparticles (<10 nm).

Light exposure may also affect nanoparticles stability. Light irradiation can promote nanoparticles surface oxidation by dissolved oxygen, resulting in release of ions to the solution, additionally, daylight can cause photo-reduction of already dissolved ions with consequent production of new nanoparticles with random distribution diameters [101, 102].

Velgosova et al. proved that AgNPs dispersed in solution if stored in the dark at 5°C temperature presented higher long term stability and no phase separation or agglomeration even after months of storage [103].

Furthermore, the stability of nanoparticles over time is vital for the storage and non-degradation of its nanostructure. It is important to avoid oxidation, which is usually achieved by adding capping agents to its surface which will protect them from deterioration and enhance nanoparticles stability [104].

II. Toxicity

Regardless of the advantages and potential applicability of nanoparticles in the fight against bacteria, some doubts remain about their potential toxicity and risk to human health.

Metal-based nanoparticles have been shown to be more toxic to bacteria than to eukaryotic cells especially due to their higher affinity to them, however its extensive distribution and accumulation over time predicts that the same mechanisms responsible for their efficacy against bacteria, may also be responsible for potential adverse effects [105].

Production of ROS by nanoparticles and oxidative stress generated have been associated with inflammatory processes responsible for many conditions such as pulmonary diseases and liver degeneration [11].

Although it's not a life-threatening condition, argyria and argyrosis caused by chronic exposure to silver are the most often reported. These irreversible conditions are characterized by bluish-gray or ash gray pigmentation of the skin and/or eyes more prominent in solar exposure areas [106]. In addition to argyria and argyrosis, metal-based nanoparticles

have been associated with adverse effects involving organs such as the lungs, liver, kidneys, central nervous system.

a) Pulmonary toxicity

In the lungs, metal-based nanoparticles are involved in acute and subacute inflammatory processes with release of pro-inflammatory cytokines and influx of mononuclear cells [107]. These inflammatory processes may be reversible depending on dose and exposure duration, but in some serious cases they have been associated with the development of pulmonary bronchitis, emphysema and moderate fibrosis [106, 108].

Chung et al. detected a mild to moderate inflammation with infiltration of neutrophils, eosinophils, monocytes/macrophages and some lymphocytes in the bronchial and exudates in the alveolar space after instillation with silver nanowires in Sprague-Dawley rat lungs [109]. Additionally, Gosens et al. and Jacobsen et al. also proved the occurrence of the same effects after administration of CuONPs and ZnONPs respectively [110, 111]. Gosens et al., observed dose-dependent lung inflammation with alveolitis, bronchiolitis, vacuolation of the respiratory epithelium and emphysema after short-term inhalation exposure to CuONPs [110]. while Jacobsen et al. noticed a very strong inflammatory response in the lungs after exposure to ZnONPs [111].

There is no evidence that AuNPs are involved in inflammatory processes in the lungs at therapeutic doses, however, according to the reports published by the researchers mentioned above, this hypothesis cannot be neglected. Despite that, since AuNPs have proven to be much less reactive than other metal-based nanoparticles, they may be considered the safest ones.

b) Hepatotoxicity

In the liver, high accumulation of metal-based nanoparticles has been associated with elevation of liver biomarkers (AST, ALT, GGT), hepatic inflammation and pro-inflammatory activation of Kupffer cells in the liver. At the same time inhibition of several cytochrome P450 enzymes (CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E1 and CYP3A) have also been reported [108, 112].

Jia et al. demonstrated that AgNPs may be involved in the progression of fatty liver disease from steatosis to steatohepatitis as a result of the inflammatory process and inhibition of fatty acid oxidation in overweight rats [113]. Lee et al. also reported mononuclear cell infiltration and hepatocyte degeneration after oral administration of CuNPs. This observation is consistent with suspected sustained chronic inflammation and fibrosis after oral administration of an overload dose [114, 115].

Similarly, Almansour et al. also proved that ZnONPs have potential oxidative stress in hepatic tissues resulting in Kupffer cells hyperplasia, inflammatory cells infiltration, hepatocytes apoptosis and necrosis after performing a study where he evaluated ZnONPs hepatotoxicity in male Wistar albino rats [116].

Although AuNPs administration under normal health conditions does not constitute any harm to the liver due to its rapid trapping by the Kupffer cells present in that organ, under stress conditions (often induced by disease situations) AuNPs stimulate Kupffer cells and increase the recruitment of monocytes/macrophages, responsible for release of pro-inflammatory cytokines [117].

c) Nephrotoxicity

Kidneys may also be susceptible to AgNPs toxicity. Prolonged treatment with AgNPs has been associated with proximal tubular degeneration, capsular and membranous thickening, and mesangial abnormality with loss of renal function evident by increased serum creatinine levels [108, 118].

Similar results have been obtained to other metal-based nanoparticles. Sarkar et al. and Yang et al. both observed an increase in blood urea nitrogen levels and serum creatinine levels in the groups treated with CuONPs and ZnONPs respectively, with evidence of tubular epithelial cell necrosis observed in the second case. These results corroborate the hypothesis of renal dysfunction potentially induced by oxidative stress [119, 120].

Conversely, although Ibrahim et al. has reported some pathological changes in the kidney after exposure to AuNPs during its work, such as alterations in glomeruli, dilated tubules, oedema exudate, mild necrosis, and infiltration of inflammatory cells. These pathological changes were considered minimal and insignificant in the kidneys, regardless of the size of the AuNPs [121].

d) Neurotoxicity

It has been proved that nanoparticles may cause some degree of damage to the blood-brain barrier leading to increased permeability and facilitating its penetration into the central nervous system. Although copper was involved in homeostasis pathways in the brain, its imbalance may be related to some degenerative processes [122]. Similarly, AgNPs and ZnONPs toxicity was also associated with accumulation of nanoparticles in the brain responsible for some degree of neuroinflammation and neurodegeneration caused by ROS induced central nervous system (CNS) injury [123, 124].

Since AuNPs accumulate mainly in the hippocampus, thalamus, hypothalamus and cerebral cortex, Ferreira et al. found that acute administration of AuNPs exposed these areas of the brain to ROS stress responsible for inhibiting energy metabolism in the hippocampus, striatum and cerebrum, while prolonged administration would generate some degree of desensitization [125].

e) Other side effects

Metal-based nanoparticles intake was also associated with anemia resulting from toxicity against erythrocytes which culminates in hemolysis and decreased count of RBC (red blood cells). Besides oxidative stress which is transversal to all metal-based nanoparticles and to which erythrocytes are quite sensitive, ZnONPs possess an additional mechanism of toxicity to red blood cells. Excessive intake of zinc induces deficiency of copper and iron. Iron deficiency is the most frequently reported cause of anemia in the literature [120, 126].

Additionally, after oral administration of metal-based nanoparticles, gastrointestinal side effects as been frequently reported. The most common gastrointestinal reactions reported include nausea, vomiting and diarrhea and gastrointestinal hemorrhage that may also occur in some cases. It was found that people without underlying health problems were less likely to develop adverse reactions when compared to people with comorbidities such as obesity or cholesterol. Due to the varied profile of adverse reactions, during the administration of metal-based nanoparticles, it may be relevant to access the patient's health profile [117].

III. Environmental risk assessment

Increased production and use of metal-based nanoparticles raises issues, namely accumulation of nanoparticles and release of metallic ions in various ecosystems and their environmental impact [101]. In the presence of environmental agents, metal-based nanoparticles are subjected to various physicochemical processes, such as agglomeration, adsorption, dissolution mineralization or redox reactions (e.g.: photo-oxidation or photo-reduction), which are responsible for their variations in the toxicity to living organisms. Metal-based nanoparticles toxicity is usually associated with an increase in ions solubility. For this reason, stable nanoparticles such as AuNPs present less bioavailability, and less toxic-effects to cellular organisms [127].

It was observed that metal-based nanoparticles become rapidly agglomerated in the seawater compared to fresh water. This factor may be explained by a higher ionic strength which promotes agglomeration and deposition onto the sediment surface of bigger

nanoparticles. Additionally, metal-based nanoparticles may also complex with ligands or organic matter dissolved and precipitate. This phenomenon is associated with a decrease in ions release, the major toxic agents [128].

Considering these processes as integrant part of a dynamic equilibrium, alongside this, nanoparticles also release metallic ions under light conditions (photo-oxidation). Ag^+ ions release, in particular, is considered highly toxic to various aquatic organisms such as algae, *Daphnia* or fish [129]. Exposition of aquatic organisms to metallic ions and nanoparticles may generate bioaccumulation and, eventually, biomagnetization along the trophic chain. Lacave et al. assessed effects of dietary transfer of silver from exposed brine shrimp larvae to zebrafish, in an attempt to simulate bioaccumulation of heavy metals. His results proved that although silver ions showed low toxicity to brine shrimp larvae (a much more sensitive specie than zebrafish), bioaccumulation of silver was detected after exposure to sublethal concentrations of AgNPs, being transferred through the diet to adult zebrafish [130].

CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

The metal-based nanoparticle market has expanded tremendously over the years and is expected to continue to grow from USD 12.35 billion in 2017 to USD 25.26 billion in 2022 with an estimated compound annual growth rate (CAGR) of 15.4%. Although they have a high applicability in various industries, such as cosmetics, textile Industry, and food Industry, AgNPs have taken a leading role in the metal-based nanoparticles market in 2016, and with the discovery of its antimicrobial activity it's now expected that the size of AgNPs market exceeds USD 3 billion in 2024 [131, 132].

Metal-based nanoparticles applicability in the antibiotherapeutic field is dependent on the fact that they have several non-specific bacterial toxicity mechanisms (do not bind to a specific receptor in the bacterial cell, as most of the antibiotics currently on the market) which not only difficults the development of resistance by bacteria, but also broadens the spectrum of antibacterial activity. As a result, a large majority of metal-based nanoparticles efficacy studies performed so far have shown promising results in both gram positive and gram-negative bacteria. These results are extremely valuable, since, as noted earlier in this paper (WHO), there is a worrying lack of effective antibiotics against multi-resistant gram-negative bacteria.

We selected four of the main nanoparticles with well-described antimicrobial activity among the most mentioned, namely AgNPs, CuONPs, AuNPs and ZnONPs. Although AgNPs have been shown to be highly reactive and have high antibacterial activity compared to the

rest, its accumulation in the body and potential toxicity to the various organs (described above) may restrict its use. This is the main reason why researchers have chosen to do experiments with other metal-based nanoparticles. CuO and ZnONPs, for example, are constituted by copper and zinc, two essential microelements, which are less toxic to mammalian cells because these have mechanisms of homeostasis that regulate the concentrations of these metals inside the cells. Meanwhile, AuNPs, were originally investigated for their applicability as biosensors, bio-imaging and drug delivery systems and not for their antibacterial activity, however with the discovery of unfavorable toxicity profiles of other nanoparticles, AuNPs antibacterial activity was also investigated, since they are relatively inert and biocompatible. Although AuNPs have considerably lower antibacterial activity using AgNPs as a reference, they present much more favorable safety profiles with no major adverse effects reported to date.

As mentioned previously, metal-based nanoparticles used for medical and pharmaceutical purposes may present narrow therapeutic windows (high risk of side effects) and great differences in product characteristics observed when the synthesis protocol is changed and also during shelf-life. For these reasons, an exhaustive characterization of nanoparticles in the early stages of pharmaceutical development and the study of their *in vivo* behavior during preclinical and clinical trials become vital to the success of pharmaceutical development and so that failures in late phases of R&D do not occur. With this purpose, further safety studies, *in vivo* toxicity studies as well as environmental risk assessments are still required.

REFERENCES

- [1] WHO - **Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis.** . WHO/EMP/IAU/2017.12, (2017) Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258965/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?sequence=1>
- [2] Coates, A. R.; Halls, G.; Hu, Y. - **Novel classes of antibiotics or more of the same?** *Br J Pharmacol.* Vol. 163. n.º 1 (2011). p. 184-94. ISSN: 0007-1188
- [3] Laxminarayan, Ramanan; Duse, Adriano; Wattal, Chand; Zaidi, Anita K. M.; Wertheim, Heiman F. L.; Sumpradit, Nithima; Vlieghe, Erika; Hara, Gabriel Levy; Gould, Ian M.; Goossens, Herman; Greko, Christina; So, Anthony D.; Bigdeli, Maryam; Tomson, Göran; Woodhouse, Will; Ombaka, Eva; Peralta, Arturo Quizhpe; Qamar, Farah Naz; Mir, Fatima; Kariuki, Sam; Bhutta, Zulfiqar A.; Coates, Anthony; Bergstrom, Richard; Wright, Gerard D.; Brown, Eric D.; Cars, Otto - **Antibiotic resistance-the need for global solutions.** *The Lancet Infectious Diseases.* Vol. 13. n.º 12 p. 1057-1098. [Accessed: 2018/04/17]. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)>. ISSN: 1473-3099
- [4] Fernandes, Prabhavathi; Martens, Evan - **Antibiotics in late clinical development.** *Biochemical Pharmacology.* Vol. 133. (2017). p. 152-163. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295216303082>>. ISSN: 0006-2952
- [5] Power, E. - **Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective.** *Clinical Microbiology and Infection.* Vol. 12. (2006). p. 25-34. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14613306>>. ISSN: 1198-743X
- [6] Harbarth, S.; Theuretzbacher, U.; Hackett, J. - **Antibiotic research and development: business as usual?** *J Antimicrob Chemother.* Vol. 70. n.º 6 (2015). p. 1604-7. ISSN: 0305-7453
- [7] WHO - **Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, discovery, and development of New antibiotics.** [Accessed: 2018/07/14]. Available from: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- [8] Christine Årdal; David Findlay; Miloje Savic; Yehuda Carmeli; Inge Gyssens; Ramanan Laxminarayan; and, Kevin Outterson; Rex., John H. - **Revitalizing the antibiotic pipeline.** DRIVE-AB, 2018. [Accessed: 19/06/2018.] Available from: <<http://drive-ab.eu/wp-content/uploads/2018/01/CHHJ5467-Drive-AB-Main-Report-180319-WEB.pdf>>.
- [9] Commission., European - **Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterials.** Official Journal of the European Union, (2011) 275/38-275/40. Available from:
- [10] Vittal, Ravishankar; Bai Aswathanarayan, Jamuna - **Nanoparticles and their potential application as antimicrobials.** 2011.
- [11] Rudramurthy, G. R.; Swamy, M. K.; Sinniah, U. R.; Ghasemzadeh, A. - **Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes.** *Molecules.* Vol. 21. n.º 7 (2016). ISSN: 1420-3049
- [12] Slavin, Yael N.; Asnis, Jason; Häfeli, Urs O.; Bach, Horacio - **Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity.** *Journal of Nanobiotechnology.* Vol. 15. n.º 1 (2017). p. 65. Available from: <<https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>>. ISSN: 1477-3155

- [13] Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. - **The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future.** *Int J Nanomedicine*. Vol. 12. (2017). p. 1227-1249. ISSN: 1176-9114
- [14] Tiwari, Dharmendra; Takashi, Jin; Behari, J. - **Dose-dependent in-vivo toxicity assessment of nanoparticle in Wistar rats.** 2010.
- [15] Aderibigbe, B. A. - **Metal-Based Nanoparticles for the Treatment of Infectious Diseases.** *Molecules*. Vol. 22. n.° 8 (2017). ISSN: 1420-3049
- [16] Wang, Lian; He, Hong; Yu, Yunbo; Sun, Li; Liu, Sijin; Zhang, Changbin; He, Lian - **Morphology-dependent bactericidal activities of Ag/CeO₂ catalysts against Escherichia coli.** *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 135. (2014). p. 45-53. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013414000671>>. ISSN: 0162-0134
- [17] Lu, Guang Wei; Gao, Ping - **CHAPTER 3 - Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery.** In: KULKARNI, V. S. Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Boston: William Andrew Publishing, 2010. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780815520252100034>>.Cap. - CHAPTER 3 - Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. ISBN: 978-0-8155-2025-2, 59-94.
- [18] Bhattacharjee, S. - **DLS and zeta potential - What they are and what they are not?** *J Control Release*. Vol. 235. (2016). p. 337-351. ISSN: 0168-3659
- [19] Skwarek, Ewa; Bolbukh, Yuliia; Tertykh, Valentyn; Janusz, Władysław - **Electrokinetic Properties of the Pristine and Oxidized MWCNT Depending on the Electrolyte Type and Concentration.** *Nanoscale Research Letters*. Vol. 11. (2016). p. 166. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805672/>>. ISSN: 1931-7573 (Print) 1556-276X
- [20] Pharma, Coriolis - **Zeta potential.** [Accessed: 2018/08/20]. Available from: <https://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/zeta-potential/>
- [21] Lenntech - **Zeta Potential.** [Accessed: 2018/07/18]. Available from: <https://www.lenntech.com/library/fine/zeta/zeta-potential.htm>
- [22] Honary, Soheyla; Zahir, F. - **Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2).** 2013.
- [23] Gottenbos, Bart; Grijpma, Dirk W.; van der Mei, Henny C.; Feijen, Jan; Busscher, Henk J. - **Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 48. n.° 1 (2001). p. 7-13. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1093/jac/48.1.7>>. ISSN: 0305-7453
- [24] Bruslind, Linda - **Microbiology.** In: Open Oregon State, 2017. Available from: <<http://library.open.oregonstate.edu/microbiology/chapter/bacteria-cell-walls/>>.Cap. - Microbiology. ISBN: 13,
- [25] Stensberg, Matthew Charles; Wei, Qingshan; McLamore, Eric Scott; Porterfield, David Marshall; Wei, Alexander; Sepúlveda, María Soledad - **Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging.** *Nanomedicine (London, England)*. Vol. 6. n.° 5 (2011). p. 879-898. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359871/>>. ISSN: 1743-5889 (Print) 1748-6963
- [26] Raghunath, A.; Perumal, E. - **Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future.** *Int J Antimicrob Agents*. Vol. 49. n.° 2 (2017). p. 137-152. ISSN: 0924-8579
- [27] Yuan, Peiyan; Ding, Xin; Yang, Yi Yan; Xu, Qing-Hua - **Metal Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Bacterial Infection.** *Advanced Healthcare Materials*. Vol.

7. n.º 13 (2018). p. 1701392. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201701392>>.
- [28] Heiligtag, Florian J.; Niederberger, Markus - **The fascinating world of nanoparticle research.** *Materials Today*. Vol. 16. n.º 7 (2013). p. 262-271. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702113002253>>. ISSN: 1369-7021
- [29] Kandi, V.; Kandi, S. - **Antimicrobial properties of nanomolecules: potential candidates as antibiotics in the era of multi-drug resistance.** *Epidemiol Health*. Vol. 37. (2015). p. e2015020. ISSN: 2092-7193 (Print) 2092-7193
- [30] Iravani, Siavash; Korbekandi, Hassan; Vahid Mirmohammadi, Seyed; Zolfaghari, Behzad - **Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods.** 2014.
- [31] Toshima, Naoki; Yonezawa, Tetsu - **Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications.** *New Journal of Chemistry*. Vol. 22. n.º 11 (1998). p. 1179-1201. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1039/A805753B>>. ISSN: 1144-0546
- [32] Khushboo, Gita Rani - **Nanotechnology: A Growing Field in Science and Technology.** *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*. Vol. no. 07. n.º no. 03 (2018). p. 650-655. Available from: <http://www.ijarse.com/images/fullpdf/1522327066_JCD776_ijarse.pdf>. ISSN: 2319-8354
- [33] Wang, Yuliang; Xia, Younan - **Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals.** *Nano Letters*. Vol. 4. n.º 10 (2004). p. 2047-2050. Available from: <<https://doi.org/10.1021/nl048689j>>. ISSN: 1530-6984
- [34] Reverberi, A. P.; Kuznetsov, N. T.; Meshalkin, V. P.; Salerno, M.; Fabiano, B. - **Systematical analysis of chemical methods in metal nanoparticles synthesis.** *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. Vol. 50. n.º 1 (2016). p. 59-66. Available from: <<https://doi.org/10.1134/S0040579516010127>>. ISSN: 1608-3431
- [35] Shah, M.; Fawcett, D.; Sharma, S.; Tripathy, S. K.; Poinern, G. E. J. - **Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities.** *Materials (Basel)*. Vol. 8. n.º 11 (2015). p. 7278-7308. ISSN: 1996-1944 (Print) 1996-1944
- [36] Basiuk, Vladimir A ; Basiuk, Elena V - **Green Processes for Nanotechnology: From Inorganic to Bioinspiring Nanomaterials.** Springer International Publishing, 2015.
- [37] Li, Xiangqian; Xu, Huizhong; Chen, Zhe-Sheng; Chen, Guofang - **Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications.** *Journal of Nanomaterials*. Vol. 2011. (2011). p. 16. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1155/2011/270974>>.
- [38] Castro, Laura; Blázquez, Maria Luisa; Muñoz, Jesús; González, Felisa; Ballester, Antonio - **Mechanism and Applications of Metal Nanoparticles Prepared by Bio-Mediated Process.** 2014.
- [39] Patil, Maheshkumar; Kim, Gun-Do - **Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles.** 2016.
- [40] Cao, H. - **Silver Nanoparticles for Antibacterial Devices: Biocompatibility and Toxicity.** 2016. Available from: <<https://books.google.pt/books?id=a3VYnQAACAAJ>>.
- [41] Javid, Aqib; Oloketuyi, Sandra; Khan, Mohammad Mansoob; Khan, Fazlurrahman - **Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles.** 2017.
- [42] Haefeli, C.; Franklin, C.; Hardy, K. - **Plasmid-determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri isolated from a silver mine.** *Journal of Bacteriology*. Vol. 158. n.º 1 (1984). p. 389-392. Available from:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC215434/>>. ISSN: 0021-9193 (Print) 1098-5530
- [43] Klaus, Tanja; Joerger, Ralph; Olsson, Eva; Granqvist, Claes-Göran - **Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 96. n.º 24 (1999). p. 13611. Disponível em WWW: <<http://www.pnas.org/content/96/24/13611.abstract>>.
- [44] Gan, L.; Zhang, S.; Zhang, Y.; He, S.; Tian, Y. - **Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by a halotolerant *Bacillus endophyticus* SCU-L**. *Prep Biochem Biotechnol*. (2018). p. 1-7. ISSN: 1082-6068
- [45] Jang, E. Y.; Son, Y. J.; Park, S. Y.; Yoo, J. Y.; Cho, Y. N.; Jeong, S. Y.; Liu, S.; Son, H. J. - **Improved biosynthesis of silver nanoparticles using keratinase from *Stenotrophomonas maltophilia* R13: reaction optimization, structural characterization, and biomedical activity**. *Bioprocess Biosyst Eng*. Vol. 41. n.º 3 (2018). p. 381-393. ISSN: 1615-7591
- [46] Yurtluk, T.; Akcay, F. A.; Avci, A. - **Biosynthesis of silver nanoparticles using novel *Bacillus* sp. SBT8**. *Prep Biochem Biotechnol*. Vol. 48. n.º 2 (2018). p. 151-159. ISSN: 1082-6068
- [47] Elsayed, M. A.; Othman, A. M.; Hassan, M. M.; Elshafei, A. M. - **Optimization of silver nanoparticles biosynthesis mediated by *Aspergillus niger* NRC1731 through application of statistical methods: enhancement and characterization**. *3 Biotech*. Vol. 8. n.º 3 (2018). p. 132. ISSN: 2190-572X (Print) 2190-5738
- [48] Ma, L.; Su, W.; Liu, J. X.; Zeng, X. X.; Huang, Z.; Li, W.; Liu, Z. C.; Tang, J. X. - **Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions**. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Vol. 77. (2017). p. 963-971. ISSN: 0928-4931
- [49] Zhao, X.; Zhou, L.; Riaz Rajoka, M. S.; Yan, L.; Jiang, C.; Shao, D.; Zhu, J.; Shi, J.; Huang, Q.; Yang, H.; Jin, M. - **Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges**. *Crit Rev Biotechnol*. Vol. 38. n.º 6 (2018). p. 817-835. ISSN: 0738-8551
- [50] Ahmed, Shakeel; Ahmad, Mudasir; Swami, Babu Lal; Ikram, Saiqa - **A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise**. *Journal of Advanced Research*. Vol. 7. n.º 1 (2016). p. 17-28. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123215000314>>. ISSN: 2090-1232
- [51] Shivakumar, M.; Nagashree, K. L.; Yallappa, S.; Manjappa, S.; Manjunath, K. S.; Dharmaprakash, M. S. - **Biosynthesis of silver nanoparticles using pre-hydrolysis liquor of *Eucalyptus* wood and its effective antimicrobial activity**. *Enzyme Microb Technol*. Vol. 97. (2017). p. 55-62. ISSN: 0141-0229
- [52] Balakrishnan, S.; Sivaji, I.; Kandasamy, S.; Duraisamy, S.; Kumar, N. S.; Gurusubramanian, G. - **Biosynthesis of silver nanoparticles using *Myristica fragrans* seed (nutmeg) extract and its antibacterial activity against multidrug-resistant (MDR) *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates**. *Environ Sci Pollut Res Int*. Vol. 24. n.º 17 (2017). p. 14758-14769. ISSN: 0944-1344
- [53] Logeswari, Peter; Silambarasan, Sivagnanam; Abraham, Jayanthi - **Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property**. *Journal of Saudi Chemical Society*. Vol. 19. n.º 3 (2015). p. 311-317. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312000506>>. ISSN: 1319-6103
- [54] Markus, J.; Wang, D.; Kim, Y. J.; Ahn, S.; Mathiyalagan, R.; Wang, C.; Yang, D. C. - **Biosynthesis, Characterization, and Bioactivities Evaluation of Silver and Gold Nanoparticles Mediated by the Roots of Chinese Herbal *Angelica***

- pubescens Maxim.** *Nanoscale Res Lett.* Vol. 12. n.º 1 (2017). p. 46. ISSN: 1931-7573 (Print) 1556-276x
- [55] Xia, Q. H.; Zheng, L. P.; Zhao, P. F.; Wang, J. W. - **Biosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia annua* callus for inhibiting stem-end bacteria in cut carnation flowers.** *IET Nanobiotechnol.* Vol. 11. n.º 2 (2017). p. 185-192. ISSN: 1751-8741 (Print) 1751-8741
- [56] Roy, Swarup; Mukherjee, Triparna; Chakraborty, Shatarupa; Das, Tapan - **Biosynthesis, characterisation & antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876.** 2013.
- [57] Chahardoli, A.; Karimi, N.; Fattahi, A. - **Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial and Cytotoxic Effects of Silver Nanoparticles Using *Nigella arvensis* Seed Extract.** *Iran J Pharm Res.* Vol. 16. n.º 3 (2017). p. 1167-1175. ISSN: 1735-0328 (Print) 1726-6882
- [58] Farhadi, S.; Ajerloo, B.; Mohammadi, A. - **Green Biosynthesis of Spherical Silver Nanoparticles by Using Date Palm (*Phoenix Dactylifera*) Fruit Extract and Study of Their Antibacterial and Catalytic Activities.** *Acta Chim Slov.* Vol. 64. n.º 1 (2017). p. 129-143. ISSN: 1318-0207 (Print) 1318-0207
- [59] Umoren, Saviour; Obot, Ime; Gasem, Zuhair - **Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Red Apple (*Malus domestica*) Fruit Extract at Room Temperature.** 2014.
- [60] Samberg, Meghan E.; Lin, Zhoumeng; Monteiro-Riviere, Nancy A. - **In Vitro and In Vivo Toxicity and Pharmacokinetics of Silver Nanoparticles.** In: BHUSHAN, B. *Encyclopedia of Nanotechnology.* Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_331-2>.Cap. - In Vitro and In Vivo Toxicity and Pharmacokinetics of Silver Nanoparticles. ISBN: 978-94-007-6178-0, 1-14.
- [61] Bachler, Gerald; von Goetz, Natalie; Hungerbühler, Konrad - **A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles.** *International Journal of Nanomedicine.* Vol. 8. (2013). p. 3365-3382. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771750/>>. ISSN: 1176-9114 (Print) 1178-2013
- [62] Walczak, A. P.; Fokkink, R.; Peters, R.; Tromp, P.; Herrera Rivera, Z. E.; Rietjens, I. M.; Hendriksen, P. J.; Bouwmeester, H. - **Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model.** *Nanotoxicology.* Vol. 7. n.º 7 (2013). p. 1198-210. ISSN: 1743-5390
- [63] Loeschner, Katrin; Hadrup, Niels; Qvortrup, Klaus; Larsen, Agnete; Gao, Xueyun; Vogel, Ulla; Mortensen, Alicja; Lam, Henrik Rye; Larsen, Erik H. - **Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate.** *Particle and Fibre Toxicology.* Vol. 8. (2011). p. 18-18. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123173/>>. ISSN: 1743-8977
- [64] Takenaka, S.; Karg, E.; Roth, C.; Schulz, H.; Ziesenis, A.; Heinzmann, U.; Schramel, P.; Heyder, J. - **Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats.** *Environmental Health Perspectives.* Vol. 109. n.º Suppl 4 (2001). p. 547-551. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240579/>>. ISSN: 0091-6765
- [65] George, R.; Merten, S.; Wang, T. T.; Kennedy, P.; Maitz, P. - **In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin.** *Australas J Dermatol.* Vol. 55. n.º 3 (2014). p. 185-90. ISSN: 0004-8380
- [66] Larese, F. F.; D'Agostin, F.; Crosera, M.; Adami, G.; Renzi, N.; Bovenzi, M.; Maina, G. - **Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin.** *Toxicology.* Vol. 255. n.º 1-2 (2009). p. 33-7. ISSN: 0300-483X (Print) 0300-483x

- [67] Kim, Y. S.; Kim, J. S.; Cho, H. S.; Rha, D. S.; Kim, J. M.; Park, J. D.; Choi, B. S.; Lim, R.; Chang, H. K.; Chung, Y. H.; Kwon, I. H.; Jeong, J.; Han, B. S.; Yu, I. J. - **Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats.** *Inhal Toxicol.* Vol. 20. n.° 6 (2008). p. 575-83. ISSN: 0895-8378
- [68] Dziendzikowska, K.; Gromadzka-Ostrowska, J.; Lankoff, A.; Oczkowski, M.; Krawczynska, A.; Chwastowska, J.; Sadowska-Bratek, M.; Chajduk, E.; Wojewodzka, M.; Dusinska, M.; Kruszewski, M. - **Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats.** *J Appl Toxicol.* Vol. 32. n.° 11 (2012). p. 920-8. ISSN: 0260-437x
- [69] Lankveld, D. P.; Oomen, A. G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost-de Jong, A.; Noorlander, C. W.; Van Eijkeren, J. C.; Geertsma, R. E.; De Jong, W. H. - **The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes.** *Biomaterials.* Vol. 31. n.° 32 (2010). p. 8350-61. ISSN: 0142-9612
- [70] Dakal, Tikam Chand; Kumar, Anu; Majumdar, Rita S.; Yadav, Vinod - **Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles.** *Frontiers in Microbiology.* Vol. 7. (2016). p. 1831. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5110546/>>. ISSN: 1664-302X
- [71] Abbaszadegan, Abbas; Ghahramani, Yasamin; Gholami, Ahmad; Hemmateenejad, Bahram; Dorostkar, Samira; Nabavizadeh, Mohammadreza; Sharghi, Hashem - **The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study.** *Journal of Nanomaterials.* Vol. 2015. (2015). p. 8. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/720654>>.
- [72] Losasso, Carmen; Belluco, Simone; Cibir, Veronica; Zavagnin, Paola; Mičetić, Ivan; Gallochio, Federica; Zanella, Michela; Bregoli, Lisa; Biancotto, Giancarlo; Ricci, Antonia - **Antibacterial activity of silver nanoparticles: sensitivity of different Salmonella serovars.** *Frontiers in Microbiology.* Vol. 5. (2014). p. 227. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4033309/>>. ISSN: 1664-302X
- [73] Qing, Yun'an; Cheng, Lin; Li, Ruiyan; Liu, Guancong; Zhang, Yanbo; Tang, Xiongfeng; Wang, Jincheng; Liu, He; Qin, Yanguo - **Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies.** *International Journal of Nanomedicine.* Vol. 13. (2018). p. 3311-3327. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993028/>>. ISSN: 1176-9114 (Print) 1178-2013
- [74] Gordon, Oliver; Vig Slenters, Tünde; Brunetto, Priscilla S.; Villaruz, Amer E.; Sturdevant, Daniel E.; Otto, Michael; Landmann, Regine; Fromm, Katharina M. - **Silver Coordination Polymers for Prevention of Implant Infection: Thiol Interaction, Impact on Respiratory Chain Enzymes, and Hydroxyl Radical Induction.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. 54. n.° 10 (2010). p. 4208-4218. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2944614/>>. ISSN: 0066-4804 (Print) 1098-6596
- [75] Hassan, M. Shamshi; Amna, Touseef; Yang, O. Bong; El-Newehy, Mohamed H.; Al-Deyab, Salem S.; Khil, Myung-Seob - **Smart copper oxide nanocrystals: Synthesis, characterization, electrochemical and potent antibacterial activity.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* Vol. 97. (2012). p. 201-206. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512002512>>. ISSN: 0927-7765
- [76] Sutradhar, Prasanta; Saha, Mitali; Maiti, Debasish - **Microwave synthesis of copper oxide nanoparticles using tea leaf and coffee powder extracts and its**

- antibacterial activity.** *Journal of Nanostructure in Chemistry*. Vol. 4. n.° 1 (2014). p. 86. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s40097-014-0086-1>>. ISSN: 2193-8865
- [77] Bhattacharya, Preeti Tomar; Misra, Satya Ranjan; Hussain, Mohsina - **Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review.** *Scientifica*. Vol. 2016. (2016). p. 5464373. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4940574/>>. ISSN: 2090-908X
- [78] Kaplan, Jack H; Maryon, Edward B - **How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal.** *Biophysical Journal*. Vol. 110. n.° 1 (2016). p. 7-13. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4805867/>>. ISSN: 0006-3495 (Print) 1542-0086
- [79] Vertiz, G.; Garcia-Ortuno, L. E.; Bernal, J. P.; Bravo-Gomez, M. E.; Lounejeva, E.; Huerta, A.; Ruiz-Azuara, L. - **Pharmacokinetics and hematotoxicity of a novel copper-based anticancer agent: casiopeina III-Ea, after a single intravenous dose in rats.** *Fundam Clin Pharmacol*. Vol. 28. n.° 1 (2014). p. 78-87. ISSN: 0767-3981
- [80] Vimbela, G. V.; Ngo, S. M.; Frazee, C.; Yang, L.; Stout, D. A. - **Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials.** *Int J Nanomedicine*. Vol. 12. (2017). p. 3941-3965. ISSN: 1176-9114
- [81] Gu, Haidong; Chen, Xiao; Chen, Feng; Zhou, Xing; Parsaee, Zohreh - **Ultrasound-assisted biosynthesis of CuO-NPs using brown alga *Cystoseira trinodis*: Characterization, photocatalytic AOP, DPPH scavenging and antibacterial investigations.** *Ultrasonics Sonochemistry*. Vol. 41. (2018). p. 109-119. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417717304091>>. ISSN: 1350-4177
- [82] Padil, Vinod Vellora Thekkae; Černík, Miroslav - **Green synthesis of copper oxide nanoparticles using gum karaya as a biotemplate and their antibacterial application.** *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 8. (2013). p. 889-898. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3589119/>>. ISSN: 1176-9114 (Print) 1178-2013
- [83] Gerber, Alexander; Bundschuh, Matthias; Klingelhofer, Doris; Groneberg, David A. - **Gold nanoparticles: recent aspects for human toxicology.** *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*. Vol. 8. (2013). p. 32-32. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029541/>>. ISSN: 1745-6673
- [84] Abdel-Kareem, M. M.; Zohri, A. A. - **Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Trichoderma hamatum*: optimization, characterization and antimicrobial activity.** *Lett Appl Microbiol*. (2018). ISSN: 0266-8254
- [85] Newman, J. D. S.; Blanchard, G. J. - **Formation of Gold Nanoparticles Using Amine Reducing Agents.** *Langmuir*. Vol. 22. n.° 13 (2006). p. 5882-5887. Available from: <<https://doi.org/10.1021/la060045z>>. ISSN: 0743-7463
- [86] Basu, A.; Ray, S.; Chowdhury, S.; Sarkar, A.; Mandal, D. P.; Bhattacharjee, S.; Kundu, S. - **Evaluating the antimicrobial, apoptotic, and cancer cell gene delivery properties of protein-capped gold nanoparticles synthesized from the edible mycorrhizal fungus *Tricholoma crassum*.** *Nanoscale Res Lett*. Vol. 13. n.° 1 (2018). p. 154. ISSN: 1931-7573 (Print) 1556-276x
- [87] Shamaila, S.; Zafar, N.; Riaz, S.; Sharif, R.; Nazir, J.; Naseem, S. - **Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen.** *Nanomaterials (Basel)*. Vol. 6. n.° 4 (2016). ISSN: 2079-4991 (Print) 2079-4991
- [88] Tiwari, P. M.; Vig, K.; Dennis, V. A.; Singh, S. R. - **Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications.** *Nanomaterials (Basel)*. Vol. 1. n.° 1 (2011). p. 31-63. ISSN: 2079-4991 (Print) 2079-4991
- [89] Balasubramanian, S. K.; Jittiwat, J.; Manikandan, J.; Ong, C. N.; Yu, L. E.; Ong, W. Y. - **Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the**

- liver and spleen after intravenous administration in rats.** *Biomaterials*. Vol. 31. n.° 8 (2010). p. 2034-42. ISSN: 0142-9612
- [90] Zhang, Y.; Shareena Dasari, T. P.; Deng, H.; Yu, H. - **Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold.** *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. Vol. 33. n.° 3 (2015). p. 286-327. ISSN: 1059-0501
- [91] Vijayakumar, S.; Krishnakumar, C.; Arulmozhi, P.; Mahadevan, S.; Parameswari, N. - **Biosynthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from leaf extract of *Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC.** *Microb Pathog*. Vol. 116. (2018). p. 44-48. ISSN: 0882-4010
- [92] Krol, A.; Pomastowski, P.; Rafinska, K.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. - **Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism.** *Adv Colloid Interface Sci*. Vol. 249. (2017). p. 37-52. ISSN: 0001-8686
- [93] Jiang, Jinhuan; Pi, Jiang; Cai, Jiye - **The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications.** *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Vol. 2018. (2018). p. 18. Available from: <<https://doi.org/10.1155/2018/1062562>>.
- [94] Happy, Agarwal; Soumya, Menon; Venkat Kumar, S.; Rajeshkumar, S. - **Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route.** *Chem Biol Interact*. Vol. 286. (2018). p. 60-70. ISSN: 0009-2797
- [95] Mishra, P. K.; Mishra, H.; Ekielski, A.; Talegaonkar, S.; Vaidya, B. - **Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications.** *Drug Discov Today*. Vol. 22. n.° 12 (2017). p. 1825-1834. ISSN: 1359-6446
- [96] Moghaddam, A. B.; Moniri, M.; Azizi, S.; Rahim, R. A.; Ariff, A. B.; Saad, W. Z.; Namvar, F.; Navaderi, M. - **Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by a New *Pichia kudriavzevii* Yeast Strain and Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activities.** *Molecules*. Vol. 22. n.° 6 (2017). ISSN: 1420-3049
- [97] Rajabi, Hamid Reza; Naghiha, Reza; Kheirizadeh, Mansoureh; Sadatfaraji, Hamed; Mirzaei, Ali; Alvand, Zinab Moradi - **Microwave assisted extraction as an efficient approach for biosynthesis of zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and biological properties.** *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 78. (2017). p. 1109-1118. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116321646>>. ISSN: 0928-4931
- [98] Sharma, Deepali; Sabela, Myalowenkosi I.; Kanchi, Suvardhan; Mdluli, Phumlane S.; Singh, Gulshan; Stenström, Thor A.; Bisetty, Krishna - **Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Jacaranda mimosifolia* flowers extract: Synergistic antibacterial activity and molecular simulated facet specific adsorption studies.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol. 162. (2016). p. 199-207. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134416303803>>. ISSN: 1011-1344
- [99] Saliani, Mahsa; Jalal, Razieh; Kafshdare. Goharshadi, Elaheh - **Effects of pH and Temperature on Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanofluid Against *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*.** *Jundishapur Journal of Microbiology*. Vol. 8. n.° 2 (2015). p. e17115. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4376975/>>. ISSN: 2008-3645 (Print) 2008-4161
- [100] Mohd Omar, Fatehah; Aziz, Hamidi Abdul; Stoll, Serge - **Stability of ZnO Nanoparticles in Solution. Influence of pH, Dissolution, Aggregation and Disaggregation Effects.** 2014.
- [101] Peng, Cheng; Zhang, Wen; Gao, Haiping; Li, Yang; Tong, Xin; Li, Kungang; Zhu, Xiaoshan; Wang, Yixiang; Chen, Yongsheng - **Behavior and Potential Impacts of Metal-Based Engineered Nanoparticles in Aquatic Environments.** *Nanomaterials*. Vol.

7. n.° 1 (2017). p. 21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5295211/>. ISSN: 2079-4991
- [102] Izak-Nau, E.; Huk, A.; Reidy, B.; Uggerud, H.; Vadset, M.; Eiden, S.; Voetz, M.; Himly, M.; Duschl, A.; Dusinska, M.; Lynch, I. - **Impact of storage conditions and storage time on silver nanoparticles' physicochemical properties and implications for their biological effects.** *RSC Advances*. Vol. 5. n.° 102 (2015). p. 84172-84185. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA10187E>.
- [103] Velgosova, O.; Čižmárová, E.; Málek, J. - **Effect of storage conditions on long-term stability of Ag nanoparticles formed via green synthesis.** *Int J Miner Metall Mater.* Vol. 24:117. (2017). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12613-017-1508-0#citeas>. ISSN: 1869-103X (electronic) 1674-4799 (manual)
- [104] Saude, A.; Franco, O. L. - **Functionalization of nanostructures for antibiotic improvement: an interdisciplinary approach.** *Ther Deliv*. Vol. 7. n.° 11 (2016). p. 761-771. ISSN: 2041-5990
- [105] Hobman, J. L.; Crossman, L. C. - **Bacterial antimicrobial metal ion resistance.** *J Med Microbiol*. Vol. 64. n.° Pt 5 (2015). p. 471-97. ISSN: 0022-2615
- [106] Drake, P. L.; Hazelwood, K. J. - **Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review.** *Ann Occup Hyg*. Vol. 49. n.° 7 (2005). p. 575-85. ISSN: 0003-4878 (Print) 0003-4878
- [107] Alessandrini, Francesca; Vennemann, Antje; Gschwendtner, Silvia; Neumann, Avidan U.; Rothballer, Michael; Seher, Tanja; Wimmer, Maria; Kublik, Susanne; Traidl-Hoffmann, Claudia; Schloter, Michael; Wiemann, Martin; Schmidt-Weber, Carsten B. - **Pro-Inflammatory versus Immunomodulatory Effects of Silver Nanoparticles in the Lung: The Critical Role of Dose, Size and Surface Modification.** *Nanomaterials*. Vol. 7. n.° 10 (2017). p. 300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666465/>. ISSN: 2079-4991
- [108] Korani, Mitra; Ghazizadeh, Elham; Korani, Shahla; Hami, Zahra; Mohammadi-Bardbori, Afshin - **Effects of silver nanoparticles on human health.** 2015. [Accessed: 2018-07-23] t10:25:27.883+02:00. Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/ejnm.2015.7.issue-1/ejnm-2014-0032/ejnm-2014-0032.xml>. 16625986
- [109] Chung, Kian Fan; Seiffert, Joanna; Chen, Shu; Theodorou, Ioannis G.; Goode, Angela Erin; Leo, Bey Fen; McGilvery, Catriona M.; Hussain, Farhana; Wiegman, Coen; Rossios, Christos; Zhu, Jie; Gong, Jicheng; Tariq, Farid; Yufit, Vladimir; Monteith, Alexander J.; Hashimoto, Teruo; Skepper, Jeremy N.; Ryan, Mary P.; Zhang, Junfeng; Tetley, Teresa D.; Porter, Alexandra E. - **Inactivation, Clearance, and Functional Effects of Lung-Instilled Short and Long Silver Nanowires in Rats.** *ACS Nano*. Vol. 11. n.° 3 (2017). p. 2652-2664. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371928/>. ISSN: 1936-0851 (Print) 1936-086X
- [110] Gosens, I.; Cassee, F. R.; Zanella, M.; Manodori, L.; Brunelli, A.; Costa, A. L.; Bokkers, B. G.; de Jong, W. H.; Brown, D.; Hristozov, D.; Stone, V. - **Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure.** *Nanotoxicology*. Vol. 10. n.° 8 (2016). p. 1084-95. ISSN: 1743-5390
- [111] Jacobsen, N. R.; Stoeger, T.; van den Brule, S.; Saber, A. T.; Beyerle, A.; Vietti, G.; Mortensen, A.; Szarek, J.; Budtz, H. C.; Kermanizadeh, A.; Banerjee, A.; Ercal, N.; Vogel, U.; Wallin, H.; Moller, P. - **Acute and subacute pulmonary toxicity and mortality in mice after intratracheal instillation of ZnO nanoparticles in three laboratories.** *Food Chem Toxicol*. Vol. 85. (2015). p. 84-95. ISSN: 0278-6915

- [112] Ramadi, K. B.; Mohamed, Y. A.; Al-Sbiei, A.; Almarzooqi, S.; Bashir, G.; Al Dhanhani, A.; Sarawathiamma, D.; Qadri, S.; Yasin, J.; Nemmar, A.; Fernandez-Cabezudo, M. J.; Haik, Y.; Al-Ramadi, B. K. - **Acute systemic exposure to silver-based nanoparticles induces hepatotoxicity and NLRP3-dependent inflammation.** *Nanotoxicology*. Vol. 10. n.° 8 (2016). p. 1061-74. ISSN: 1743-5390
- [113] Jia, J.; Li, F.; Zhou, H.; Bai, Y.; Liu, S.; Jiang, Y.; Jiang, G.; Yan, B. - **Oral Exposure to Silver Nanoparticles or Silver Ions May Aggravate Fatty Liver Disease in Overweight Mice.** *Environ Sci Technol*. Vol. 51. n.° 16 (2017). p. 9334-9343. ISSN: 0013-936x
- [114] Lee, I. C.; Ko, J. W.; Park, S. H.; Shin, N. R.; Shin, I. S.; Moon, C.; Kim, J. H.; Kim, H. C.; Kim, J. C. - **Comparative toxicity and biodistribution assessments in rats following subchronic oral exposure to copper nanoparticles and microparticles.** *Part Fibre Toxicol*. Vol. 13. n.° 1 (2016). p. 56. ISSN: 1743-8977
- [115] Lee, I. C.; Ko, J. W.; Park, S. H.; Shin, N. R.; Shin, I. S.; Moon, C.; Kim, S. H.; Yun, W. K.; Kim, H. C.; Kim, J. C. - **Copper nanoparticles induce early fibrotic changes in the liver via TGF-beta/Smad signaling and cause immunosuppressive effects in rats.** *Nanotoxicology*. Vol. 12. n.° 6 (2018). p. 637-651. ISSN: 1743-5390
- [116] Almansour, M. I.; Alferah, M. A.; Shraideh, Z. A.; Jarrar, B. M. - **Zinc oxide nanoparticles hepatotoxicity: Histological and histochemical study.** *Environ Toxicol Pharmacol*. Vol. 51. (2017). p. 124-130. ISSN: 1382-6689
- [117] Hwang, J. H.; Kim, S. J.; Kim, Y. H.; Noh, J. R.; Gang, G. T.; Chung, B. H.; Song, N. W.; Lee, C. H. - **Susceptibility to gold nanoparticle-induced hepatotoxicity is enhanced in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis.** *Toxicology*. Vol. 294. n.° 1 (2012). p. 27-35. ISSN: 0300-483x
- [118] Tiwari, R.; Singh, R. D.; Khan, H.; Gangopadhyay, S.; Mittal, S.; Singh, V.; Arjaria, N.; Shankar, J.; Roy, S. K.; Singh, D.; Srivastava, V. - **Oral subchronic exposure to silver nanoparticles causes renal damage through apoptotic impairment and necrotic cell death.** *Nanotoxicology*. Vol. 11. n.° 5 (2017). p. 671-686. ISSN: 1743-5390
- [119] Sarkar, Abhijit; Das, Joydeep; Manna, Prasenjit; Sil, Parames C. - **Nano-copper induces oxidative stress and apoptosis in kidney via both extrinsic and intrinsic pathways.** *Toxicology*. Vol. 290. n.° 2 (2011). p. 208-217. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X11004379>>. ISSN: 0300-483X
- [120] Yan, G.; Huang, Y.; Bu, Q.; Lv, L.; Deng, P.; Zhou, J.; Wang, Y.; Yang, Y.; Liu, Q.; Cen, X.; Zhao, Y. - **Zinc oxide nanoparticles cause nephrotoxicity and kidney metabolism alterations in rats.** *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. Vol. 47. n.° 4 (2012). p. 577-88. ISSN: 1093-4529
- [121] Ibrahim, K. E.; Al-Mutary, M. G.; Bakhiet, A. O.; Khan, H. A. - **Histopathology of the Liver, Kidney, and Spleen of Mice Exposed to Gold Nanoparticles.** *Molecules*. Vol. 23. n.° 8 (2018). ISSN: 1420-3049
- [122] Bulcke, F.; Dringen, R.; Scheiber, I. F. - **Neurotoxicity of Copper.** *Adv Neurobiol*. Vol. 18. (2017). p. 313-343. ISSN: 2190-5215 (Print)
- [123] Attia, Hala; Nounou, Howaida; Shalaby, Manal - **Zinc Oxide Nanoparticles Induced Oxidative DNA Damage, Inflammation and Apoptosis in Rat's Brain after Oral Exposure.** *Toxics*. Vol. 6. n.° 2 (2018). p. 29. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027438/>>. ISSN: 2305-6304
- [124] Feng, Xiaoli; Chen, Aijie; Zhang, Yanli; Wang, Jianfeng; Shao, Longquan; Wei, Limin - **Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles.** *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 10. (2015). p. 4321-4340. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498719/>>. ISSN: 1176-9114 (Print) 1178-2013

- [125] Ferreira, G. K.; Cardoso, E.; Vuolo, F. S.; Galant, L. S.; Michels, M.; Goncalves, C. L.; Rezin, G. T.; Dal-Pizzol, F.; Benavides, R.; Alonso-Nunez, G.; Andrade, V. M.; Streck, E. L.; da Silva Paula, M. M. - **Effect of acute and long-term administration of gold nanoparticles on biochemical parameters in rat brain.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. Vol. 79. (2017). p. 748-755. ISSN: 0928-4931
- [126] Laloy, J.; Minet, V.; Alpan, L.; Mullier, F.; Beken, S.; Toussaint, O.; Lucas, S.; Dogne, J. M. - **Impact of Silver Nanoparticles on Haemolysis, Platelet Function and Coagulation.** *Nanobiomedicine (Rij)*. Vol. 1. (2014). p. 4. ISSN: 1849-5435
- [127] Amde, Meseret; Liu, Jing-fu; Tan, Zhi-Qiang; Bekana, Deribachew - **Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review.** *Environmental Pollution*. Vol. 230. (2017). p. 250-267. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974911730012X>. ISSN: 0269-7491
- [128] Chatel, A.; Mouneyrac, C. - **Signaling pathways involved in metal-based nanomaterial toxicity towards aquatic organisms.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 196. (2017). p. 61-70. ISSN: 1532-0456 (Print) 1532-0456
- [129] Odzak, N.; Kistler, D.; Sigg, L. - **Influence of daylight on the fate of silver and zinc oxide nanoparticles in natural aquatic environments.** *Environ Pollut*. Vol. 226. (2017). p. 1-11. ISSN: 0269-7491
- [130] Lacave, J. M.; Fanjul, A.; Bilbao, E.; Gutierrez, N.; Barrio, I.; Arostegui, I.; Cajaraville, M. P.; Orbea, A. - **Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimp exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 199. (2017). p. 69-80. ISSN: 1532-0456 (Print) 1532-0456
- [131] Global Market Insights Inc. - **Global Silver Nanoparticles Market to exceed \$3 Bn by 2024.** [Accessed: 2018/06/18] Available from: <https://www.gminsights.com/pressrelease/silver-nanoparticles-market>
- [132] Markets and Markets - **Metal Nanoparticles Market by metal (Platinum, Gold, Silver, Iron, Titanium, Copper, Nickel), End-use industry (Pharmaceutical & healthcare, Electrical & electronics, Catalyst, Personal care & cosmetics), and Region - Global Forecast to 2022.** 2018. Available from: https://www.researchandmarkets.com/research/qkwhjr/global_metal?w=4.
- [133] Singh, P.; Pandit, S.; Garnaes, J.; Tunjic, S.; Mokkalpati, V. R.; Sultan, A.; Thygesen, A.; Mackevica, A.; Mateiu, R. V.; Daugaard, A. E.; Baun, A.; Mijakovic, I. - **Green synthesis of gold and silver nanoparticles from Cannabis sativa (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition.** *Int J Nanomedicine*. Vol. 13. (2018). p. 3571-3591. ISSN: 1176-9114
- [134] Zandpour, F.; Allafchian, A. R.; Vahabi, M. R.; Jalali, S. A. H. - **Green synthesis of silver nanoparticles with the Aerial part of Dorema ammoniacum D. extract by antimicrobial analysis.** *IET Nanobiotechnol*. Vol. 12. n.º 4 (2018). p. 491-495. ISSN: 1751-8741 (Print) 1751-8741
- [135] Idrees, M.; Batool, S.; Kalsoom, T.; Raina, S.; Sharif, H. M. A.; Yasmeen, S. - **Biosynthesis of silver nanoparticles using Sida acuta extract for antimicrobial actions and corrosion inhibition potential.** *Environ Technol*. (2018). p. 1-8. ISSN: 0959-3330 (Print) 0959-3330
- [136] Shahriari Ahmadi, F.; Tanhaeian, A.; Habibi Pirkohi, M. - **Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Chlamydomonas reinhardtii and its Inhibitory Effect on Growth and Virulence of Listeria monocytogenes.** *Iran J Biotechnol*. Vol. 14. n.º 3 (2016). p. 163-168. ISSN: 1728-3043 (Print) 1728-3043
- [137] Muthusamy, G.; Thangasamy, S.; Raja, M.; Chinnappan, S.; Kandasamy, S. - **Biosynthesis of silver nanoparticles from Spirulina microalgae and its antibacterial**

- activity.** *Environ Sci Pollut Res Int.* Vol. 24. n.° 23 (2017). p. 19459-19464. ISSN: 0944-1344
- [138] Soleimani, M.; Habibi-Pirkoohi, M. - **Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Chlorella vulgaris* and Evaluation of the Antibacterial Efficacy Against *Staphylococcus aureus*.** *Avicenna J Med Biotechnol.* Vol. 9. n.° 3 (2017). p. 120-125. ISSN: 2008-2835 (Print) 2008-2835
- [139] M, N.; V, N. K.; V, D. R.; A, P. - **Biosynthesis, characterization, and evaluation of bioactivities of leaf extract-mediated biocompatible gold nanoparticles from *Alternanthera bettzickiana*.** *Biotechnol Rep (Amst).* Vol. 19. (2018). p. e00268. ISSN: 2215-017X (Print) 2215-017x
- [140] Li, J.; Li, Q.; Ma, X.; Tian, B.; Li, T.; Yu, J.; Dai, S.; Weng, Y.; Hua, Y. - **Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans* and an evaluation of their antibacterial properties.** *Int J Nanomedicine.* Vol. 11. (2016). p. 5931-5944. ISSN: 1176-9114
- [141] Baker, S.; Satish, S. - **Biosynthesis of gold nanoparticles by *Pseudomonas veronii* AS41G inhabiting *Annona squamosa* L.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Vol. 150. (2015). p. 691-5. ISSN: 1386-1425
- [142] Singh, S.; Vidyarthi, A. S.; Nigam, V. K.; Dev, A. - **Extracellular facile biosynthesis, characterization and stability of gold nanoparticles by *Bacillus licheniformis*.** *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* Vol. 42. n.° 1 (2014). p. 6-12. ISSN: 2169-1401
- [143] Thakker, J. N.; Dalwadi, P.; Dhandhukia, P. C. - **Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense JTI, a Plant Pathogenic Fungus.** *ISRN Biotechnol.* Vol. 2013. (2013). p. 515091. ISSN: 2090-9403 (Print) 2090-9403
- [144] Arockiya Aarthi Rajathi, F.; Parthiban, C.; Ganesh Kumar, V.; Anantharaman, P. - **Biosynthesis of antibacterial gold nanoparticles using brown alga, *Stoechospermum marginatum* (kutzing).** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* Vol. 99. (2012). p. 166-73. ISSN: 1386-1425
- [145] Balagurunathan, R.; Radhakrishnan, M.; Rajendran, R. B.; Velmurugan, D. - **Biosynthesis of gold nanoparticles by actinomycete *Streptomyces viridogens* strain HM10.** *Indian J Biochem Biophys.* Vol. 48. n.° 5 (2011). p. 331-5. ISSN: 0301-1208 (Print) 0301-1208
- [146] Lv, Q.; Zhang, B.; Xing, X.; Zhao, Y.; Cai, R.; Wang, W.; Gu, Q. - **Biosynthesis of copper nanoparticles using *Shewanella loihica* PV-4 with antibacterial activity: Novel approach and mechanisms investigation.** *J Hazard Mater.* Vol. 347. (2018). p. 141-149. ISSN: 0304-3894
- [147] Shoeibi, S.; Mashreghi, M. - **Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Enterococcus faecalis* and evaluation of their antibacterial activities.** *J Trace Elem Med Biol.* Vol. 39. (2017). p. 135-139. ISSN: 0946-672x
- [148] Rajabi, H. R.; Naghiha, R.; Kheirizadeh, M.; Sadatfaraji, H.; Mirzaei, A.; Alvand, Z. M. - **Microwave assisted extraction as an efficient approach for biosynthesis of zinc oxide nanoparticles: Synthesis, characterization, and biological properties.** *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* Vol. 78. (2017). p. 1109-1118. ISSN: 0928-4931
- [149] Sharma, D.; Sabela, M. I.; Kanchi, S.; Mdluli, P. S.; Singh, G.; Stenstrom, T. A.; Bisetty, K. - **Biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Jacaranda mimosifolia* flowers extract: Synergistic antibacterial activity and molecular simulated facet specific adsorption studies.** *J Photochem Photobiol B.* Vol. 162. (2016). p. 199-207. ISSN: 1011-1344
- [150] Gu, H.; Chen, X.; Chen, F.; Zhou, X.; Parsaee, Z. - **Ultrasound-assisted biosynthesis of CuO-NPs using brown alga *Cystoseira trinodis*: Characterization, photocatalytic AOP, DPPH scavenging and antibacterial investigations.** *Ultrason Sonochem.* Vol. 41. (2018). p. 109-119. ISSN: 1350-4177

ATTACHMENTS

Table 1. Examples of green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) developed over the last years.

Specie	Living organism	Morphology	Synthesis	Size (nm)	Activity	References
<i>Bacillus endophyticus</i> SCU-L	bacteria	spherical	extracelular	4.8-6.6 (~ 5.1)	<i>E.coli</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>S.aureus</i>	[44].
<i>Cannabis sativa</i>	plant extract	spherical	extracelular	20-40	<i>P.aeruginosa</i> ; <i>E.coli</i>	[133].
<i>Dorema amoniacum</i> D.	plant extract	spherical	extracelular	~ 28.4	<i>E.coli</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>B.cereus</i> ; <i>S.aureus</i> ;	[134].
<i>Aspergillus niger</i> NRC1731	fungus	spherical	extracelular	3-20	<i>E.coli</i> ; <i>B.mycoides</i> ;	[47].
<i>Sida acuta</i>	plant extract	spherical	extracelular	~ 14.9	<i>E.coli</i> <i>S.aureus</i> ; <i>S.faecalis</i> ;	[135].
<i>Bacillus sp. SBT8</i>	bacteria	spherical to pseudo-spherical	extracelular	1-20	<i>E.coli</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>P.aeruginosa</i> ; <i>L.monocytogenes</i> ; <i>S.aureus</i> ;	[46].
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R13	bacteria	spherical	extracelular	5-25 (~ 8.4)	<i>E.coli</i> ; <i>K.pneumoniae</i> ; <i>P.vulgaris</i> ; <i>S.choleraesuis</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>S.marcescens</i> ; <i>V.cholerae</i> ; <i>L.monocytogenes</i> ; <i>S.aureus</i> ;	[45].
<i>Nigella arvensis</i>	plant extract	spherical	extracelular	2-15	<i>E.coli</i> ; <i>P.mirabilis</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>S.pyogenes</i> ; <i>B.subtilis</i> ; <i>S.aureus</i> ;	[57].
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	plant extract	spherical	extracelular	9-11 (~ 10)	<i>L.monocytogenes</i>	[136].
<i>Spirulina microalgae</i>	microalgae	spherical	extracelular	5-50	<i>Klebsiella sp.</i> ; <i>Staphylococcus sp.</i> ;	[137].
<i>Chorella vulgaris</i>	microalgae	spherical	n.a. ¹	9-11	<i>S.aureus</i>	[138].
<i>Penicillium aculeatum</i> Su I	fungus	spherical	extracelular	4-55	<i>E.coli</i> ; <i>P.aeruginosa</i> ; <i>S.aureus</i> ; <i>B.subtilis</i> <i>M.oxydans</i> ; <i>A.arilaitensis</i> ; <i>S.equorum</i> ; <i>Kocuria sp.</i>	[48].
<i>Artemisia annua</i>	plant extract	spherical	extracelular	2.1-45.2 (~ 10.9)	<i>S.typhi</i>	[55].
<i>Myristica fragans</i>	plant extract	spherical	extracelular	10-70 (~ 25)	<i>S.typhi</i>	[52].
<i>Phoenix dactylifera</i>	plant extract	spherical	extracelular	25-60	<i>B.cereus</i> ; <i>K.pneumoniae</i> ; <i>E.coli</i> ; <i>S.epidermis</i> ; <i>S.aureus</i>	[58].
<i>Eucalyptus</i>	plant extract	spherical	extracelular	25-30	<i>E.coli</i> ; <i>P.aeruginosa</i> ; <i>S.aureus</i>	[51].
<i>Angelica pubescens</i>	plant extract	quasi-spherical	extracelular	20-50	<i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i>	[54].

¹ n.a. – information not available

Table 2. Examples of green synthesis of alternative metal-based nanoparticles with potential antibacterial activity.

Specie	Microrganism	Morphology	Synthesis	Size (nm)	Activity	References
AuNPs						
<i>Trichoderma hamatum</i>	fungus	spherical, pentagonal and hexagonal	extracelular	5-30	<i>P.aeruginosa</i> ; <i>Serratia</i> sp.; <i>B.subtilis</i> ; <i>S.aureus</i> <i>S.typhi</i> ; <i>P.aeruginosa</i> ; <i>E.aerogenes</i>	[84].
<i>Alternanthera bettzickiana</i>	plant extract	spherical	extracelular	80-120	<i>S.aureus</i> ; <i>B.subtilis</i> ; <i>M.luteus</i> ;	[139].
<i>Deinococcus radiodurans</i>	bacteria	spherical, triangular and irregular	intra- and extracellular	~ 43.75	<i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i>	[140].
<i>Pseudomonas veronii AS41 G</i>	bacteria	irregular	extracellular	5-25	<i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i> (+)	[141].
<i>Bacillus licheniformis</i>	bacteria	spherical	extracellular	20-75 (~38)	<i>E.coli</i> ; <i>P.aeruginosa</i> ; <i>B.subtilis</i>	[142].
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense JT1	fungus	n.a. ²	extracellular	~ 22	<i>Pseudomonas</i> sp.	[143].
<i>Stoechospermum marginatum</i>	algae	spherical to irregular	extracellular	18.7-93.7	<i>P.aeruginosa</i> ; <i>V.cholerae</i> ; <i>V.parahaemoliticus</i> ; <i>S. paratyphi</i> ; <i>P.vulgaris</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>K.pneumoniae</i> ; <i>K.oxytoca</i> <i>E.faecalis</i> (+);	[144].
<i>Streptomyces viridogens</i> (HM10)	bacteria	spherical and rod	intracellular	18-20	<i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i>	[145].
CuNPs						
<i>Shewanella loihica</i> PV-4	bacteria	spherical	extracellular	10-16	<i>E.coli</i>	[146].
SeNPs						
<i>Enterococcus faecalis</i>	bacteria	spherical	extracellular	29-195 (~99)	<i>S.aureus</i> (no observed activity against <i>P.aeruginosa</i> , <i>B.subtilis</i> and <i>E.coli</i>)	[147].
ZnONPs						
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	plant extract	spherical	extracelular	32-36	<i>S.dysenteriae</i> ; <i>S.paratyphi</i> ; <i>S.aureus</i> ; <i>B.cereus</i>	[91].
<i>Suaeda aegyptiaca</i>	plant extract	spherical	extracelular	~60	<i>P.aeruginosa</i> ; <i>E.coli</i> ; <i>S.aureus</i> ; <i>B.subtilis</i>	[148].
<i>Pichia kudriavzevii</i>	fungus	hexagonal	extracellular	10-61	<i>E.coli</i> (+); <i>S.marcescens</i> ; <i>B.subtilis</i> (+); <i>S.aureus</i> (+); <i>S.epidermis</i> (++)	[96].
<i>Jacaranda mimosifolia</i>	plant extract	spherical	extracelular	2-4	<i>E.coli</i> ; <i>E.faecium</i>	[149].
CuONPs						
<i>Cystoseira trinodis</i>	algae	spherical	intracellular	6-7.8	<i>E.coli</i> ; <i>S.typhi</i> ; <i>E.faecalis</i> ; <i>S.aureus</i> ; <i>B.subtilis</i> ; <i>S.faecalis</i>	[150].

² n.a. – information not available