

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

LARISSA DE OLIVEIRA CAMARGO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS COM
AMICACINA APLICADAS CONTRA CEPAS RESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii***

São José dos Campos, SP
2021

LARISSA DE OLIVEIRA CAMARGO

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS COM
AMICACINA APLICADAS CONTRA CEPAS RESISTENTES DE *Acinetobacter
baumannii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como parte do processo de avaliação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a Dra. Maiara Lima Castilho
Co-orientador: Prof Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos, SP
2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Camargo, Larissa de Oliveira

Síntese de nanopartículas de prata funcionalizadas com amicacina aplicadas contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* / Larissa de Oliveira Camargo; orientadora, Profa Dra. Maiara Lima Castilho; co-orientador Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2021.

1 CD-ROM, 65 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Nanopartículas. 3. Farmacorresistência Bacteriana. 4. *Acinetobacter baumannii*. I. Castilho, Profa Dra. Maiara Lima, orient. II. Raniero, Prof. Dr. Leandro José, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Larissa de Oliveira Camargo, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 17 de Janeiro de 2022.



Autor(a) da Obra

LARISSA DE OLIVEIRA CAMARGO

**“SÍNTESE DDE NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS COM AMICACINA
APLICADAS CONTRA CEPAS RESISTENTES DE *Acinetobacter baumannii*”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF. DR. NEWTON SOARES DA SILVA

PROF.^ª DR.^ª MAIARA LIMA CASTILHO

PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO

PROF.^ª DR.^ª LUCIANE DIAS DE OLIVEIRA - UNESP

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 07 de dezembro 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida estagiária Rainara Moreno Sanches de Almeida que, apesar da pouca idade, teve maturidade suficiente para influenciar-me e apresentar diferentes oportunidades de pesquisa na Instituição. À família e amigos pelo apoio e incentivo incondicional; à colega de pesquisa Thaís da Silva Veriato e à Professora Maiara Lima Castilho por toda a ajuda, ensinamento e troca de conhecimentos. Agradeço ainda ao Programa de Bolsas da Prefeitura Municipal de São José dos Campos. Sem essas pessoas e o fomento municipal, esse trabalho não teria sido concretizado.

**“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”**

Albert Einstein

CAMARGO, Larissa de Oliveira. **Síntese de nanopartículas de prata funcionalizadas com amicacina aplicadas contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii***. 2021. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2021.

RESUMO

A humanidade se depara com um dos maiores problemas de saúde após décadas de terapia bem-sucedida de acordo com a Organização Mundial da Saúde: bactérias multidrogas resistentes. Dessa maneira, inúmeras pesquisas têm sido realizadas com a intenção de melhorar o espectro de ação dos agentes antimicrobianos existentes e ainda, desenvolver novos fármacos. Há duas substâncias antibacterianas bastante conhecidas, os sais de prata usados desde a Antiguidade e a amicacina, um aminoglicosídeo desenvolvido nos anos 70 com potente atividade contra microrganismos Gram-negativos. Entretanto, devido aos mecanismos evolutivos bacterianos, ambas as drogas perderam a eficácia contra algumas bactérias como *Acinetobacter baumannii*, um bacilo Gram-negativo nosocomial que pode ser letal em pacientes imunologicamente comprometidos. Objetivando reverter essa problemática, esta pesquisa prevê o desenvolvimento de um nanofármaco a partir de nanopartículas de prata funcionalizadas ao antibiótico amicacina e a avaliação do seu potencial bactericida/bacteriostático contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii*. As nanopartículas de prata (AgNPs) foram sintetizadas por meio da redução química entre nitrato de prata e borohidreto de sódio, sendo caracterizadas por espectroscopia UV-Visível na faixa entre 380-400 nm e pelo espalhamento dinâmico de luz. A reação química da carbodiimida foi utilizada para a modificação da amicacina a fim de introduzir grupos dissulfetos no fármaco favorecendo a ligação com as nanopartículas, formando o nanofármaco. A caracterização do processo de modificação do fármaco foi confirmada pela observação dos grupos funcionais moleculares por espectroscopia no infravermelho. Os testes de suscetibilidade como concentração inibitória mínima determinada pela técnica de microdiluição em caldo e concentração bactericida mínima foram realizados de acordo com a padronização internacional ISO 20776-1 usando quatro cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes e uma cepa ATCC (19606) sensível à amicacina para avaliar o potencial bacteriostático e bactericida do nanofármaco (AgNPs@Amicacina) desenvolvido. As AgNPs sintetizadas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 37nm com uma distribuição bimodal e boa estabilidade química. A conjugação da amicacina com a nanopartícula de prata foi efetiva apresentando bandas de absorção específicas caracterizando o nanofármaco sintetizado. Os testes de susceptibilidade mostram uma grande eficácia das AgNPs@Amicacina contra cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* apresentando uma concentração bactericida e bacteriostática de 0,5 µg/mL. Esses estudos demonstram dados promissores para o desenvolvimento de um novo antimicrobiano com dosagens mais baixas de aminoglicosídeos, menores efeitos adversos e maior eficácia aplicados em cepas com perfil multidrogas resistentes.

Palavras-chave: Nanopartícula de prata, resistência bacteriana, amicacina, *Acinetobacter baumannii*.

CAMARGO, Larissa de Oliveira. **Synthesis of Silver Nanoparticles Functionalized with Amikacin Applied Against Resistant *Acinetobacter baumannii***. 2021. 66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia biomédica) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2021.

ABSTRACT

Humanity is faced with one of the biggest health problems after decades of successful therapy according to the World Health Organization: resistant multidrug bacteria. Thus, numerous studies have been carried out with the intention of improving the spectrum of action of existing antimicrobial agents and also developing new drugs. There are two well-known antibacterial substances, silver salts used since antiquity and amikacin, an aminoglycoside developed in the 70s with potent activity against Gram-negative microorganisms. However, due to bacterial evolutionary mechanisms, both drugs lost their effectiveness against some bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, a Gram-negative nosocomial bacillus that can be lethal in immunologically compromised patients. Aiming to reverse this problem, this research foresees the development of a nanodrug from silver nanoparticles functionalized to the antibiotic amikacin and the evaluation of its bactericidal/bacteriostatic potential against resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. Silver nanoparticles were synthesized by chemical reduction between silver nitrate and sodium borohydride, being characterized by UV-Visible spectroscopy in the range between 380-400 nm and by dynamic light scattering. The chemical reaction of carbodiimide was used to modify amikacin in order to introduce disulfide groups in the drug, favoring the bond with the nanoparticles, forming the nanodrug. The characterization of the drug modification process was confirmed by the observation of molecular functional groups by infrared spectroscopy (FT-IR); after coupling with the silver nanoparticle, susceptibility tests such as minimum inhibitory concentration determined by the broth microdilution technique and minimum bactericidal concentration were performed according to the international standardization ISO 20776-1 using four multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains and a amikacin-sensitive ATCC 19606 to assess the bacteriostatic and bactericidal potential of the developed nanodrug. The synthesized AgNPs had a hydrodynamic diameter of approximately 37nm with a bimodal distribution and good chemical stability. The conjugation of amikacin with the silver nanoparticle was effective, showing specific absorption bands characterizing the synthesized nanopharmaceutical. Susceptibility tests show a great efficacy of AgNPs@Amikacin against resistant strains of *Acinetobacter baumannii* at a bactericidal and bacteriostatic concentration of 0.5 µg/mL. These studies demonstrate promising data for the development of a new antimicrobial with lower dosages of aminoglycosides, less adverse effects and greater efficacy applied to strains with a resistant multidrug profile.

Keywords: Silver nanoparticule, Resistance bacteria, Amikacin, *Acinetobacter baumannii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência.....	22
Figura 2 – Diferentes tipos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e suas nomenclaturas.....	30
Figura 3 – Possíveis mecanismos de ação da AgNP e de antibióticos convencionais.	36
Figura 4 – Formas de obtenção de nanopartículas	37
Figura 5 – Etapas da reação entre o ácido lipóico, EDC, sulfo-NHS e amicacina.....	40
Figura 6 – Representação molecular plana dos possíveis produtos de reação da modificação química da amicacina.....	41
Figura 7 – Espectro da solução coloidal de AgNPs.....	47
Figura 8 – Distribuição dos tamanhos das partículas sintetizadas.	48
Figura 9 – Caracterização do antibiótico por espectroscopia UV-Visível.	49
Figura 10 – Análise espectral do processo de diálise do produto de modificação do antibiótico.	50
Figura 11 – Espectro das nanopartículas funcionalizada com a amicacina.	51
Figura 12 – Distribuição dos tamanhos das partículas funcionalizadas com antibiótico.	52
Figura 13 – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier da amicacina e do nanofármaco.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recomendações para frear o surgimento de microrganismos MDR	21
Tabela 2 - Estudos com antibióticos funcionalizados à nanopartículas.....	32
Tabela 3 - Estudos com antibióticos funcionalizados à nanopartículas.....	33
Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade das cepas clínicas.....	44
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM), turbidez em diferentes concentrações de amicacina, complexo amicacina/ácido lipóico e AgNP@Amicacina após 24 h de incubação.	54
Tabela 6 – Concentração bactericida mínima (CBM) para diferentes concentrações de AgNP@Amikacina após 24 h de incubação.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Enzima Acetiltransferase
AgNPs	Nanopertículas de Prata
AL	Ácido Lipóico
ANT	Enzima Adeniltransferase
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APH	Enzima Fosfotransferas
ATCC	American Type Curuture Collection
BHI	<i>Brain heart infusion</i> meio enriquecido de cérebro e coração de carneiro
BrCast	<i>Brazilian Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> – Comitê Brasileiro de Testes de Suscetibilidade Amtimicrobiana
CDC	<i>Centeres for Desease Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COVID-19	Doença causada pelo Coronavírus
CVSRM	Comissão de Vigilância Sanitária em Resistência Microbiana
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDC	N-(3- dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
G20	Grupo dos 20 (Argentina, Austrália, Brasil, Canadá,China, França, Alemanha, Índia, Indonésia, Itália, Japão, Coreia do Sul, México, Rússia, Arábia Saudita, África do Sul, Turquia, Reino Unido e Estados Unidos, além da União Européia)
HIV	Vírus da Imudeficiência Humana
IMP	Imipenemase
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional de Normalização
MDR	Multidroga Resistente

MDRAB	<i>Acinetobacter baumannii</i> Multidroga Resistente
MLST	Tipagem de sequência Multilocus
NDM	New Delhy beta-lactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Para Análise
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
S	Coeficiente de Sedimentação das Proteínas Ribossomais
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda causada pelo Coronavírus
TFN	Fator de Necrose Tumoral
UV-Visível	Espectroscopia na região do Ultravioleta e Visível
VIM	Verona Integron Metallo-betalactamase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Objetivo Geral.....	18
1.2	Objetivos Específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Resistência Bacteriana	19
2.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	25
2.3	Amicacina	28
2.4	Nanotecnologia.....	31
2.4.1	Nanopartícula de Prata.....	34
3	METODOLOGIA	38
3.1	Síntese da Nanopartícula de Prata.....	38
3.2	Diluição da Amicacina.....	39
3.3	Modificação Química da Amicacina.....	39
3.4	Funcionalização das Nanopartículas com Amicacina.....	42
3.5	Caracterização dos Processos	42
3.5.1	Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta.....	42
3.5.2	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier ..	43
3.5.3	Espectroscopia na Região do Ultravioleta Visível.....	43
3.6	Teste de Suscetibilidade.....	43
3.6.1	Obtenção e Acondicionamento das Cepas Bacterianas	44
3.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	45
3.6.3	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Síntese do Nanofármaco	47
4.2	Ensaio de Suseptibilidade.....	54
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Após várias décadas de terapia antimicrobiana bem-sucedida, a humanidade se depara com uma perspectiva preocupante: o surgimento de patógenos resistentes ao tratamento. A falha terapêutica contra bactérias é considerada um dos três maiores problemas da saúde global do século XXI de acordo com a Organização Mundial da Saúde (O'NEILL, 2016). Segundo o relatório de Ameaças de Resistência a Antibióticos do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), mais de 2,6 milhões de infecções são causadas por bactérias multidrogas resistentes nos Estados Unidos e mais de 35 mil mortes são relatadas pela mesma causa anualmente (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019). Estima-se que em 2050, microrganismos multidrogas resistentes (MDR) possam causar prejuízos devastadores, tanto na saúde da população mundial como para a economia, em que cerca de US\$ 100 trilhões será impactado na economia mundial, caso providências para frear o surgimento de microrganismos MDR não sejam adotadas (O'NEILL, 2016). Esses custos estão relacionados ao prolongamento da doença, aumento da mortalidade, aumento da permanência hospitalar, ineficácia de tratamentos preventivos para procedimentos médicos além das perdas econômicas por queda de produtividade provocada pela infecção (LARA *et al.*, 2010). Além disso, esses medicamentos são a base para muitas terapias médicas como a profilaxia para procedimentos cirúrgicos (cesárias, intervenções intestinais, adição de próteses) e para pacientes imunocomprometidos cujo uso contínuo de quimioterápicos garante sua sobrevivência. Tais procedimentos podem ser comprometidos com a falha dos agentes antimicrobianos (O'NEILL, 2016).

A tolerância aos agentes antimicrobianos pode ser desenvolvida pela capacidade evolutiva do microrganismo como uma resposta adaptativa normal sendo uma manifestação dos princípios de Darwin. Isso pode ser provocado pela exposição às drogas bactericidas e a ambientes inóspitos (pressão seletiva) que geram uma modificação genética capaz de produzir ferramentas que garantam a preservação da espécie. Essas modificações podem ser trocadas entre diferentes espécies microbianas através da transferência de DNA extra-cromossômico

(plasmídeo e transposon) contendo informações genéticas de resistência (SARAVANAN *et al.*, 2019).

As estimativas previstas por O'Neill (2016) podem ser antecipadas com a pandemia da Síndrome Respiratória Aguda causada pelo Coronavírus (SARS-CoV-2). Para a maioria dos pacientes infectados com o vírus os sintomas são brandos, mas para aproximadamente 5 % deles, é necessária a admissão em serviços de terapia intensiva e os que apresentam co-morbidades ainda pode haver a necessidade de suporte ventilatório. As internações hospitalares prolongadas, o uso de ventilação mecânica e outros dispositivos invasivos podem favorecer infecções secundárias por outros vírus, bactérias e fungos contribuindo para o aumento do uso de antibióticos (KHOR *et al.*, 2020). Além disso, a azitromicina, um antibiótico da classe dos macrolídeos inibidor da síntese proteica, tem sido utilizada amplamente na profilaxia de co-infecções com a doença causada pelo Coronavírus (COVID-19) mesmo que estudos demonstrem a falta de melhora clínica ou a ineficácia de redução da mortalidade dos pacientes (FURTADO *et al.*, 2020). Embora haja evidências de que o uso empírico de antibióticos não trás benefícios para o paciente, a situação pandêmica pode levar a condutas clínicas desordenadas que acabam sendo padronizadas com a esperança de atingir a cura da doença (FALAVIGNA *et al.*, 2020).

Vaughn *et al* (2021) fizeram uma análise em 38 hospitais de Michigan (Estados Unidos) e observou-se que 56,6% dos pacientes com SARS-CoV-2 receberam terapia antibiótica precocemente. No entanto, apenas 3,5% deles foram diagnosticados com co-infecções causadas por agentes bacterianos. A demora em concluir o diagnóstico da Covid-19 no início da pandemia também contribuiu para as prescrições indevidas do antibiótico (VAUGHN *et al.*, 2021).

A pandemia está deixando sequelas catastróficas: além de dizimar milhares de vidas, a pressão seletiva causada pelo uso excessivo de antibióticos está aumentando a incidência de isolados bacterianos multidroga resistente. Em um estudo observacional retrospectivo, realizado em um hospital universitário em Terni (Umbria/Itália), foi observado um aumento na incidência de pacientes colonizados por enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos, que passou de 6,7% em 2019 para 50% em março-abril de 2020 (TIRI *et al.*, 2020). Embora as estatísticas ainda sejam escassas, dados do Laboratório Central do estado do Paraná demonstraram um aumento de 130% na identificação de cepas de *Acinetobacter baumannii* MDR

comparando os primeiros trimestres de 2019 e 2021. Surtos em unidades de tratamento da Covid-19 causados pela mesma bactéria também foram relatados nesse período (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021).

Segundo Stuart Levy, professor da Tufts – Universidade de Medicina de Massachusetts - em entrevista ao H. Breithaupt (2014), relata que há duas maneiras de combater bactérias MDR: evitar o mau uso dos antibióticos e desenvolver novas drogas juntamente com novas terapias. O uso indevido pode ser evitado por meio da melhora do diagnóstico e agilidade do mesmo, da educação dos profissionais prescritores bem como a atualização no uso veterinário como promotores de crescimento (BREITHAUPT, 2014).

Embora a indústria farmacêutica priorize esforços para a descoberta de novos medicamentos de uso crônico, o desenvolvimento ou modificações de antimicrobianos para melhorar o potencial bactericida também é uma área prioritária das pesquisas da atualidade. Consequentemente, as propriedades bactericidas da prata, que são conhecidas desde a Antiguidade, voltam a ser o centro das atenções em diferentes linhagens de pesquisa. Neste contexto, a nanotecnologia tem se mostrado uma ferramenta promissora na medicina tanto diagnóstica como terapêutica.

A utilização de nanocápsulas como carreadora de medicamentos foi uma das primeiras áreas a ser desenvolvida e uma das mais crescentes nas pesquisas nanotecnológicas (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014). Estudos com nanossistemas são promissores pela possibilidade de melhorias nas áreas farmacêuticas e biomédicas. A escala nanométrica é semelhante à maioria das moléculas e estruturas biológicas o que favorece as análises *in vivo* e *in vitro*. Comparativamente, as nanopartículas metálicas são as que apresentam melhor atividade antibacteriana (PRASAD, 2008).

Explorando as propriedades bactericidas da prata já conhecidas e associando à nanotecnologia, vários estudos têm sido realizados com a intenção de demonstrar os efeitos deletérios sobre microrganismos utilizando nanopartículas de prata (ALI *et al.*, 2016; HUH; KWON, 2011; HUSSEIN-AL-ALI *et al.*, 2014; MANOHAR *et al.*, 2017; RANA *et al.*, 2019). Franci *et al.* (2015) relata o provável mecanismo de ação associado às espécies reativas de oxigênio que os íons de prata geram em contato

com a célula bacteriana. Esse estresse oxidativo provoca a inativação de enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano, inibe síntese proteica e desestabiliza a membrana celular causando morte do microrganismo. Além disso, não há relatos de mecanismos de resistência contra esse potencial antibiótico (FRANCI *et al.*, 2015).

No entanto, pesquisas relacionadas à associação da AgNP com antibióticos são discretas e ainda mais raras tratando-se dos aminoglicosídeos. Tendo em vista o crescente número de casos de patologias associadas a cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes, da necessidade de desenvolver novas drogas capazes de combater bactérias multirresistentes, esse estudo conjuga a antiga capacidade terapêutica da prata associada à nanotecnologia, com um fármaco da mais promissora classe dos antibióticos aminoglicosídeos, a amicacina. Além de enriquecer os estudos relacionados a essa conjugação, o novo nanofármaco poderá ser utilizado como ferramenta alternativa no combate de cepas de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes.

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um agente antimicrobiano a base de nanopartículas de prata funcionalizadas com amicacina, capaz de combater *Acinetobacter baumannii* multidroga resistente incluindo os aminoglicosídeos.

1.2 Objetivos Específicos

- Síntese da nanopartícula de prata e a caracterização das propriedades como concentração, tamanho, polidispersão e estabilidade pelas técnicas de espectroscopia de UV-Visível e Espalhamento Dinâmico de Luz (Do inglês, *Dynamic Light Scattering*, DLS);
- Modificação química do fármaco via carbodiimida sendo determinados os grupos funcionais por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) e por Espectroscopia na região do UV-Visível;
- Síntese do nanofármaco e caracterização das propriedades como concentração, tamanho, polidispersão e estabilidade pelas técnicas de espectroscopia de UV-Visível e DLS;
- Avaliar a concentração inibitória mínima e microbicida mínima do nanofármaco contra cepas de *Acinetobacter baumannii* com perfis de resistência.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Uma breve explanação sobre a problemática é destacada nesta seção. Os mecanismos de resistência bacteriana foram descritos para melhor entendimento das possibilidades de combater tais ferramentas. Os antibióticos da classe de aminoglicosídeos bem como o potencial deletério da nanopartícula de prata também foram revisados.

2.1 Resistência Bacteriana

O uso indiscriminado de antimicrobianos exerce uma enorme pressão seletiva para a manutenção das espécies de microrganismos e isso só é possível, por meio da ampliação dos mecanismos de resistência bacteriana. Não se pode eliminar o uso de antibióticos, por conseguinte, faz-se necessária uma administração racional desses agentes seja por meio de uma seleção criteriosa do medicamento e do tempo de duração da terapia, como também sua indicação apropriada. Desta maneira, o investimento na educação continuada dos prescritores bem como a agilidade do diagnóstico é primordial para evitar que novas cepas tornem-se multirresistentes. No entanto, a falta de acesso a um sistema de saúde eficiente à maior parte da população dificulta o diagnóstico preciso de patologias causadas por bactérias e o tratamento acaba sendo apenas empírico o que nem sempre é o mais adequado. Um exemplo clássico são as infecções do trato respiratório superior que são tratadas indiscriminadamente com antibióticos sem alguma análise mais precisa do agente causador. A demora em isolar e identificar o microrganismo é outra questão de suma importância; isso ocorre porque o próprio metabolismo bacteriano tarda a conclusão diagnóstica nas condições atuais de análises laboratoriais já que a cepa precisa crescer *in vitro* para ser devidamente identificada e testada quanto ao perfil de susceptibilidade frente a drogas específicas ao agente. Esse processo demora pelo menos 48 horas de análise para ser concluído o que leva a equipe médica a tomar decisões baseadas apenas na clínica do paciente porque certas patologias como a sepse são consideradas de alta mortalidade (DE CARVALHO *et al.*, 2010). Uma cistite simples é tratada empiricamente já que os desconfortos dos

sintomas causados ao paciente forçam a uma terapêutica precoce ao diagnóstico final. A pressão exercida sobre os médicos por parte dos doentes e/ou seus familiares, a existência de muitas consultas por dia também contribui com as prescrições errôneas. Outro fator relevante é a falta de adesão ao tratamento correto por parte dos pacientes; é comum suspender a utilização do fármaco após melhora dos sintomas o que pode acarretar reincididas infecciosas com cepas resistentes. O desenvolvimento de resistência também está associado a uma cadeia de uso antibióticos na veterinária, zootecnia e pecuária com fins não apenas terapêuticos, mas como promotores de crescimento o que aumenta a exposição humana e animal a resíduos de antimicrobianos. Ainda ocorre a exposição natural visto que a maior parte dos agentes (ou derivados) de combate a bactérias são encontrados no ambiente, principalmente no solo, e essa coexistência faz com que os microrganismos desenvolvam uma resistência ambiental conhecida como intrínseca (MUNITA; ARIAS, 2016). A inovação em tecnologias de saúde não acompanha a velocidade da adaptação (capacidade natural de defesa) dos microrganismos, sendo outra razão causadora desta resistência. E por fim, a má qualidade e a falta de fiscalização dos insumos farmacêuticos de algumas indústrias que oferecem medicamentos de eficácia duvidosa prejudicam o tratamento adequado, contribuindo para o surgimento de bactérias resistentes (BREITHAUPT, 2014).

Inúmeras medidas têm sido adotadas para evitar o uso indiscriminado de antimicrobianos, dentre elas, a Resolução da Diretoria Colegiada do Ministério da Saúde de número 44 de 26 de outubro de 2010, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação. Essa resolução determina que todos os antibióticos devam ser dispensados com a apresentação da prescrição médica, limitando o acesso, prevenindo a automedicação e uso indevido de tais medicamentos (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

A Nota Técnica número 1 de 2013 da ANVISA determina medidas de prevenção e controle de infecções por enterobacteriales multirresistentes e ainda, cria a Comissão de Vigilância Sanitária em Resistência Microbiana (CVSRM) com a finalidade de coordenar a elaboração, implementação e avaliação do plano de ação sobre resistência aos antimicrobianos no âmbito da vigilância sanitária, propondo ações preventivas sanitária, acompanhar políticas, sugerir e elaborar propostas à

Diretoria Colegiada da ANVISA em assuntos relacionados ao tema resistência aos antimicrobianos (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). E mais recentemente, em função da pandemia da COVID-19, a ANVISA publicou a Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 05/2021 com orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2021).

Na revisão encomendada pelo Primeiro Ministro do Reino Unido à equipe de pesquisas do economista Jim O' Neill para avaliar o impacto econômico causado pela falha terapêutica dos agentes antimicrobianos, o autor faz mais algumas recomendações com a finalidade de frear o surgimento de microrganismos MDR, conforme a Tabela 1 (O'NEILL, 2016).

Tabela 1 – Recomendações para frear o surgimento de microrganismos MDR

• Campanha global de conscientização pública;
• Melhorar as condições sanitárias para prevenir a propagação de infecções;
• Reduzir o uso na agropecuária e sua disseminação;
• Melhorar a vigilância global sobre a resistência bacteriana em humanos e animais;
• Desenvolvimento de novas tecnologias e o incentivo do diagnóstico rápido para os agentes infecciosos;
• Desenvolvimento e uso de vacinas alternativas;
• Melhorar o reconhecimento e a remuneração de profissionais que trabalham com doenças infecciosas;
• Investimento em novos medicamentos e melhora dos existentes;
• Coalisção global entre os G20 e a ONU.

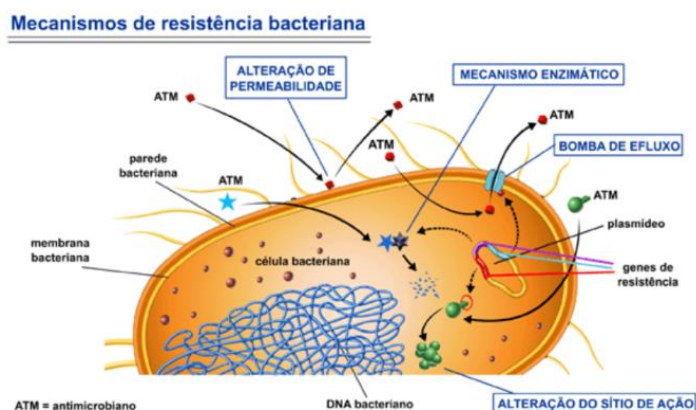
Fonte: O'Neill, (2016).

São consideradas bactérias multirresistentes aquelas resistentes à pelo menos, um agente de três ou mais classes de antimicrobianos. Já há relatos de casos de microrganismos pan-resistentes que são aqueles resistentes a todos os antibióticos testados *in vitro*. No entanto, algumas classes desses microrganismos citam a resistência a um único antibiótico, mas são, frequentemente, resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis. Um exemplo disso, são cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente e *Enterococcus* sp. vancomicina

resistente. No ambiente de serviço de saúde, as principais bactérias multidroga resistentes são *Staphylococcus aureus* metilcolina resistente, *Enterococcus* sp. vancomicina resistente e alguns bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapênicos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

As bactérias podem utilizar mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência aos antimicrobianos. A resistência a determinado fármaco pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie bacteriana ou uma capacidade adquirida. Para que isso ocorra, o DNA bacteriano deve ser alterado seja por mutação ou por introdução do material genético de outra bactéria através da transferência de plasmídeo. Os genes de resistência quase sempre fazem parte de plasmídeos (DNA extracromossômicos), que podem ser transferidos entre microrganismos. Alguns genes de resistência fazem parte de unidades de DNA denominadas transposons que se movem entre cromossomos e plasmídeos transmissíveis. O DNA recombinante pode ser adquirido mediante transformação, resultando em trocas de DNA cromossômico entre espécies, com subsequente recombinação interespecie. As mutações genéticas são energeticamente dispendiosas e só ocorrem em situações de ameaça vital às cepas. Essas mudanças provocam diferentes modificações metabólicas e estruturais no microrganismo ameaçado como: (i) síntese de enzimas capazes de modificar o agente antimicrobiano; (ii) modificação da permeabilidade da membrana celular; (iii) bombas de efluxo para expulsar a substância prejudicial; (iv) mudanças metabólicas via modulação de redes regulatórias (modificações no sítio de ação da droga) (MUNITA; ARIAS, 2016). A Figura 1 representa os principais mecanismos de resistência que as bactérias são capazes de desenvolver frente a pressão causada por antibióticos (AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Figura 1 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência.



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2007).

Notavelmente, uma cepa bacteriana pode desenvolver mais de um mecanismo de resistência para sobreviver à ação dos antibióticos, no entanto alguns microrganismos apresentam certa predileção como é o caso dos Gram-negativos que apresentam com maior frequência a produção de beta-lactamases, enquanto os Gram-positivos desenvolvem preferencialmente modificações nos sítios de ligação da droga (proteína de ligação de penicilina) quando expostos à beta-lactâmicos. Essa observação pode ser justificada pela diferença de composição do envelope celular visto que as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana lipídica externa que regula a entrada dos antibióticos através de canais de porinas e ainda um espaço periplásmico onde se localizam as enzimas de resistência; já os microrganismos Gram-positivos, o antibiótico permeia livremente pela parede peptídeoglicana até os sítios de ação que são as proteínas ligação de penicilinas. A compartimentação existente nos microrganismos Gram-negativos favorece a produção de enzimas ao passo que nos Gram-positivos a modificação do sítio de ligação é preferível. Mas isso não impede que alguns Gram-positivos também produzam enzimas capazes de degradar o anel beta-lactâmico como é o caso da penicilase estafilocócica (MUNITA; ARIAS, 2016).

As modificações na molécula antibiótica são uma das maneiras mais comuns e eficazes de proteção bacteriana; isso ocorre por meio da síntese de enzimas que modificam o antibiótico gerando um produto incapaz de interagir com o sítio de ação. Exemplos podem ser dados por meio das beta-lactamases que degradam o anel beta-lactâmico das penicilinas e as carbapenemases que degradam os antibióticos da classe dos carbapenêmicos. Outra modificação antibiótica importante é a que

ocorre ao nível de ribossomo onde as drogas sofrem acetilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol, estreptograminas), fosforilação (aminoglicosídeos, cloranfenicol), e adenilação (aminoglicosídeos, lincosamidas). Um exemplo comum de modificação de droga são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que alteram covalentemente o grupo hidroxil ou amínico da molécula antibiótica (MUNITA; ARIAS, 2016).

A maioria dos antibióticos precisa penetrar na bactéria para atingir o sítio de ação e a membrana externa é a primeira barreira de proteção que garante a vitalidade do microrganismo. Nas bactérias Gram-negativas essa barreira é mais efetiva em função a baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos e a maioria das substâncias permeiam por canais chamados de porinas (canais de difusão hidrofílicos). Um exemplo dessa defesa natural é a ineficiência do antibiótico vancomicina, um glicopeptídeo quem não tem ação contra Gram-negativos, pois não consegue permear a membrana lipídica. Isso também justifica a baixa suscetibilidade da *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* por apresentarem uma quantidade menor de canais de porinas em relação as demais bactérias Gram-negativas. Vários tipos de modificações nos canais de porinas são bem relatados, no entanto, são de baixo impacto na resistência bacteriana e normalmente estão associadas a outros mecanismos como as bombas de efluxo.

As bombas de efluxo são mecanismos capazes de expulsar substâncias tóxicas às bactérias para fora das células; elas comunicam seletivamente o citoplasma com o meio extracelular. A primeira descrita foi em 1980 encontrada numa *Escherichia coli* (*E. coli*) capaz de expulsar moléculas de tetraciclina; desde esse tempo, muitas outras bombas de efluxo foram caracterizadas tanto em microrganismos Gram-negativos como em Gram-positivos. O sistema pode ser substrato-específico como a tetraciclina para *E. coli* descrito anteriormente, ou droga-inespecífica (fluoroquinolonas, beta-lactâmicos, carbapenêmicos e polimixinas) como encontrada na maioria das bactérias multidroga resistentes. Elas também são capazes de expulsar substâncias não medicamentosas como sais biliares, corantes catiônicos, desinfetantes dentre muitas outras moléculas descritas através de estudos cristalográficos. Desta maneira, as bombas de efluxo contribuem para mais um sistema de resistência bacteriana (LI; ELKINS; ZGURRSKAYA, 2016).

Outra estratégia de proteção das bactérias é impedir a ligação do antibiótico com o sítio de ação. Esse processo pode ocorrer por meio da proteção do alvo ou redução da afinidade entre droga e sítio de ação, sendo esse último o mais comum, afetando a quase todas as classes de antibióticos. Essas mudanças no alvo podem ocorrer por mutações pontuais do tipo metilação e substituição provocadas por alterações enzimáticas e ainda uma mudança conformacional causando um impedimento estérico para a ligação da droga. As bactérias são capazes de reorganizar sua maquinaria utilizando novos mecanismos funcionais de maneira a substituir o que está sendo inibido pelo antibiótico. Um exemplo deste processo de reorganização ocorre com as proteínas ligantes de penicilinas do *S. aureus* meticilina resistente que são substituídas por outras proteínas capazes de continuar sintetizando a parede peptídeoglicana. Aumentar a síntese dos sítios-alvos de maneira a esgotar a concentração inibitória do antibiótico também é mais uma ferramenta de defesa bacteriana. Isso ocorre com a associação sulfametoxazol-trimetoprim, um fármaco capaz de inibir a síntese de ácido fólico que é vital para sobrevivência bacteriana; como forma de resistência, as bactérias produzem mais sítios de ligação que, apesar de alguns serem inibidos pelo fármaco, outros continuam a produzir o folato viabilizando o desenvolvimento bacteriano (MUNITA; ARIAS, 2016).

Embora as pesquisas envolvidas na síntese de novos antibióticos parecem ter estagnadas nos anos 60 e 70, a grande ameaça de bactérias multidroga-resistentes que assombra o século 21 tem alertado o meio científico para a necessidade do desenvolvimento de novas drogas. E para isso, é crucial o conhecimento dos mecanismos de resistências desenvolvidos pelos microrganismos. Também é sabido o fato de que essas cepas irão continuar se adaptando para garantir a integridade da espécie o que torna a pesquisa de novos fármacos e estudo de mecanismos de resistência um processo contínuo, resiliente e estável.

2.2 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter sp. é um cocobacilo Gram-negativo não fermentador, não fastidioso, imóvel, catalase positivo, oxidase negativo e aeróbio, onipresente no solo e na água. A espécie *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) é a bactéria mais

comum associada a infecções na prática clínica e responsável pela maioria dos surtos relatados (LIN, 2014). É uma bactéria nosocomial altamente disseminada capaz de causar infecções fatais em pacientes imunocomprometidos. Está frequentemente associada à colonização de superfícies e equipamentos em unidades de tratamento intensivo sendo a causa de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) que são adquiridas pelo paciente quando submetido a procedimentos clínicos como cirurgias, o uso de tubos endotraqueais, cateteres intravasculares, vasculares e urinários principalmente em centros de terapia intensiva. Os casos de pneumonias associadas à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* têm aumentado em função da pandemia provocada pelo Coronavírus visto que a insuficiência respiratória é um dos principais sintomas em pacientes gravemente infectados. Além disso, *A. baumannii* é uma espécie oportunista que pode causar meningites, infecções urinárias, septicemia e pneumonia. Esse gênero bacteriano possui um maquinário genético versátil que permite o desenvolvimento rápido de vários mecanismos de resistência sendo tolerante a várias classes de antibióticos, o que dificulta o tratamento. Essa resistência se deve mais comumente à aquisição de plasmídeos ou de genes que codificam transposons para enzimas que metabolizam os aminoglicosídeos. A terapia combinada com beta-lactâmicos, carbapenêmicos ou a colistina é necessária na maioria das vezes. Ainda assim, há falhas no tratamento causando a morte de pacientes ou doenças subjacentes que são frequentes nos ambientes hospitalares (MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001). De acordo com estudos de vigilância realizado entre 2007 e 2010 entre hospitais brasileiros, *Acinetobacter* sp. foi o principal agente de sepse apresentado um índice de letalidade de 65,5% (MARRA *et al.*, 2011).

O mecanismo mais comum de resistência desse bacilo sobre os aminoglicosídeos é a modificação de grupos hidroxila ou amino do antibiótico por enzimas modificadoras (VILA *et al.*, 1999). Além das enzimas modificadoras, o *A. baumannii* possui outros mecanismos de resistência como as imipenemases (IMP), a *Verona Integron Metallo-beta-lactamase* (VIM), as carbapenemases de classe D do tipo OXA (capaz de hidrolisar a oxacilina fracamente inibida pelo ácido clavulânico) e ainda a baixa permeabilidade dos beta-lactâmicos em função do número reduzido de porinas (MUNITA; ARIAS, 2016). As bombas de efluxo da família de divisão resistência-modulação-célula (transportador de múltiplas drogas) mostraram estar

envolvidas na resistência ao imipinem e tigeciclina (LIN, 2014; MAGNET; COURVALIN; LAMBERT, 2001). A resistência intrínseca aos aminoglicosídeos pode ser causada pela perda de permeabilidade da membrana citoplasmática enquanto a passagem pela parede externa pode ser lenta, mas não é um mecanismo de resistência clinicamente relevante.

Além dos mecanismos de resistência capaz de desenvolver, essa bactéria ainda conta com uma série de fatores de virulência que aumenta sua toxicidade e patogenicidade. Análises genóticas e fenotípicas identificaram componentes extracelulares com capacidade hemolítica, fosfolipases, proteases e quelantes de ferro, formação de biofilme, motilidade superficial, capacidade de adesão e resistência ao estresse. Assim, para rastrear surtos e controlar a disseminação de cepas de *A. baumannii* multidroga-resistente (MDRAB), tanto em ambiente hospitalar como na comunidade, são utilizadas técnicas moleculares como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), tipagem baseada em PCR (Rep-PCR – do inglês, *Repetitive Extragenic Palindromic elements* - reação da polimerase em cadeia) e tipagem de sequência multilocus (MLST). Com essas metodologias é possível identificar os genes associados aos diferentes mecanismos de resistência e a origem de cada cepa. Além disso, a implementação de novas políticas públicas, vigilância em massa e programas de conscientização combinados são obrigatórios para evitar a disseminação desse microrganismo (JAMAL *et al.*, 2018).

Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com a intensão de melhorar a ação terapêutica contra esse patógeno emergente. No entanto, poucos ensaios foram realizados para estimar a ação deletéria sobre esse microrganismo usando nanopartículas de prata, uma ferramenta com propriedades antimicrobianas bastante promissora. Singh *et al* (2018) identificou uma concentração inibitória mínima de 16 µg/mL de AgNP de origem biosintética com um diâmetro hidrodinâmico de 8 a 12 nm contra cepas de *Acinetobacter baumannii*. O autor também observou o sinergismo na AgNP associando com outros antibióticos como doxacilina, tetraciclina e eritromicina. Outra questão relevante é de que diferentes processos de síntese de nanopartículas de prata geram nanoestruturas com tamanho e características bactericidas diferenciadas destacando a necessidade de mais experimentos sobre a associação de antibióticos e AgNP (SINGH *et al.*, 2018).

2.3 Amicacina

A amicacina é um antibiótico derivado da modificação sintética da canamicina, pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, é um pó branco cristalino com propriedades alcalinas, solúvel em água e com um ponto de fusão entre 201 a 204° C. Sua rotação óptica específica é de +97° a +105° com uma fórmula molecular de base livre de $C_{22}H_{43}NO_{13}$ (RISTUCCIA; CUNHA, 1985). Esta classe de antibióticos recebe essa terminologia por conter açúcares ligados a um anel aminociclitol (garante o sinônimo ao grupo) por meio de ligações glicosídicas. Ainda estão nessa classe de antibióticos a gentamicina, a tobramicina, a netilmecina, a estreptomicina e a neomicina. São ativos principalmente contra bactérias Gram-negativas aeróbias sendo que a estreptomicina é um importante agente com o *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de inibir a síntese proteica bacteriana ligando-se à subunidade ribossomal 30S e 50S, são considerados bactericidas (BRUNTON, 2006).

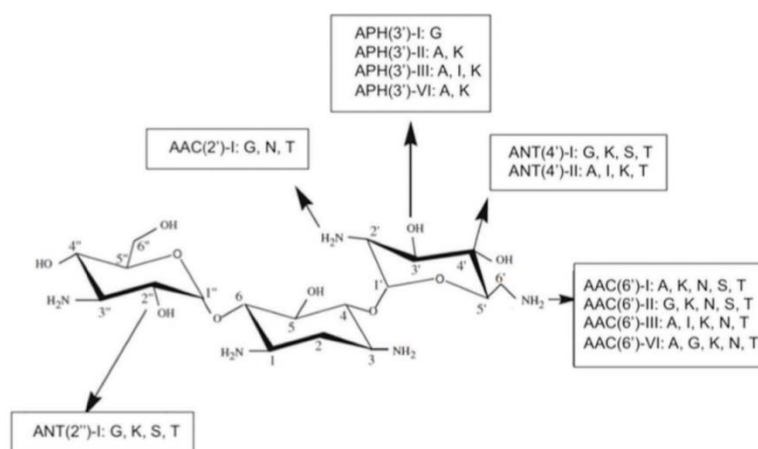
A destruição bacteriana depende da concentração do antibiótico: quanto maior for a dose, maior é a taxa de destruição das bactérias. A amicacina foi disponibilizada para uso terapêutico em 1977 e ainda é muito utilizada com sucesso para tratar diversas infecções apesar do aumento de aminoglicosídeo 6'-N-acetiltransferases tipo I que compromete sua eficácia (RAMIREZ; TOLMASKY, 2017). Os aminociclitóis caracterizam-se por apresentar um efeito pós-antibiótico, isto é, persistência de uma atividade bactericida residual após a queda da concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima (CIM), sendo a duração desse efeito dependente também da concentração do fármaco administrada inicialmente. Essa propriedade é responsável pela eficácia de esquema de dose única diária do fármaco (BRUNTON, 2006).

Essa classe de antibiótico atravessa a membrana externa das bactérias Gram-negativas através dos canais de porina penetrando no espaço periplasmático. A taxa de transporte pode ser afetada pela presença de cátions divalentes (magnésio e cálcio), pelo pH e pela presença de oxigênio. A passagem para o interior do microrganismo depende de um potencial elétrico da membrana para impulsionar a penetração dessas drogas. Por conseguinte, a atividade antimicrobiana é

acentuadamente reduzida no ambiente anaeróbio de um abscesso, na urina ácida hiperosmolar e em outras condições que limitam a fase de absorção dependente de energia. Ao entrar na célula, ligam-se principalmente à subunidade 30S ribossomal interferindo na síntese proteica induzindo leituras erradas na tradução do RNA mensageiro. As proteínas anômalas produzidas irão alterar a permeabilidade celular e estimular o transporte de aminoglicosídeos. Essa desorganização progressiva do envelope bacteriano contribui para o entendimento da ação letal desses antibióticos. A combinação sinérgica com antibióticos β -lactâmicos cujo mecanismo de ação é destruir a parede bacteriana, favorece a penetração da amicacina potencializando ação bactericida contra microrganismos MDR (RISTUCCIA; CUNHA, 1985).

Os vários mecanismos de resistência que as bactérias são capazes de produzir para sobreviver à ação dos aminoglicosídeos já foram relatados, mas cabe destacar que a amicacina é um substrato para apenas algumas enzimas modificadoras de aminociclitóis, logo, cepas resistentes a vários outros antibióticos dessa classe tendem a ser sensíveis à amicacina. As modificações sobre o antibiótico podem ser por meio de acetilação (ACC), adenilação (ANT) ou ainda por fosforilação (APH). A nomenclatura dessas enzimas está de acordo com sua atividade bioquímica, o local de ação (representado por um número de um a seis correspondendo ao carbono do anel de açúcar) e um simples ou duplo símbolo principal para simbolizar que a reação ocorre na primeira ou na segunda porção de açúcar respectivamente. Cada grupo de enzimas é identificado por sua atividade bioquímica da seguinte forma: acetiltransferase (AAC), adeniltransferase (ANT) e fosfotransferase (APH). Em seguida no nome da enzima, um número entre parênteses indica o número do carbono que está inativado. O anel do açúcar em que a reação ocorre é simbolizada por um (primeira porção de açúcar) ou dois apóstrofos (segunda porção de açúcar). Os numerais romanos são usados para diferenciar isoenzimas distintas que atuam no mesmo local. As letras subsequentes referem-se aos antibióticos que são modificados: A, amicacina; G, gentamicina; I, isepamicina; K, canamicina; N, netilmicina; S, sisomicina; T, tobramicina. A Figura 2 representa uma estrutura aminoglicosídica onde os principais pontos de modificação são demonstrados. A proteína AAC (6')-I é a principal encontrada em isolados clínicos de Gram-negativos incluindo *Enterobacteriales*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (MUNITA; ARIAS, 2016).

Figura 2 – Diferentes tipos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e suas nomenclaturas.



Fonte: Munita e Arias (2016).

Os aminoglicosídeos por serem cátions são fracamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e relativamente insolúveis em lipídios. Por essa razão, a via de administração é a injeção intramuscular. Atualmente, recomenda-se dose diária total por meio de uma injeção única, embora fosse administrada em duas ou três doses igualmente fracionadas. Estudos demonstraram que o esquema terapêutico de dose única é menos nefrotóxico e ototóxico em função do efeito limiar do acúmulo do fármaco no ouvido interno ou no rim. A amicacina não é metabolizada, sendo excretada inalterada na urina, é quase que inteiramente filtrada pelos glomérulos. Em pacientes com função renal normal, a droga pode ser completamente eliminada após 24 horas da administração intravenosa. No entanto, devido ao efeito acumulativo, as doses do medicamento devem ser ajustadas em pacientes com depuração da creatinina inferior a 20 a 25 mL/min devendo-se monitorar as concentrações plasmáticas (BRUNTON, 2006; RISTUCCIA; CUNHA, 1985). Ainda considerando o fato de a amicacina ser administrada em pacientes gravemente enfermos, a sua farmacocinética é um tanto desconhecida. Isso porque as atividades fisiológicas nesses pacientes estão comprometidas; pode haver diminuição das proteínas séricas de ligação, falência de órgãos que faz com que o esquema de dosagem seja individualizado de acordo com a resposta fisiológica de cada doente. Esse monitoramento farmacocinético reduz os efeitos adversos e favorece a eficácia terapêutica do fármaco (MARSOT *et al.*, 2017).

A incidência de ototoxicidade está estimada por dados de audiometria em torno de 25% dos pacientes que fizeram uso de aminoglicosídeos. O primeiro sintoma consiste em zumbido alto e, se o antibiótico não for interrompido, pode haver comprometimento auditivo após alguns dias do início do tratamento. Mesmo após o término da terapia, o zumbido pode permanecer por algumas semanas. Ainda é possível ter sintomas clínicos de toxicidade vestibular, em que o paciente pode apresentar sintomas de náuseas, cefaleia e dificuldade de equilíbrio que persistem por uma a duas semanas. A interrupção precoce do tratamento evita a lesão permanente das células ciliadas (BRUNTON, 2006).

Os aminociclítóis também podem causar nefrotoxicidade em cerca de 8 a 26% dos pacientes após vários dias de exposição ao fármaco. Ocorre uma lesão renal aguda não oligúrica causada pela diminuição da filtração glomerular. Essa nefrotoxicidade se deve graças à afinidade do fármaco pelo tecido cortical renal. Os riscos de desenvolver nefrotoxicidade estão aumentados em pacientes com doença renal pré-existente, uso prolongado do aminoglicosídeos e uso de outros medicamentos que danificam os rins. Ainda que leve e reversível o comprometimento da função renal, esses medicamentos devem ser administrados com cautela em pacientes nefropatas. Apesar dos efeitos adversos, os aminoglicosídeos são importantes armas contra bactérias multidroga-resistentes e amplamente utilizados em hospitais (DE FRANÇA, 2013).

2.4 Nanotecnologia

O estudo de materiais com dimensões nanométricas (um milionésimo de metro) tem sido relevante desde o final do Século XX. A Nanotecnologia parece ser uma promissora ferramenta na medicina tradicional. Sua aplicabilidade no tratamento, no monitoramento e diagnóstico de doenças tem sido referida como nanomedicina. Uma área de pesquisa multidisciplinar apresentando aplicabilidade no campo da física, das engenharias, da química, da saúde e da informática. O tamanho dos nanomateriais assemelha-se às moléculas e estruturas biológicas favorecendo as pesquisas tanto na área de diagnóstico como na área terapêutica. Por definição, a dimensão externa da partícula deve estar entre 1,0 nm (nanômetro)

e 100 nm, sendo que um nanômetro é cerca de 100.000 vezes menor que a espessura de um fio de cabelo humano. As nanopartículas podem ser de diferentes materiais como polímeros, metais ou cerâmicas, mas os nanomateriais de origem metálica são os que apresentam maiores propriedades bactericidas, sendo o foco desta pesquisa. Além disso, nanopartículas exibem propriedades físicas diferentes do íon e do material no estado fundamental já que a área superficial apresenta mais átomos na superfície aumentando sua reatividade. Outra importante característica é a possibilidade de incorporar diferentes moléculas bioativas às nanopartículas que garante avanços na medicina relacionados ao diagnóstico e terapêutica de diferentes patologias. Essa interação pode ser por ligação covalente, adsorção e quimiosorção. Com essas promissoras ferramentas, a produção de nanomateriais com elevado controle dos seus parâmetros físico-químicos está cada vez mais eficiente (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014; PRASAD, 2008).

Visando melhorar o potencial deletério das drogas antibacterianas, seja por meio de novos mecanismos de ação e/ou por meio da inibição da engenharia de resistência das mesmas, pesquisadores do mundo inteiro têm realizado estudos associando antibióticos às nanopartículas. A Tabela 2 apresenta alguns estudos disponíveis utilizando essa funcionalização, mas publicações trabalhando com apenas nanopartículas metálicas contra microrganismos são bastante extensas.

Tabela 2 - Estudos com antibióticos funcionalizados à nanopartículas.

(continua)

ESTUDO	REFERÊNCIA
Efeitos das nanopartículas de prata em combinação com antibióticos contra <i>Acinetobacter Baumannii</i> resistente.	Wan <i>et al.</i> , (2016)
Eficácia bactericida de nanopartículas de prata estabilizada por polímero em conjugação com diferentes classes de antibióticos.	Kaur e Kumar (2019)
A eficácia do imipenem conjugado com nanopartículas de prata contra isolados clínicos de <i>Acinetobacter Baumannii</i> .	Zendegani e Dolatabadi (2020)

Tabela 3 - Estudos com antibióticos funcionalizados à nanopartículas.

(conclusão)

ESTUDO	REFERÊNCIA
Extrato de Aloe Vera funcionalizado com nanopartículas de óxido de zinco como nanoantibióticos contra isolados bacterianos clínicos multirresistentes.	(Ali <i>et al.</i> , (2016))
Síntese, caracterização, liberação controlada e estudos antibacterianos de um novo nanoantibiótico magnético de estreptomicina ligada à quitosana.	Hussein-Al-Ali <i>et al.</i> ,(2014)
Nanoantibióticos: um novo paradigma para o tratamento de doenças infecciosas usando nanomateriais na era de resistência a antibióticos.	Huh e Kwon (2011)
Formulações nanoantibióticas para combater a resistência antibiótica – velho vinho em uma nova garrafa.	Rana <i>et al.</i> , (2019)
Nanoantibióticos: uma terapia do futuro.	Manohar <i>et al.</i> ,(2017)
Destruindo a resistência bacteriana e prevenção da toxicidade das células de mamífero através do desenho racional de nanopartículas funcionalizadas com antibióticos.	De Oliveira Affonso <i>et al.</i> , (2017)

Fonte: a autora.

O diâmetro nanométrico é uma vantagem desse sistema, no entanto, pode causar efeitos adversos em função da capacidade de penetração, maior reatividade e efeito acumulativo sejam no usuário como no ambiente. Os efeitos nanotóxicos são pouco conhecidos, mas é sabido que características como dose, tamanho, composição química, morfologia, estado de agregação e aglomeração influenciam tanto no potencial benéfico como maléfico dos nanossistemas. A interação dos radicais reativos gerados pelos nanoantibióticos pode provocar um estresse oxidativo celular que pode causar hepatotoxicidade, toxicidade pulmonar e nefrotoxicidade. Não foi encontrado relatos sobre a interação dos nanomateriais com o sistema nervoso central (HUH; KWON, 2011). Desenvolvimento de nanofármacos é uma área de pesquisa muito promissora que tem pela frente alguns desafios a ser

desvendados até que tal tecnologia possa ser oferecida com segurança para a humanidade e meio ambiente. Um deles é o desenvolvimento de modelos capazes de prever o efeito cumulativo e potencial tóxico desses materiais sobre os usuários e sobre a natureza respeitando as normas éticas de biossegurança.

Além das questões de toxicidade que devem ser superadas, o processo de síntese em pequena escala como as utilizadas em laboratórios de pesquisa também precisa ser melhorado, pois é um tanto dispendioso tendo em vista que as nanopartículas metálicas têm a tendência natural de se agregarem ou crescerem. No entanto, com o surgimento da microscopia eletrônica de transmissão, e novas ferramentas de análises, a avaliação de tais sistemas tornou-se mais concreta favorecendo o aperfeiçoamento dos processos de síntese (ZARBIN, 2007).

2.4.1 Nanopartícula de Prata

Há muito se conhece as propriedades deletérias da prata sobre microrganismos; desde a Antiguidade já se usava jarros de prata para armazenar água potável e seus efeitos são estudados desde meados de 1800. Com o surgimento da penicilina na década de quarenta do século passado, os coloides de prata caíram em desuso. Toda via, com crescente aumento de microrganismos resistente aos antibióticos convencionais e a busca por novas alternativas de tratamento, a prata volta a ser estudada, mas de uma maneira otimizada por meio de nanossistemas (RAI *et al.*, 2012). A prata é um metal encontrado na natureza na sua forma fundamental; acredita-se que tenha sido o terceiro material a ser manipulado pelo homem, após a descoberta do ouro e do cobre. É um metal brilhante, maleável, pouco reativo e resistente à corrosão; esse caráter nobre justifica a sua utilização no fabrico de joias e ornamentos. Também é muito utilizada na indústria fotográfica, radiográfica e produção de materiais odontológicos (MELO *et al.*, 2012).

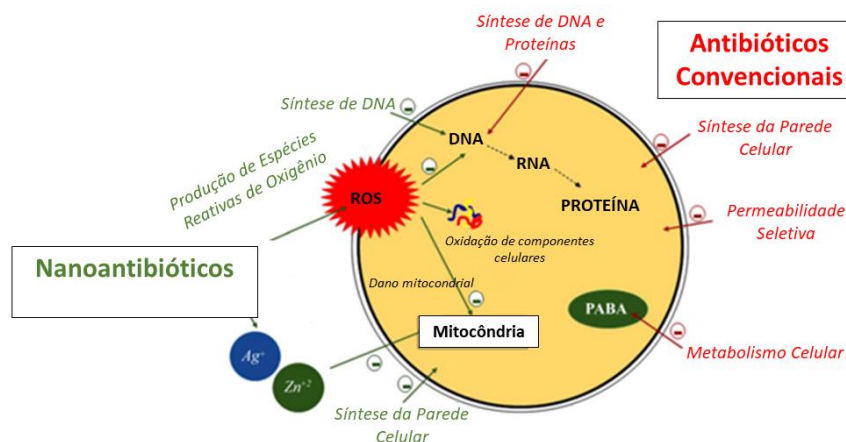
Íons de prata são altamente reativos e ligam-se às proteínas bacterianas provocando mudanças estruturais na parede celular e membrana causando a destruição do microrganismo; também desnaturam proteínas ribossomais devido à afinidade por grupos tióis alterando a síntese de substâncias essenciais ao

metabolismo. Essas características demonstram a propriedade bactericida da prata; já a ligação com o fósforo inibe a ação de fosfoquinases envolvidas em todo o metabolismo bacteriano, inclusive na replicação do DNA que garante atividade bacteriostática (SINGH *et al.*, 2018). Essas propriedades são exploradas pela indústria farmacêutica na síntese de antibióticos; seu maior uso está associado à sulfadiazina para o tratamento de queimaduras frequentemente contaminadas com *Pseudomonas aeruginosa* que, assim como *Acinetobacter baumannii*, é um bacilo Gram-negativo não fermentador de difícil erradicação em função dos mecanismos de resistência desenvolvidos; colírio em solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) 1% ainda é indicado para evitar o risco de oftalmia gonocócica em neonatos. Além disso, a prata tem sido empregada no revestimento de cateteres, válvulas cardíacas e outros materiais médicos com a finalidade de retardar o desenvolvimento de biofilmes microbianos a partir da mesma propriedade bactericida/bacteriostática do íon prata (DE SOUZA *et al.*, 2013).

Com o advento da nanotecnologia, a prata tem sido explorada nessa escala com a finalidade de potencializar seus efeitos contra microrganismos. Em um tamanho menor que 100 nm, uma nanopartícula de prata (AgNP) tem entre 10.000 e 15.000 átomos de prata. Quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior será a área de superfície em proporção ao volume com propriedades físico-químicas específicas e maior reatividade, o que resulta numa atividade bactericida mais elevada. Essa ação é potencializada pela presença dos íons livres da prata em solução aquosa. Outra vantagem são os raros relatos de resistência bacteriana frente à prata o que pode ser atribuído aos diferentes mecanismos de ação do metal agindo em sinergismo contra os processos vitais bacterianos (FRANCI *et al.*, 2015).

O potencial deletério da AgNP pode ser aumentado seja efeitos aditivos ou sinérgicos quando associado a antibióticos cujos mecanismos de ação são diferentes. As diversas formas de como a nanopartícula age contra as bactérias bem como os principais sítios de ação dos antibióticos convencionais estão demonstradas na Figura 3.

Figura 3 – Possíveis mecanismos de ação da AgNP e de antibióticos convencionais.



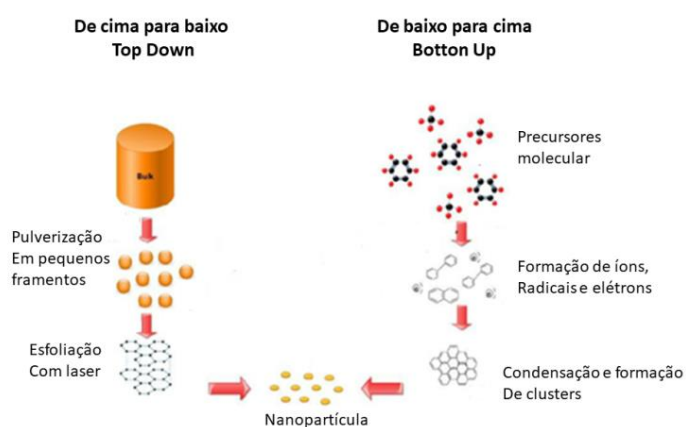
Fonte: Adaptado de Rana *et al.*, (2019).

A amicacina atua inibindo a síntese proteica ligando-se à subunidade ribossomal 30 S da bactéria. Associando-se à AgNP, é esperado que ocorra um sinergismo e a ação bactericida seja potencializada já que a produção de espécies reativas de oxigênio provocadas pela prata, inviabiliza o crescimento bacteriano seja por inibição da parede bacteriana, ou por estresse oxidativo celular. Além da atividade contra um amplo espectro de bactérias, inclusive as multidroga-resistentes, as nanopartículas de prata com diâmetro entre 5 a 20 nm pode evitar a replicação do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e são potentes contra fungos como *Candida*, *Aspergillus*, e *Sacharomyces*. As AgNPs também auxiliam o processo de reparo do sistema imunológico suprimindo a liberação de fator de necrose tumoral (TFN), interleucinas e induzem a apoptose de células inflamatórias. Devido a sua propriedade modulatória sobre citocinas, a AgNP apresenta características cicatrizantes no tratamento de feridas e, por essa razão, existem disponíveis no mercado, vários curativos impregnados com as nanopartículas.

A ação nociva contra microrganismos, tanto do íon prata como da nanopartícula, já é bem conhecida em função dos mecanismos elucidados anteriormente. Ainda assim, essas propriedades podem ser potencializadas quando associada a um antibiótico de amplo espectro. Esses esforços têm a intenção de oferecer novas alternativas no combate de bactérias multidroga resistentes (MORONES *et al.*, 2005).

Nanoestruturas podem ser sintetizadas de duas maneiras: de baixo para cima (*bottom up*), ou de cima para baixo (*top down*). A primeira maneira baseia-se na síntese a partir dos elementos básicos como átomos e moléculas; já a segunda, é como um trabalho de lapidação do macromaterial até conseguir a escala nanométrica usando etapas de corrosão química seletiva ou moagem com alto consumo de energia. Uma representação esquemática de tais processos é demonstrada na Figura 4 (IQBAL; PREECE; MENDES, 2012).

Figura 4 – Formas de obtenção de nanopartículas



Fonte: Adaptado de IQBAL, Preece e Mendes, (2012).

A técnica de síntese de baixo para cima é preferida no âmbito das pesquisas. Isso porque é considerada de menor custo, gera menos resíduos, permite trabalhar com protótipos miniaturizados e tem uma ampla gama de possibilidade de síntese a partir dos diferentes produtos químicos (IQBAL; PREECE; MENDES, 2012).

3 METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Laboratório de Bionanotecnologia, Laboratório de Nanossensores e Central Analítica Multiusuários da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP). Todas as normas de biossegurança preconizadas pelo Ministério da Saúde foram seguidas bem como a adequada paramentação conforme as precauções universais.

3.1 Síntese da Nanopartícula de Prata

A obtenção das AgNPs foi realizada da redução do íon prata em meio aquoso por meio da metodologia *bottom up*. O agente redutor utilizado foi o borohidreto de sódio e o doador de prata sendo o nitrato de prata. A reação ocorre com um excesso de borohidreto que garante uma camada de cargas negativas adsorvidas na superfície da AgNPs formada impedindo sua agregação em função da repulsão eletrostática entre as partículas. Isso faz-se necessário porque soluções coloidais são instáveis visto que a agregação é energeticamente favorável em função das forças de atração do metal. Outro fator que pode provocar a agregação das nanopartículas são impurezas tanto nas matérias-primas utilizadas como nas vidrarias. Por essa razão, todos reagentes são de grau P.A. e todas as vidrarias foram previamente lavadas com uma solução de água régia.

A síntese baseou-se na metodologia descrita por Solomon *et al.* (2007). As concentrações dos reagentes foram calculadas baseadas na relação estequiométrica de duas partes de borohidreto para uma parte de nitrato de prata. Dessa maneira, uma solução de 30 mL de borohidreto de sódio contida em um Erlenmeyer de 100 mL foi resfriada em um banho ultratermostático sobre uma placa magnética de agitação constante por 35 min. Reduzir a energia do sistema, induz a formação de partículas menores, portanto o processo de síntese ocorre em baixas temperaturas (entre 2 a 3 °C). Após este período, um volume de 10 mL de solução de nitrato de prata foi adicionado ao agente redutor. A medida que o nitrato de prata vai sendo reduzido pelo borohidreto, a solução do Erlenmeyer torna-se amarelada, indicando a formação das nanopartículas de prata. Isso ocorre pela incidência da luz

que cria uma oscilação dos elétrons conhecida como ressonância plasmônica (SOLOMON *et al.*, 2007). Ao término da reação, a solução foi caracterizada por espectroscopia no UV-visível e por DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering* – Espalhamento Dinâmico da Luz). A quantificação da síntese é determinada pela Equação 1, em que A representa a absorvância no comprimento de onda de máxima absorção obtida pelo UV-Visível das AgNPs, ϵ é o coeficiente de extinção que varia de acordo com o tamanho da partícula e b é o caminho óptico percorrido (NAVARRO; WERTS, 2013).

$$\text{Concentração AgNPs} = \frac{A}{\epsilon b} \quad [\text{Equação 1}]$$

3.2 Diluição da Amicacina

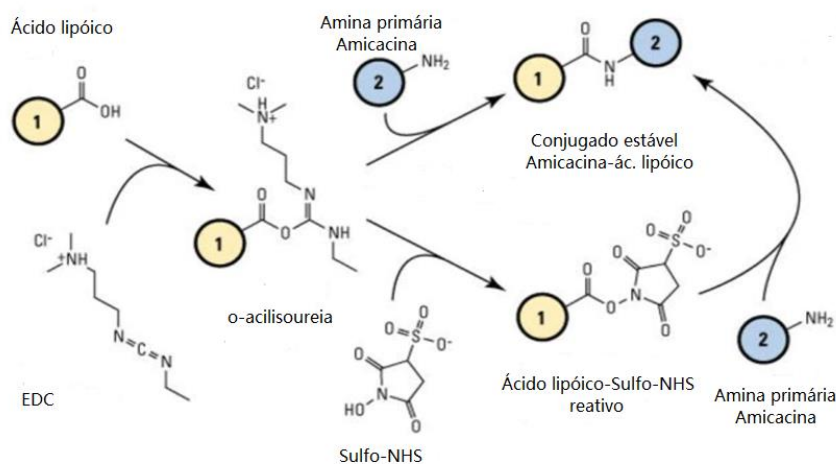
A amicacina foi diluída em solução aquosa em uma concentração de 500 µg/mL. A partir desta concentração uma diluição seriada foi realizada na proporção de 1:2 e as amostras foram caracterizadas pela Espectroscopia UV-Visível. A concentração do fármaco utilizada nos experimentos foi determinada por meio da equação da reta calculada em função da concentração teórica do fármaco puro diluído e a absorvância no comprimento de onda de máxima absorção (204 nm) seguida dos princípios da Lei de Lambert-Beer. Os dados foram plotados com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1

3.3 Modificação Química da Amicacina

Uma das formas de funcionalização das nanopartículas ocorre por meio de interações com grupos tióis. Devido ao fato do fármaco de estudo não possuir tal grupo, faz-se necessária uma modificação química sendo realizada pela via carbodiimida. Nessa reação, os grupamentos amínicos da amicacina são ligados ao ácido lipóico (AL) que contém um grupamento dissulfeto (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). Este linker, além promover a ligação da amicacina na área superficial das AgNPs, estabiliza o coloide para a aplicação em sistemas biológicos e pode proteger o fármaco da ação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos responsáveis pelo principal mecanismo de resistência bacteriana.

O agente mais utilizado para essa classe de reações em meio aquoso é o N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), presente geralmente na forma protonada em meio levemente ácido (pH entre 4 e 6). O EDC atua como ativador do grupo carboxílico presente na molécula do ácido lipóico, sendo empregado juntamente com o reagente N-hidroxissuccinimida (sulfo-NHS), o qual atua como estabilizante do intermediário de reação, aumentando assim a eficiência do processo. Na primeira etapa da reação para a formação do complexo Amicacina-AL, o ácido lipóico foi solubilizado em uma mistura de metanol e tampão PBS (pH 6,2) na proporção de 1:1. Desta solução, 308 µL foi adicionado à 990 µL de sulfo-NHS e 900 µL de EDC. Essa solução ficou sob agitação durante 30 minutos a 150 rpm. Nessa etapa, ocorre a formação do produto intermediário O-acilisourea que adquire estabilidade na reação, agindo como um facilitador para a ligação do antibiótico. Na segunda etapa, foi adicionada à solução 1050 µL de amicacina 6,83 mM e o pH foi corrigido até 7,0 com a adição de NaOH a 0,5 M. As etapas da modificação química são demonstradas na Figura 5.

Figura 5 – Etapas da reação entre o ácido lipóico, EDC, sulfo-NHS e amicacina.



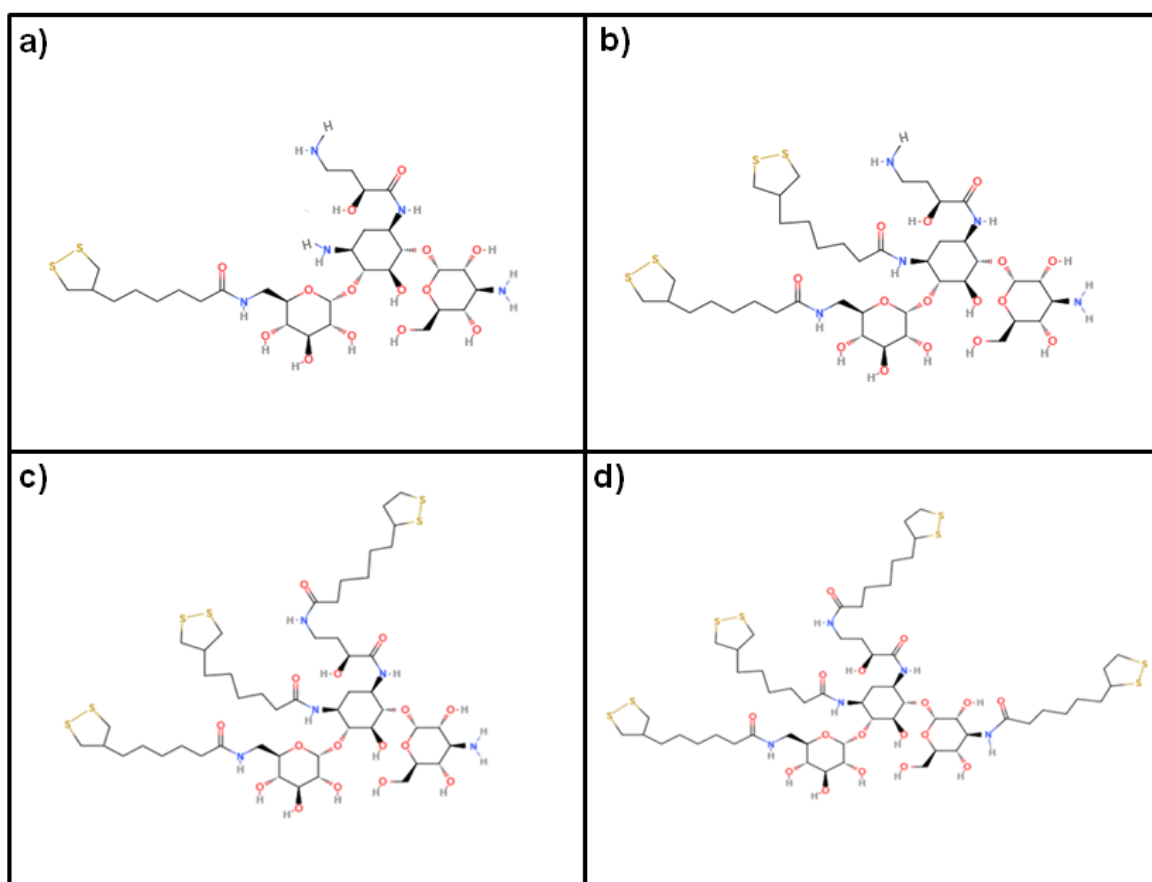
Fonte: adaptado de Thermo Fisher Scientific (2021)

A quantidade de moléculas de ácido lipóico adicionado na reação foi de na proporção de 1:1 para moléculas de amicacina. Embora o fármaco apresente quatro aminas primárias reativas espera-se que ocorra a ligação de apenas uma molécula de ácido lipóico deixando as demais livres para interagir com a subunidade ribossomal 30 S da bactéria. Levando em consideração uma distribuição binomial

onde o sucesso da ligação é de 50 % e que existem quatro possibilidades de reação, a probabilidade que ocorra a ligação de uma molécula de ácido lipóico para cada molécula de amicacina é de 25 %. No entanto, apenas a amicacina não ligada ao ácido lipóico é removida no processo de diálise e todas as demais possibilidades de complexo formada serão ligadas à AgNP.

Análises foram feitas no UV-Visível para avaliar a efetividade da reação entre o ácido lipóico/amicacina e então, iniciou-se o processo de purificação da síntese. Essa etapa foi realizada por meio de diálise com membrana de porosidade 0.5 KDa (Repligen 131090T) até que todos os subprodutos de síntese fossem reduzidos, sendo observado a banda característica de formação do complexo no espectro de UV-Visível. Ao final da modificação química e do processo de diálise, as prováveis estruturas moleculares formadas estão demonstradas na Figura 6.

Figura 6 – Representação molecular plana dos possíveis produtos de reação da modificação química da amicacina. a) uma molécula de amicacina ligada a uma molécula de ácido lipóico; b) uma molécula de amicacina ligada a duas moléculas de ácido lipóico; c) uma molécula de amicacina ligada a três moléculas de ácido lipóico; e d) uma molécula de amicacina ligada a quatro moléculas de ácido lipóico.



Fonte: a autora.

3.4 Funcionalização das Nanopartículas com Amicacina

O processo de funcionalização ocorre por interação química entre a amicacina modificada com a nanopartícula sob agitação constante durante 24 horas. Cálculos para avaliar a quantidade de antibiótico necessário para recobrir toda a área superficial da nanopartícula de prata foram feitos a partir da equação 2, em que o d corresponde ao diâmetro da nanopartícula e A é a área de superfície polar topológica do fármaco.

$$\text{Quantidade de Amicacina} = \frac{\pi d^2}{A} \quad [\text{Equação 2}]$$

As amostras foram armazenadas a 4° C e ao abrigo da luz até sua utilização. A quantificação e caracterização do nanofármaco (AgNPs@Amicacina) foi realizada utilizando a análise de espectroscopia UV-visível, DLS e por espectroscopia FT-IR.

3.5 Caracterização dos Processos

A determinação da estabilidade, do tamanho e a caracterização de todos os processos de síntese do nanofármaco foram elucidados pelas técnicas de caracterização descritas a seguir.

3.5.1 Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta

A análise por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) permite estimar o diâmetro hidrodinâmico médio as partículas e determinar a estabilidade do coloidal. Assim, para a obtenção do diâmetro hidrodinâmico um volume de 400 μL da solução coloidal foi adicionada à cubeta de poliestireno (Modelo ZEN0118, Sarstedt), sendo mensurada pelo equipamento ZetaSizer nano – ZS90 (Malvern), no modo “Size”. Uma média de três análises por amostragem foi realizada para a obtenção do resultado e com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1 os dados exportados foram plotados.

A estabilidade do material nanoestruturado foi determinada em triplicata por meio da análise do potencial Zeta utilizando o equipamento ZetaSizer nano – ZS90 (Malvern), no modo “Zeta”. A solução coloidal foi adicionada à cubeta capilar com eletrodo (modelo DTS1070, Malvern) utilizando uma seringa, para evitar a formação de bolhas de ar.

3.5.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) utilizando o espectrofotômetro FT-IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer). As condições adotadas para as análises foram: Região 4000 a 900 cm^{-1} ; resolução espectral de 4 cm^{-1} ; 16 varreduras; modo de transmitância, em que as amostras foram depositadas na superfície do cristal de seleneto de zinco com diamante do acessório UATR para a aquisição dos espectros.

3.5.3 Espectroscopia na Região do Ultravioleta Visível

Os espectros UV-Visível foram coletados no espectrofotômetro DeNovix DS11 (DeNovix Inc., USA), na região de 190-840 nm com resolução espectral de 1 nm e caminho óptico de 1 cm. Para as leituras, foram utilizados 2 μL da amostra depositadas no pedestal do equipamento. Com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1 os dados exportados foram plotados.

3.6 Teste de Suscetibilidade

Os ensaios foram realizados com cepas bacterianas da espécie *Acinetobacter baumannii* sendo que a cepa padrão é sensível à amicacina e as cepas clínicas apresentam um perfil de resistência. Os testes aplicados foram a determinação da concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima utilizando o fármaco na sua composição inalterada e funcionalizada na superfície das nanopartículas de prata. O perfil de susceptibilidade do complexo amicacina-AL

também foi testado com a finalidade de avaliar a funcionalização como vantajosa para a ação terapêutica do fármaco.

3.6.1 Obtenção e Acondicionamento das Cepas Bacterianas

A cepa de *A. baumannii* ATCC 19606, bem como as quatro cepas clínicas utilizadas foram cedidas pelo Laboratório Oswaldo Cruz de São José dos Campos por meio de um convênio. O perfil de suscetibilidade e identificação das cepas clínicas foi confirmado por sistema de automação no equipamento BD Phoenix™ cuja interpretação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) está em concordância com as normas padronizadas pelo Comitê Brasileiro de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCast - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Na Tabela 4 apresenta o teste de susceptibilidade das cepas clínicas frente a outros antibióticos levando em consideração o perfil de resistência intrínseca à ampicilina, amoxicilina-clavulanato, aztreonam, cefazolina, cefalotina, cefalexina, cefadroxil, cefotaxima, ceftriaxona, ertapenem, trimetoprima, fosfomicina, tetraciclina e doxicilina evidenciando o perfil de multirresistência das bactérias do estudo (TABELA-PONTOS-DE-CORTE-CLINICOS-BRCAS-T-V1-MAR-2021). O perfil de sensibilidade frente à colistina não foi possível confirmar por limitações da técnica.

Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade das cepas clínicas.

Antibiótico	Cepas Clínicas							
	AB1		AB2		AB3		AB4	
	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SIR	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SIR	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SIR	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SIR
Amicacina	>12	R	>32	R	>32	R	16	R
Ampicilina-Sulbactam	16/8	R	16/8	R	>16/8	R	>16/8	R
Ciprofloxacina	>2	R	>2	R	>2	R	>2	R
Gentamicina	>8	R	>8	R	>8	R	>8	R
Imipenem	>8	R	>8	R	>8	R	>8	R
Levofloxacina	>4	R	>4	R	>4	R	4	R
Meropenem	32	R	32	R	>32	R	>32	R

SIR, classificação de acordo com especificações do BrCast; S = sensível; I = intermediário; R = resistente.

Fonte: a autora.

Apenas a cepa ATCC é sensível à amicacina apresentando uma CIM de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e as demais são resistentes apresentando uma CIM maior que 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As cepas foram armazenadas no freezer a -80°C em meio líquido enriquecido (caldo

BHI – *Brain Heart Infusion*) contendo 20% de glicerol em microtubos. Para a reativação as cepas foram semeadas em caldo BHI a 35° C por 24 horas e caracterizadas como pré-inóculo. Posteriormente, foram semeadas por esgotamento em meio sólido seletivo como o ágar MacConkey e incubadas por 24 horas. Após a verificação visual do grau de pureza das colônias formadas, procedeu-se para a preparação do inóculo.

3.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima avalia a capacidade bacteriostática do fármaco perante a bactéria, ou seja, ação inibitória da multiplicação celular; determina a menor quantidade de antibiótico capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. O teste foi determinado usando método de microdiluição em caldo realizado de acordo com as diretrizes da ISO-20776-1 (INTERNATIONAL STANDART, 2019).

O microrganismo será semeado em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI - HiMedia®, Mumbai, Índia) e incubado a 37 °C durante 24 h em estufa. A partir das colônias isoladas após com 24 h de crescimento, os inóculos foram padronizados pela escala 0,5 Mac Farland com uso do turbidímetro *Densichek* (Biomérieux®) em solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl). Essa suspensão foi diluída 100 vezes resultando num inóculo com 10⁶ UFC/mL de *A. baumannii*.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio de cultura Mueller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia) em cada poço e no primeiro poço de cada grupo foi adicionado também 100 µL das nanopartículas funcionalizadas ao antibiótico com a concentração final de 8 µg/mL de amicacina. A partir desta diluição foi realizada uma série com quatro diluições em que foram retirados 100 µL do primeiro poço após homogeneização e transferidos para o segundo poço, no qual o procedimento foi repetido, até o último poço. Após a preparação da placa com o nanofármaco foram adicionados 100 µL da solução padronizada dos microrganismos em cada poço. A placa foi incubada por 18 horas a 35° C e após este período foi realizada a análise de CIM por método de turvamento e confirmado por leitura OD600 no espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA), equipamento disponibilizado pelo laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do

Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP). Os experimentos foram realizados em duplicatas.

3.6.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O teste que demonstra a concentração bactericida mínima considera o potencial bactericida da droga contra o microrganismo, isto é, a capacidade promover a morte do microrganismo. O teste foi realizado ao término da determinação da CIM; a partir da diluição que demonstrou a concentração inibitória mínima, alíquotas de 10 μ L foram semeadas em ágar BHI pelo método de gota e seu crescimento foi avaliado após incubação de 24 horas numa temperatura de 35° C. O experimento foi realizado em duplicata e a CBM foi definida como a menor concentração sem crescimento bacteriano.

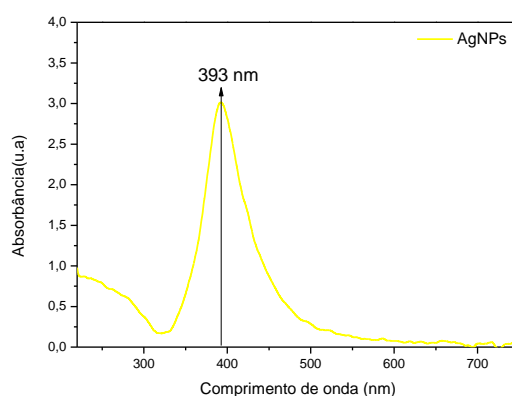
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção estão apresentados os resultados de caracterização da nanopartícula e do nanofármaco produzidos bem como os ensaios de susceptibilidade que avaliam o potencial bacteriostático e bactericida no combate as bactérias multirresistentes.

4.1 Síntese do Nanofármaco

O espectro UV-vis mostrado na Figura 7 corresponde à análise da solução coloidal de nanopartículas de prata sintetizada pela redução do nitrato de prata pelo borohidreto de sódio. Observa-se uma banda de absorção em torno de 393 nm devido à ressonância plasmônica de superfície das AgNPs. O espectro é característico de nanopartículas esféricas em função da banda única de oscilação ressonante dos elétrons na superfície da nanopartícula formada (GONTIJO *et al.*, 2020). Agnihotri *et al.*, (2014), sintetizaram AgNPs por meio da redução química por borohidreto, em que obteve-se nanopartículas com o comprimento de onda variando entre 393 a 462 e o diâmetro entre 5 a 100 nm, corroborando com as análises apresentadas na Figura 7 (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Uma solução amarelada característica também é observada em função da absorção e emissão de energia sob a forma de radiação devido à ressonância plasmônica de superfície das AgNps. Por tratar-se de um metal, essa ressonância ocorre de maneira intensa fazendo com que a presença de AgNPs sejam detectáveis visualmente e espectroscopicamente até mesmo em baixas concentrações (MELO *et al.*, 2012; PARAMELLE *et al.*, 2014).

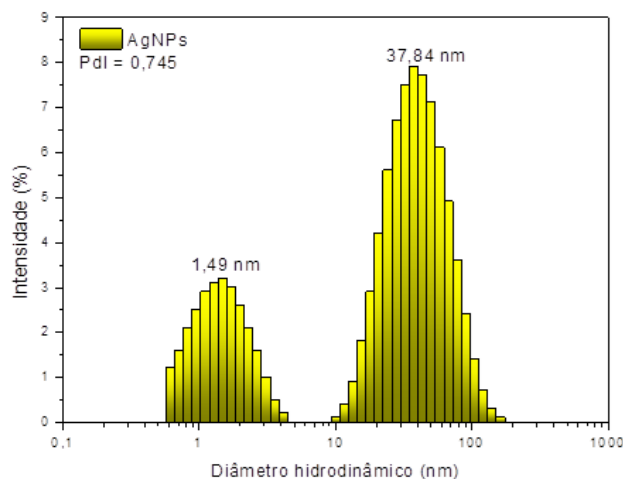
Figura 7 – Espectro da solução coloidal de AgNPs.



Fonte: a autora.

O espalhamento dinâmico da luz (DLS) mede a distribuição do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas formadas. A técnica consiste na determinação da extinção da luz incidida e espalhada pela partícula que está em movimento browniano constante, correlaciona com o tamanho da estrutura em suspensão (PARAMELLE *et al.*, 2014). A Figura 8 mostra uma distribuição bimodal, em que a gaussiana com maior intensidade de nanopartículas apresenta um diâmetro hidrodinâmico médio de 37,84 nm; e uma segunda população com um diâmetro médio de 1,49 nm também pode ser observada. Esse comportamento bimodal é característico da síntese das AgNPs em função do processo de amadurecimento de Ostwald, cuja nucleação ocorre a partir de sementes que crescem em momentos diferentes. Assim, ao final do processo de síntese algumas partículas não crescem devido à formação de camadas de depleção ao redor, gerando conseqüentemente duas populações de nanopartículas (JESUS *et al.*, 2018).

Figura 8 – Distribuição dos tamanhos das partículas sintetizadas.

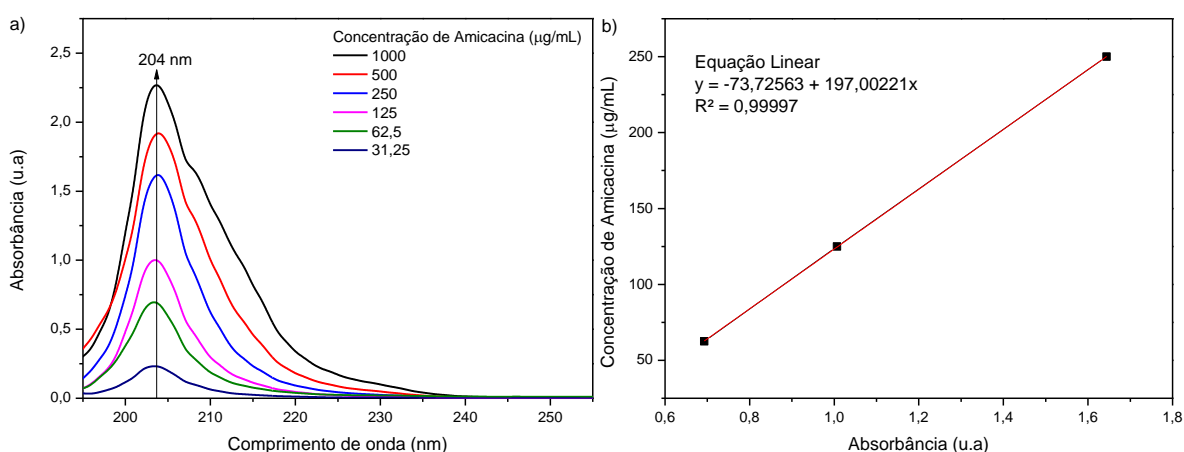


Fonte: a autora.

A magnitude do potencial Zeta fornece informações sobre a estabilidade das partículas em um sistema coloidal. As propriedades elétricas são regidas pelas cargas da superfície do sólido que são opostas à do meio no qual estão suspensas. A facilidade com que as partículas deslizam pelo meio é caracterizada pelo potencial Zeta que normalmente é medido em mV. Valores entre -30 mV e +30 mV representam um aumento da inibição da repulsão eletrostática provocando uma aglomeração e sedimentação do soluto (HANAOR *et al.*, 2012). Na análise de estabilidade da solução de AgNPs produzidas, o potencial Zeta mensurado foi de -36,5 mV demonstrando ser uma solução coloidal estável.

A concentração da amicacina foi determinada pela equação da reta calculada a partir dos princípios da lei de Lambert-Beer que correlaciona a absorção espectrofotométrica do fármaco e sua concentração teórica (Figura 9b). A equação foi determinada pela análise de diferentes concentrações de amicacina no comprimento de onda de máxima absorção (204 nm) obtidas do espectro UV-Visível (Figura 9a). Tendo em vista que as concentrações previstas do fármaco no conjugado amicacina-ácido lipóico estão entre 62 e 250 µg/mL, os pontos utilizados para calcular a equação estão dentro dessa mesma faixa para manter uma correlação mais fidedigna. Esta equação se torna fundamental para as aplicações biológicas deste nanofármaco.

Figura 9 – Caracterização do antibiótico por espectroscopia UV-Visível.

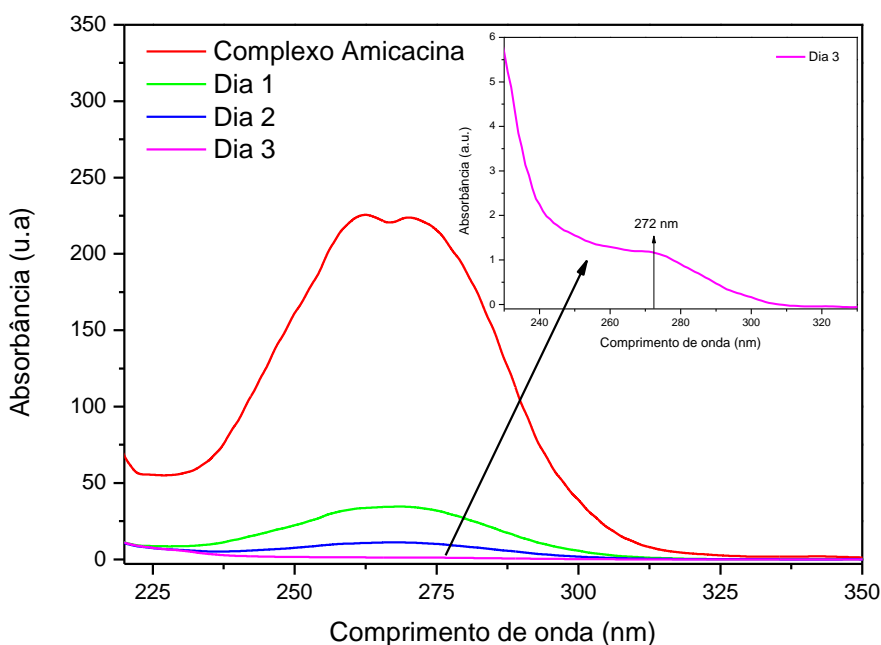


Fonte: a autora.

Legenda: a) Diluição seriada; b) Equação linear da reta em função da concentração *versus* absorção.

A modificação química do fármaco se faz necessária para permitir sua ligação com as AgNPs. No entanto, os subprodutos de reação alteram a estabilidade da nanopartícula impedido sua ligação e promovendo a aglomeração da solução coloidal. Assim, o processo de diálise foi realizado para a remoção destes subprodutos. A avaliação da efetividade do processo foi observada por meio das leituras espectrais no UV-Visível conforme apresentadas na Figura 10. Testes paralelos foram executados adicionando 2 μL da solução contendo o fármaco modificado a 20 μL da solução coloidal de AgNP e a ausência de aglomeração contribuiu para a finalização do processo de lavagem. O espectro UV-Visível do complexo de amicacina (pré-purificação) mostra duas bandas de absorção em aproximadamente 260 nm e 272 nm que estão relacionadas ao subproduto e ao complexo formado, respectivamente. À medida que os subprodutos da síntese são removidos pelo processo de diálise ocorre um decaimento das bandas, entretanto, observa-se que após três dias da dialise a banda em 272 nm é vista em menor intensidade, caracterizando o final do processo de purificação do complexo.

Figura 10 – Análise espectral do processo de diálise do produto de modificação do antibiótico.

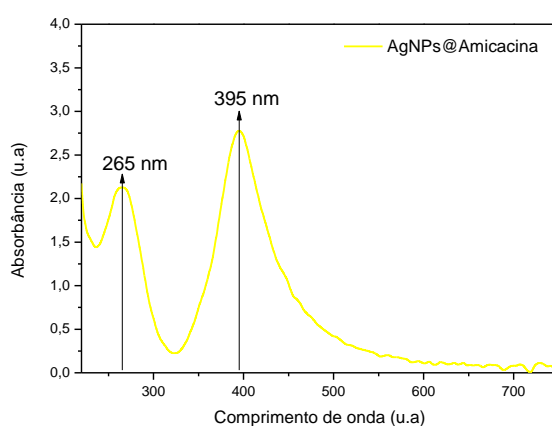


Fonte: a autora.

A Figura 11 mostra o espectro de absorção no UV-Visível do complexo amicacina funcionalizada à nanopartícula de prata. A ligação do fármaco com a nanopartícula provoca um deslocamento de banda para a região do azul em virtude

da interação com as AgNPs. Essa banda de absorção em aproximadamente 265 nm caracteriza a presença de compostos químicos como a amicacina. Kaur *et al.*, (2019) demonstrou a interação de diferentes antibióticos com nanopartículas de prata sintetizadas a partir da oxidação do nitrato de prata com borohidreto utilizando PVP (polivinilpirrolidona) como agente estabilizador; a amicacina conjugada com a AgNP estabilizada com PVP apresenta uma banda espectral semelhante, no entanto o pico máximo de absorção ocorre em 290 nm; isso ocorre em função a influência do agente estabilizante que gera um deslocamento dos subníveis energéticos diminuindo a energia requerida para a transição eletrônica no espectro. Dessa maneira, haverá um deslocamento da região de absorção para um comprimento de onda mais alto (KAUR; KUMAR, 2019). A variação do deslocamento foi mais significativa nos estudos de Kaur *et al.* (2019) porque a molécula do polímero polivinilpirrolidona exerce uma influência maior que a molécula de ácido lipóico utilizada para ligar o fármaco com a nanopartículas de prata. Essa similaridade também contribui para evidenciar a presença da amicacina no nanofármaco formado. Além disso, ouve um deslocamento do pico máximo de absorção da banda correspondente à AgNP para 395 nm em função do aumento do diâmetro hidrodinâmico médio do nanofármaco o que caracteriza a efetividade da conjugação, corroborando com as análises de DLS.

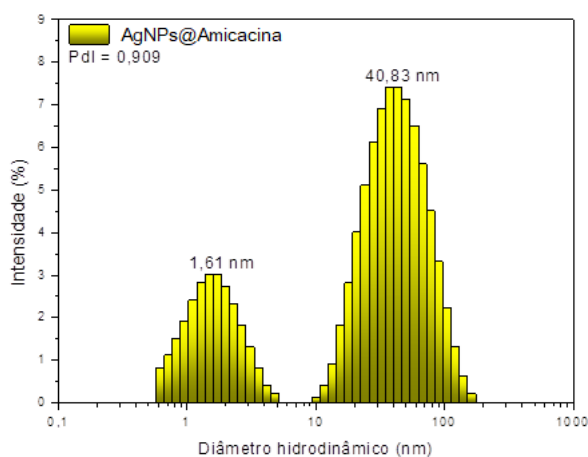
Figura 11 – Espectro das nanopartículas funcionalizada com a amicacina.



Fonte: a autora.

A caracterização do diâmetro hidrodinâmico do nanofármaco também foi realizada após o processo de funcionalização da amicacina com as AgNPs tendo em vista que espera-se um aumento das nanoestruturas com a adição de moléculas em sua área superficial. Na Figura 12 é possível observar um aumento do diâmetro médio da partícula em aproximadamente 2,99 nm que é semelhante à área topográfica polar da amicacina demonstrando a efetividade da ligação (BIOTECHNOLOGY, 2021). O potencial Zeta da solução coloidal funcionalizada ao antibiótico também foi mesurado, em que mostra uma estabilidade das partículas após a conjugação com a amicacina favorecendo sua aplicação biológica, sendo de -39,5 mV. Nos estudos de Kaur *et al.*, (2019), a nanopartícula funcionalizada com amicacina e estabilizada com PVP apresenta um diâmetro médio de 61 nm; o autor demonstrou efeito sinérgico da associação na inibição do crescimento de cepas de *Eschechia coli*. Tendo em vista e que quanto menor o tamanho da partícula, melhor será a ação deletéria contra microrganismos, espera-se resultados positivos com relação a potencialização do efeito antibiótico do fármaco em estudo (FRANCI *et al.*, 2015).

Figura 12 – Distribuição dos tamanhos das partículas funcionalizadas com antibiótico.



Fonte: a autora.

Compostos que tenham ligações covalentes absorvem várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Cada ligação química tem sua própria frequência natural de vibração garantindo uma impressão digital espectral para cada molécula. Dessa maneira, é possível

obter informações estruturais como os grupos funcionais de um composto químico (PAVIA *et al.*, 2016).

A Figura 13 apresenta os espectros FT-IR da amicacina (linha vermelha) comparada com o nanofármaco (linha preta). O espectro do nanofármaco exibe modos vibracionais correspondentes à molécula de amicacina sendo identificada pelas bandas de 3352 cm^{-1} , 2928 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1544 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} , confirmando a presença do antibiótico na área superficial da AgNPs. Os modos vibracionais 3352 cm^{-1} e 2928 cm^{-1} correspondem ao estiramento O-H e ao alongamento do grupo alifático CH_2 , respectivamente (COATES, 2006; FATIMA *et al.*, 2019). As bandas encontradas na região de *fingerprint* (impressão digital) também estão atribuídas aos grupos funcionais da molécula, portanto na banda de 1644 cm^{-1} refere-se à deformação angular C=O e em 1544 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} e 1042 cm^{-1} correspondem às deformações axiais de NH_2 , C-O e C-N, respectivamente (COATES, 2006; FATIMA *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018). Fatima e colaboradores (2019) descrevem bandas semelhantes ao caracterizar o antibiótico aminoglicosídeo, indicando claramente a autenticidade do fármaco, as quais corroboram com o espectro mostrado na Figura 12 (FATIMA *et al.*, 2019).

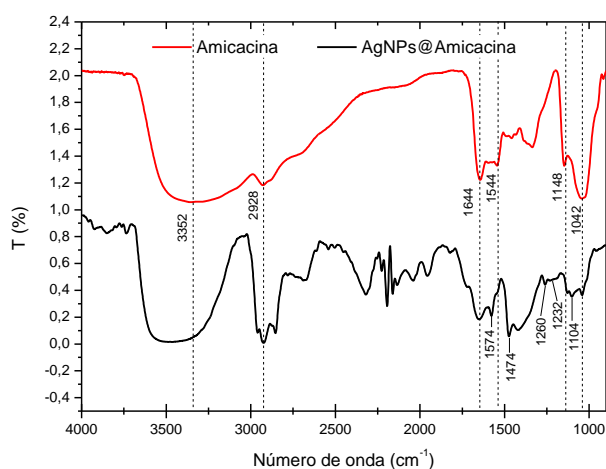
O espectro do nanofármaco mostra modos vibracionais que evidenciam a formação do complexo da amicacina, o qual corresponde à ligação amida formada entre a molécula do antibiótico e o ácido lipóico. Castilho e coautores (2017) descrevem a região de 1020 a 1250 cm^{-1} refere-se à formação da ligação amida, atribuída à deformação axial de C-N (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). Assim, o aumento de intensidade das bandas de 1104 cm^{-1} , 1232 cm^{-1} e 1260 cm^{-1} no espectro do nanofármaco (Figura 12) esta atribuída a formação de Amida III, confirmando a formação do complexo (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017; GARCIA-FUENTES *et al.*, 2008; ROZENBERG *et al.*, 2019).

As vibrações de flexão de N-H são encontradas na região de 1474 cm^{-1} , proveniente da ligação amida ocorrida entre a amicacina e o ácido lipóico, em que é notório a diferença de intensidade da banda entre o espectro da amicacina e do AgNPs@Amicaina (EL-BASSYOUNI *et al.*, 2020).

A banda de 1544 cm^{-1} está atribuída ao modo vibracional NH_2 , a amina primária presente na molécula do antibiótico. Observa-se uma perda de intensidade

desta banda no espectro do nanofármaco, o que evidência a modificação química via carbodiimida da amicacina formando o completo permitindo sua ligação na área superficial das nanopartículas. Em 1574 cm^{-1} corresponde ao grupo carbonil (C=O) e ao estiramento de N-H, modos vibracionais que são modificados com a ligação amida, e se apresentam com uma banda de grande intensidade no espectro do AgNPs@Amicacina (COATES, 2006; FATIMA, *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2018; ROZENBERG *et al.*, 2019).

Figura 13 – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier da amicacina e do nanofármaco.



Fonte: a autora.

4.2 Ensaio de Suscetibilidade

Objetivando avaliar o perfil de suscetibilidade do nanofármaco desenvolvido, foram realizados testes de CIM e os dados analisados conforme Tabela 5. Os testes realizados apenas com amicacina comprovam a sensibilidade da cepa padrão e a resistência das demais cepas clínicas de acordo com interpretações recomendadas pelo BrCast.

Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM), turbidez em diferentes concentrações de amicacina, complexo amicacina/ácido lipóico e AgNP@Amicacina após 24 h de incubação.

Concentração Inibitória Mínima															
<i>A. baumannii</i>	Amicacina (µg/mL)					Complexo Amicacina (µg/mL)					AgNP@Amicacina (µg/mL)				
	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5
ATCC 19606	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Positivo (+): turbidez indicando crescimento; Negativo (-): sem turbidez indicando ausência de crescimento.

Fonte: a autora.

Os ensaios com o complexo amicacina também foram realizados para avaliar o efeito inibitório sobre as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. O principal mecanismo de resistência desenvolvido por cepas de *A. baumannii* contra aminoglicosídeos é a modificação enzimática de adenilação, metilação ou fosforilação dos grupos amino do fármaco (MUNITA; ARIAS, 2016). O processo de modificação química da amicacina via carbodiimida foi realizada utilizando um excesso de moléculas de ácido lipóico com a intenção de reagir com todas as aminas primárias do fármaco fazendo com que as enzimas percam seu substrato. Essa seria uma possibilidade para proteger a droga das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos melhorando a ação farmacológica contra cepas resistentes. No entanto, ensaios de MIC e MBC realizados apenas com o complexo amicacina demonstraram que esses sítios parecem ser essenciais para a ação terapêutica do antibiótico. Dessa maneira, a reação de modificação foi realizada utilizando uma razão molar 1:1 de ácido lipóico com a amicacina para que a probabilidade de ligação ocorra igualmente e com maior propensão para que ocorra a ligação de apenas uma molécula de ácido lipóico por antibiótico deixando livres as demais porções amínicas do conjugado, tendo a intenção de reduzir a probabilidade de ligação com todas as aminas primárias do fármaco.

Na Tabela 5 mostra os dados da CIM para o grupo tratado com o complexo de amicacina, na qual é possível observar que o perfil de resistência foi mantido para todas as cepas clínicas. Entretanto, a cepa padrão que tinha um perfil de sensibilidade foi alterada para um perfil resistente. Este fato está diretamente

relacionado a modificação do fármaco, em que as aminas primárias livres parecem ter papel fundamental na ação farmacológica e a modificação via carbodiimida da molécula sugere que a conjugação não interfere na ação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos mantendo o perfil de resistência aos antibióticos. Além disso, com a mudança no perfil de suscetibilidade da cepa padrão supõe-se que os locais de ligação amino são essenciais para a ação farmacológica do antibiótico.

Nos testes para avaliação da concentração inibitória mínima do nanofármaco (AgNPs@Amicacina) houve turvação apenas nos poços de controle de crescimento (Tabela 4). A inibição do crescimento de todos os microrganismos analisados foi evidenciada nos ensaios de CIM e CBM na concentração mais baixa de AgNPs@Amicacina testada, 0,5 µg/mL (Tabela 5 e 6). Isso demonstra a ação bactericida e bacteriostática do nanofármaco comprovando a eficácia da conjugação tendo em vista que a amicacina isoladamente nas dosagens usuais é considerada apenas como bacteriostático. Agentes com propriedades antibióticas podem ter um efeito deletério ou simplesmente limitar o crescimento bacteriano. As drogas bactericidas apresentam melhor atividade em doses terapêuticas mais baixas, além de inibir o recrudescimento do microrganismo e o surgimento de mecanismos de resistência (BURY-MONÉ, 2014).

Tabela 6 – Concentração bactericida mínima (CBM) para diferentes concentrações de AgNP@Amikacina após 24 h de incubação.

<i>A. baumannii</i>	AgNP@Amikacin (µg/mL)				
	8.0	4.0	2.0	1.0	0.5
ATCC 19606	-	-	-	-	-
AB 1	-	-	-	-	-
AB 2	-	-	-	-	-
AB 3	-	-	-	-	-
AB 4	-	-	-	-	-

Positivo (+): indicativo de crescimento; Negativo (-): indicativo de ausência de crescimento.

Um antibiótico é considerado bactericida quando a CBM não é maior que quatro vezes o valor da CIM (BURY-MONÉ, 2014). Considerando que houve crescimento em todas as concentrações do complexo amicacina testado (Tabela 5), pode-se concluir que o mesmo não apresenta ação bactericida nas concentrações testadas. Esse fato reforça a possibilidade de inativação do fármaco através da conjugação.

Embora existam diversos estudos sobre a ação antimicrobiana das nanopartículas de prata, isoladas ou associadas a antibióticos contra diversos microrganismos, são raras as pesquisas que associam a amicacina à AgNPs contra cepas resistentes de *A. baumannii*. Além disso, as características de cada nanopartícula são bastante peculiares e as diferentes metodologias testadas dificultam a comparação dos resultados. Wan *et al.* (2016) mostram nanopartícula de prata sintetizada pela redução do nitrato de prata pelo borohidreto e estabilizada com citrato de sódio, apresentou um diâmetro hidrodinâmico médio de 5 a 12 nm. Foi demonstrado um sinergismo da atividade antibacteriana da polimixina B e da rifampicina contra cepas de *A. baumannii* MDR quando associadas com a AgNPs. Os ensaios foram realizados tanto *in vitro* como *in vivo* (WAN *et al.*, 2016). Nos experimentos realizados Lopez-Carrizales e colaboradores (2018) foi demonstrado o sinergismo do potencial bactericida da associação da amicacina com nanopartículas de prata contra cepas de *A. baumannii*. No entanto, a amicacina causou desestabilização do sistema coloidal da nanopartícula provocando a sua aglomeração (LOPEZ-CARRIZALES *et al.*, 2018). O estudo não relata a interação como foi realizada a interação do fármaco com a AgNPs e a falta de estabilidade do sistema impede a avaliação precisa de concentração inibitória mínima justificando a necessidade de novas pesquisas para elucidar essas questões.

Estudos realizados por Kaur e Kumar (2019), utilizando nanopartículas de prata com diâmetro hidrodinâmico médio de 61 nm, ligadas à amicacina por ligações de hidrogênio com o polímero polivinilpirrolidona, mostraram-se eficientes contra cepas de *Escherichia coli*. Embora o teste de suscetibilidade tenha sido realizado por disco-difusão, o aumento do halo de inibição demonstrou ser promissora a associação de antibióticos com nanopartículas de prata (KAUR; KUMAR, 2019).

No estudo de Montero *et al* (2006) é demonstrado que a associação entre rifampicina e imipenem parece ser a melhor associação terapêutica contra infecções causadas por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (MONTERO *et al.*, 2006). No entanto, a monoterapia é preferível por apresentar menores efeitos adversos e isso poderá ser uma realidade como o nanofármaco proposto.

As bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação farmacológica em função da membrana fosfolipídica externa que dificulta a permeabilidade dos antimicrobianos (MUNITA; ARIAS, 2016). Uma das prováveis justificativas do sinergismo da associação entre a nanopartícula de prata e a amicacina é o

favorecimento da passagem do antibiótico pelas membranas celulares tanto em vista a afinidade do metal pelo fósforo o que provoca a desestabilidade da camada fosfolipídica. Outro fato é ligação da prata com compostos à base de enxofre como os aminoácidos metionina e cisteína presentes nas proteínas que regulam rotas metabólicas essenciais para as manutenções vitais do microrganismo. Essa adição altera o metabolismo bacteriano que também é afetado pela presença de espécies de oxigênio livres altamente reativas (SINGH *et al.*, 2018). O estresse oxidativo causado pela presença da prata, pode inibir a ação das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos favorecendo a ação da amicacina na inibição da síntese proteica ligando-se à subunidade ribossomal 30 S (FRANCI *et al.*, 2015). Esses prováveis mecanismos de ação justificam a inibição total do crescimento de cepas resistentes de *A. baumannii* testadas numa concentração inibitória mínima e bactericida de 0,5 µg/mL de amicacina ligada à nanopartículas de prata com um diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 37 nm. Dessa maneira, os efeitos oto e nefrotóxicos da amicacina poderão ser reduzidos em função da diminuição da concentração do fármaco presente nas formulações associadas a nanopartículas de prata.

5 CONCLUSÃO

O nanofármaco sintetizado se apresenta como uma promissora ferramenta para o tratamento com potencial bactericida e bacteriostático contra cepas de *Acinetobacter baumannii* multidroga resistentes. As nanopartículas de prata foram sintetizadas a partir da redução do nitrato de prata por borohidreto de sódio. As caracterizações do processo demonstraram a síntese de um sistema coloidal estável com AgNPs de diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 37,84 nm e comportamento bimodal característico. O antibiótico foi modificado por meio da química carbodiimida para favorecer a funcionalização com as nanopartículas de prata sintetizando o nanofármaco que foi devidamente caracterizado comprovando a efetividade da conjugação.

Os testes de susceptibilidade demonstraram que a funcionalização da amicacina com a nanopartícula de prata é efetiva contra cepas multidroga resistentes de *Acinetobacter baumannii* numa concentração bactericida e bacteriostática de 0,5 µg/mL. Assim, o perfil de susceptibilidade das bactérias do estudo passou de resistente para sensível e a ação bactericida também foi observada tendo em vista que a amicacina é considerada como um agente bacteriostático nas concentrações usuais. Além disso, considerando que as características dessa bactéria são muito semelhantes aos demais bacilos Gram-negativos, a potencialidade letal também poderá ser expandida para outros microrganismos tornando-se uma nova ferramenta contra a pandemia silenciosa que são as bactérias multidroga resistentes.

REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19**. [S. l.: s. n.], 2021.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resistencia Microbiana: Mecanismos e Impacto Clínico**. Brasília: [s. n.], 2007.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada N° 44 de Outubro de 2010**. Brasília: ANVISA, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Orientações gerais para a implantação da Sub-rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA No 02/2015 Orientações)**. Brasília: ANVISA, 2015.

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ALI, K. *et al.* Aloe vera extract functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi-drug resistant clinical bacterial isolates. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 472, p. 145–156, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.03.021>

BIOTECHNOLOGY, N. C. for. **PubChem Compound Summary**. [S. l.: s. n.], 2021. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amikacin>. Acesso em: 21 jun. 2021.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING BRCAS. **Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-v1-mar-2021 (1)**. [S. l.: s. n.], 2021.

BREITHAUPT, H. Tackling resistance: bacteria, humans, animals and the environment. **EMBO reports**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 127–130, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1002/embr.201338299>

BRUNTON, L. L. **GOODMAN & GILMAN - As Bases Farmacológicas da terapêutica**. 11.ed.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

BURY-MONÉ, S. Antibacterial Therapeutic Agents. **Reference Module in Biomedical Sciences**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00244-0>

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações [Nanotechnology in medicine: concepts and concerns]. **Química Nova**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 521–526, 2014. Available at: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140086>

CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a

theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 240, p. 903–908, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.011>

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States** Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA: [s. n.], 2019. Available at: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>.

COATES, J. **Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation**. [S. l.: s. n.], 2006.

DE CARVALHO, R. H. *et al.* Sepsis, severe sepsis and septic shock: Clinical, epidemiological and prognostic characteristics of patients in an intensive care unit in a university hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 591–593, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000500025>

DE FRANÇA, F. F. de A. C. **Andrejus Korolkovas - Dicionário Terapêutico Guanabara**. 2012/2013. Rio de Janeiro: [s. n.], 2013.

DE OLIVEIRA AFFONSO, J. fernanda *et al.* Defeating Bacterial Resistance and Preventing Mammalian Cells Toxicity Through Rational Design of Antibiotic-Functionalized Nanoparticles OPEN. **Scientific Reports**, [s. l.], 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01209-1>. Acesso em: 15 maio 2021.

DE SOUZA, G. D. *et al.* Silver: Brief history, properties and applications. **Educacion Quimica**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 14–16, 2013. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)73189-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)73189-6)

EL-BASSYOUNI, G. T. *et al.* Hydroxyapatite nanoparticles derived from mussel shells for in vitro cytotoxicity test and cell viability. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e04085, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04085>

FALAVIGNA, M. *et al.* Guidelines for the pharmacological treatment of COVID-19. The task force/consensus guideline of the Brazilian Association of Intensive Care Medicine, the Brazilian Society of Infectious Diseases and the Brazilian Society of Pulmonology and Tisiology. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 166–196, 2020. Available at: <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20200039>

FATIMA, S. *et al.* Optimization and Designing of Amikacin-loaded Poly d, l-Lactide-co-glycolide Nanoparticles for Effective and Sustained Drug Delivery. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 83, 2019. Available at: https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_60_18

FRANCI, G. *et al.* Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 8856–8874, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>

FURTADO, R. H. M. *et al.* Azithromycin in addition to standard of care versus standard of care alone in the treatment of patients admitted to the hospital with severe COVID-19 in Brazil (COALITION II): a randomised clinical trial. **The Lancet**, [s.l.], v. 396, n. 10256, p. 959-967, 2020. DOI: 10.1016/s0140-6736(20)31862-6.

GARCIA-FUENTES, M. *et al.* The effect of hyaluronic acid on silk fibroin

conformation. **Biomaterials**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 633–642, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.024>

GONTIJO, L. A. P. *et al.* pH effect on the synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by dls and their size-dependent antimicrobial activity. **Revista Materia**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1–10, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200004.1145>

HANAOR, D. *et al.* The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. **Journal of the European Ceramic Society**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 235–244, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.015>

HUH, A. J.; KWON, Y. J. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 128–145, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>

HUSSEIN-AL-ALI, S. H. *et al.* Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 549–557, 2014. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S53079>

INTERNATIONAL STANDART. **INTERNATIONAL STANDARD agents and evaluation of performance Broth micro-dilution reference iTeh STANDARD method for PREVIEW testing the in vitro activity iTeh STANDARD PREVIEW**. [S. l.: s. n.], 2019.

IQBAL, P.; PREECE, J. A.; MENDES, P. M. Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. **Supramolecular Chemistry**, [s. l.], 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc195>

JAMAL, S. *et al.* Molecular mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*, with a special focus on its epidemiology in Lebanon. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 15, p. 154–163, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.022>

JESUS, V. P. S. *et al.* Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 23, p. 212–217, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.06.011>

KAUR, A.; KUMAR, R. Enhanced bactericidal efficacy of polymer stabilized silver nanoparticles in conjugation with different classes of antibiotics. **RSC Advances**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1095–1105, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8RA07980C>

KHOR, W. P. *et al.* The need for ongoing antimicrobial stewardship during the COVID-19 pandemic and actionable recommendations. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p.904, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9120904

KUMAR, S. *et al.* Rose Bengal attached and dextran coated gadolinium oxide nanoparticles for potential diagnostic imaging applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 117, n. April, p. 362–370, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.008>

- LARA, H. H. *et al.* Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 615–621, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
- LI, X.-Z.; ELKINS, C. A.; ZGURRSKAYA, H. I. **Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria**. Switzerland: Springer; Adis, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39658-3>
- LIN, M.-F. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 787, 2014. Available at: <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>
- LOPEZ-CARRIZALES, M. *et al.* In Vitro Synergism of Silver Nanoparticles with Antibiotics as an Alternative Treatment in Multiresistant Uropathogens. **Antibiotics**, [s. l.], v. 7, p. 50–63, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020050>
- MAGNET, S.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pump Involved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM4454. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 45, n. 12, p. 3375–3380, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3375>
- MANOHAR, P. *et al.* Nano-antibiotics: A Therapeutic Future Bacteriophage therapy View project Nanotechnology and nano-antibiotics View project Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Nano-antibiotics: A Therapeutic Future. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**, [s. l.], v. 6, p. 0–000, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2174/2210681207666170215151010>. Acesso em: 15 maio 2021.
- MARRA, A. R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 1866–1871, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00376-11>
- MARSOT, A. *et al.* Amikacin in Critically Ill Patients: A Review of Population Pharmacokinetic Studies. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 56, n. 2, p. 127–138, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40262-016-0428-x>
- MELO, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900030>
- MONTERO, A. *et al.* Rifampicin / imipenem combination in the treatment of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **J Antimicrob Chemother.**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 697–700, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl274>
- MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr.**, [s. l.], v. 4, n.2, 2016.. v. 1, p. 481–511. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

NAVARRO, J. R. G.; WERTS, M. H. V. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. **Analyst**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 583–592, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1039/c2an36135c>

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance**. [London, United Kingdom], 2016. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf.

PARAMELLE, D. *et al.* A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. **Analyst**, [s. l.], v. 139, n. 19, p. 4855–4861, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. 5ªed. São Paulo: Cengage Learning, 2016.

PRASAD, S. Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of silver nanoparticles. **Digest Journal of Nanoparticles and Biostructures**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 115–122, 2008.

RAI, M. K. *et al.* Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 112, n. 5, p. 841–852, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>

RANA, R. *et al.* Nanoantibiotic Formulations to Combat Antibiotic Resistance - Old Wine in a New Bottle. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 174–183, 2019. Available at: <https://doi.org/10.2174/1872211313666190911124626>

RISTUCCIA, A. M.; CUNHA, B. A. An Overview of Amikacin. **Therapeutic Drug Monitoring**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12–25, 1985. Available at: <https://doi.org/10.1097/00007691-198503000-00003>

ROZENBERG, M. *et al.* Spectroscopic FTIR and NMR study of the interactions of sugars with proteins. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 222, p. 116861, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.02.085>

SARAVANAN, M. *et al.* Overview of Antimicrobial Resistance and Nanoparticulate Drug Delivery Approach to Combat Antimicrobial Resistance. *In*: DOMB, Abraham J.; KUNDURU, Konda Reddy; FARAH, Shady. **Antimicrobial Materials for Biomedical Applications**. [S. l.]: Royal Society of Chemistry, 2019. p. 481–516. Available at: <https://doi.org/10.1039/9781788012638-00481>

SINGH, R. *et al.* Antibacterial Activities of Bacteriogenic Silver *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 3806–3815, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15013>

SOLOMON, S. D. *et al.* Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of**

Chemical Education, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Carbodiimide Crosslinker Chemistry**. [S. l.], 2021. Available at: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html#2>.

TIRI, B. *et al.* Antimicrobial Stewardship Program, COVID-19, and Infection Control: Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Colonization in ICU COVID-19 Patients. What Did Not Work? **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 2744, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9092744>

VAUGHN, V. M. *et al.* Empiric Antibacterial Therapy and Community-onset Bacterial Coinfection in Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Multi-hospital Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 73, n.10, p.e533–e541, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1239>

VILA, J. *et al.* Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 758–761, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1128/jcm.37.3.758-761.1999>

WAN, G. *et al.* Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 11, p. 3789–3800, 2016. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S104166>

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova** [s. l.], v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

ZENDEGANI, E.; DOLATABADI, S. The Efficacy of Imipenem Conjugated with Synthesized Silver Nanoparticles Against *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates, Iran. **Biological Trace Element Research**, [s. l.], v. 197, n. 1, p. 330–340, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01962-6>