

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Inglid Fontoura da Silva

Ação de nanopartículas de prata associada ao Imipenem aplicadas em cepas de  
*Klebsiella pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade

Action of silver nanoparticles associated with Imipenem applied on strains of  
*Klebsiella pneumoniae* with different susceptibility profiles

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP  
2023

**Inglid Fontoura da Silva**

Ação de nanopartículas de prata associada ao Imipenem aplicadas em cepas de  
*Klebsiella pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade

Tese de doutorado defendida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maiara Lima Castilho  
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, SP  
2023

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

Ficha catalográfica

Silva, Ingrid Fontoura da  
Ação de nanopartículas de prata associada ao Imipenem  
aplicadas em cepas de *Elebsiella pneumoniae* com diferentes perfis  
de susceptibilidade / Ingrid Fontoura da Silva, orientadora.  
Profa. Dra. Maiara Lima Castilho, co-orientadora Prof. Dr.  
Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2023.  
1 CD-ROM, 88 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Nanomedicina. 3.  
Farmacorresistência Bacteriana. 4. Imipenem. 5. *Elebsiella*  
*pneumoniae*. 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, Ingrid Fontoura da Silva, 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, 12 de Junho de 2023.

Ingrid Fontoura da Silva.

Autor(a) da Obra

---

**INGLID FONTOURA DA SILVA**

**“Ação de nanopartículas de prata associada ao Imipenem aplicadas em cepas de  
*Klebsiella pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, 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. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Juliana Ferreira Strixino	<i>Juliana Ferreira Strixino</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Maiara Lima Castilho	<i>Maiara Lima Castilho</i>
Prof. Dr. Leandro José Raniero	<i>Leandro José Raniero</i>
Prof. Dr. Carlos Alberto Silva	<i>Carlos Alberto Silva</i>
Prof. Dr. Tiago Gonçalves Santos	<i>Tiago Gonçalves Santos</i>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 09 de março de 2023.

## DEDICATÓRIA

A **Deus** pela vida, pelo cuidado, por me livrar, por me compreender, por me amar incondicionalmente, por não desistir de mim quando eu já havia desistido e pela realização deste sonho.

A **Jesus** pelo sacrifício da cruz, por ser minha direção, por me ensinar a cada dia suportar as aflições deste mundo, por me ensinar a ressignificar, a perdoar e amar sem julgar.

Ao doce **Espírito Santo** por me consolar, por me erguer e me ensinar a recomeçar.  
Aos meus pais **Ezequiel Pires** e **Nalva Fontoura**, por serem minha base, meus exemplos, por investirem em mim, por entenderem o meu silêncio e as minhas limitações.

Aos meus irmãos **Ermerson Fontoura** e **Jaciara Araújo** por compreenderem o cuidado dos meus pais comigo, pelo apoio, por serem presente durante toda a jornada em pensamento ou ações e entenderem a minha ausência.

Aos meus **primos-irmãos** e aos meus **sobrinhos**, filhos de irmãos e primos-irmãos, pelo colo e carinho de sempre.

A minha tia **Zene Pires** pelo primeiro passo rumo a esta jornada, por ser minha incentivadora e intercessora.

Ao meu tio **Elias Pires** (in memoriam) por me ensinar a amar e me dedicar a família.  
A sua luta pela vida também me inspirou.

A toda a minha família, em especial aos meus tios **Maria Helena Pereira** e **Egercias Pires** por mais uma vez me acolherem e simplesmente cuidarem de mim.

A minha cunhada **Talinne Fontoura e família**, que também me acolheram, torceram por mim e são exemplos de família cristã.

Ao **Dr. Cristiano Lopes Donzele** e **Maria Auxiliadora Lins** por me conduzirem todos estes anos, me ouvindo, me questionando, me levando a refletir, me impulsionando, me afastando quando necessário e me reconduzindo.

Ao **Dr. Geraldo Carvalhaes** por me reapresentar a vida e liberar para este caminho.

A **Primeira Igreja Batista em Itamaraju-BA, Igreja da Cidade em São José dos Campos-SP, Estância Paraíso da Igreja Batista da Lagoinha em Belo Horizonte-MG**; por serem meu suporte e fonte de aprendizado espiritual.

*A minha madrinha **Vanusia Brito e família** por me amarem e se doarem em todas as minhas questões. Incluo nesta família **Israel Nery e Luzinete Dantas**.*

*As mães que a vida me presenteou **Valdelita Viturino e Edileuza Calixto**. O apoio de vocês e seus familiares fizeram toda a diferença em minha formação.*

*A **Betânia Friaça, Joélia Batista e Bianca Hygino** que foram companheiras e amigas de sempre.*

*Aos pets: **Pety, Mike, Jake, Blue e Blood** por serem Grandes e fiéis companheiros.*

*A todos que de alguma forma me auxiliaram nesta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. **Maiara Lima Castilho** por ter aceitado o desafio de trabalhar com a microbiologia e comigo, você foi incrível na condução deste trabalho. De fato eu vivenciei a pesquisa novamente, aprendi nas reuniões, na bancada e na rotina laboratorial. Não aprendi somente sobre bionanotecnologia, tive o privilégio de conviver com uma mulher com empatia em relação às minhas questões. Uma mulher que é docente, pesquisadora, esposa e mãe.

A Prof. Dr. **Leandro Raniero** por abrir as portas e me receber em seu laboratório, por me transicionar, por toda confiança ao dispor da infra-estrutura do LNS e por todo o apoio e conselhos oferecidos. Você também me apresentou uma família na qual estou inserida, pessoas que marcaram a minha vida acadêmica e pessoal.

Aos alunos do Laboratório de Nanossensores: **Viviane de Jesus, Marcela Cândido, Paula Vieira, Luz Stefany Murcia, Nathanne Rost, Olavo Comparato, Fátima Maria Broca, Giulia Capizzani, Guilherme Mosquim, Vitor Poli, Fernanda Gouvêia, Virgínia Rezende, Lívia Lima e Giovanna de Faria**. Todos contribuíram em minha formação em especial: **Viviane de Jesus** pelo o cuidado, por me sustentar emocionalmente e ter resgatado a minha fé. **Marcela Cândido** que esteve comigo em várias etapas deste trabalho, me auxiliando, me ensinando e desenvolvendo autonomia na utilização de diversos equipamentos e **Paula Vieira** pelos conselhos, pela cumplicidade e por compartilhar momentos especiais nesta jornada.

As alunas do Laboratório de Bionanotecnologia: **Thaís Veriato, Larissa Camargo, Aline Lima, Flávia Dela Rosa, Rafaela Marques, Lara Rebouças e Vitória Caldeira**. Todas igualmente contribuíram em minha formação. Em especial a **Thaís Veriato** pela transferência de conhecimento. Presto aqui o meu reconhecimento pela base estabelecida em seu trabalho. Você também me ensinou questões que foram além da pesquisa.

Aos alunos dos cursos técnicos em análises clínicas e química da UNIVAP: **Nathália Diskin, Diego Soares, Nicole Galvão e Caio Castro**, por me auxiliarem na preparação dos materiais e experimentos.

As técnicas da Central Analítica: **Priscila Leite** e **Ângela Vieira**, por realizarem e me acompanharem nas análises de espectroscopia no infravermelho e difração de raio-x; além de serem mais do que um suporte em toda a Central Analítica.

A **Amanda Albuquerque** pelo o auxílio nas micrografias dos biofilmes, a **Rafaela Rossato** pelo treinamento no Spectra Count e a **Juliene Passos** por não medir esforços para a realização de inúmeras leituras no Sinergy HTX. Igualmente agradeço as professoras responsáveis pelos respectivos laboratórios: Profa. Dra. **Maricília Costa** e Profa. Dra. **Cristina Pacheco**.

A Profa. Dra. **Cristina Pacheco** não cabe a mim somente o agradecimento por disponibilizar suas alunas ou equipamentos, mas sobretudo pelo apoio com frases encorajadoras e cheias de fé. Grata pelo o acolhimento e por não ter medido esforços em realizar as micrografias dos biofilmes nos ensaios com tratamento e DAPI. Recebi não só o que estava ao seu alcance e este apoio com certeza me deram forças nesta reta final.

A **Juliana Guerra** por compartilhar do seu conhecimento, muitas vezes me apontando caminhos.

A Profa. Dra. **Juliana Strixino** por ir além das questões burocráticas da coordenação do doutorado, mas compreendendo o aluno em sua totalidade.

A Profa. Dra. **Renata Canevari**, **Maira Gaspar Tosato** e **Alejandro Minan** pelo apoio e torcida de sempre.

Aos **professores do PPGEB** pelas disciplinas ofertadas, que contribuíram na aquisição de conhecimento com conseqüente crescimento acadêmico.

A **Maria Alice Macedo**, **Miriam Nunes** e **Nanci Vilela** por me orientarem cuidadosamente quanto às informações da diretoria e do programa de pós-graduação. Aos demais **funcionários do IP&D**, em especial **Ana Maria Salvador** e **Sebastião Carlos Claudino** vocês me inspiram.

A Profa. Dra. **Lúcia Vieira** pelo o trabalho desempenhado na direção do Instituto.

A **Universidade do Vale do Paraíba** por todo o aprendizado oferecido nestes oito anos e meio de Instituição.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES** por bolsa de doutorado concedida.

Se não puder voar, corra. Se não puder correr,  
ande. Se não puder andar, rasteje, mas  
continue em frente de qualquer jeito.

**Martin Luther King Jr.**

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) é uma bactéria oportunista que têm chamado atenção devido à resistência aos antibióticos carbapenêmicos. O tratamento em pacientes com infecções graves tem sido desafiador e novas tecnologias vem sendo investigadas entre elas as nanopartículas de prata (AgNPs) por apresentarem efeitos antimicrobianos. Este trabalho tem como objetivo analisar a associação das AgNPs ao antibiótico carbapenêmico Imipenem (IMP) contra cepas de *K. pneumoniae*. As AgNPs foram sintetizadas pelo método *bottom-up* e recobertas com ácido-alfa lipóico. Testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados em formas planctônicas utilizando quatro cepas de *K. pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade ao IMP. A associação foi testada em biofilme e os ensaios de cristal violeta e resazurina foram realizados para a classificação e análise da concentração inibitória mínima, respectivamente. A redução da concentração do IMP com a associação as nanopartículas (NPs) foi encontrada em todas as cepas estudadas na forma planctônica e o sinergismo entre as AgNPs e o IMP foi demonstrado por meio da análise da concentração inibitória fracionada. Em biofilmes reduções significativas foram observadas e a atividade metabólica foi reduzida em índices  $\geq 80\%$  caracterizando a concentração inibitória mínima do biofilme (MBIC). Assim, a MBIC para a cepa ATCC foi de 2  $\mu\text{g/mL}$  e para as cepas clínicas com perfil sensível e resistente de 1  $\mu\text{g/mL}$  e para o perfil intermediário 8  $\mu\text{g/mL}$ . A associação proposta no estudo obteve efeito inibitório em diferentes perfis de *K. pneumoniae*, tanto em formas planctônicas quanto biofilme com um comportamento peculiar no perfil resistente ao IMP.

**Palavras-chave:** nanopartículas de prata; Imipenem; carbapenêmicos; *Klebsiella pneumoniae*; perfis de susceptibilidade; resistência bacteriana.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic bacterium that has drawn attention due to its resistance to carbapenem antibiotics. Treatment in patients with severe infections has been challenging and new technologies have been investigated among them, silver nanoparticles (AgNPs) for presenting antimicrobial effects. This work aims to analyze the association of AgNPs with the carbapenem antibiotic Imipenem (IMP) against *K. pneumoniae* strains. AgNPs were synthesized by the bottom-up method and coated with alpha-lipoic acid. The association was tested on biofilm and cristal violet and resazurin assays were performed for classification and minimum inhibitory concentration analysis, respectively. The reduction of IMP concentration with the association of nanoparticles (NPs) was found in all strains studied in planktonic form and the synergism between AgNPs and IMP was demonstrated through the analysis of fractional inhibitory concentration. In the biofilms analysis significant reductions were observed and the metabolic activity was reduced at rates  $\geq 80\%$  characterizing the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC). Thus, the MBIC for the ATCC strain was 2  $\mu\text{g/mL}$  and for the clinical strains with sensitive and resistant profile 1  $\mu\text{g/mL}$  and for the intermediate profile 8  $\mu\text{g/mL}$ . The association proposed in the study obtained inhibitory effect in different profiles of *K. pneumoniae*, both in planktonic and biofilm forms with a peculiar behavior in the profile resistant to IMP.

**Keywords:** silver nanoparticles; Imipenem; carbapenems; *Klebsiella pneumoniae*; susceptibility profiles; bacterial resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Visão geral dos mecanismos de patogenicidade bacteriano. ....	24
Figura 2: Desenho esquemático do modelo atualizado da formação de biofilme. ....	27
Figura 3: <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	28
Figura 4: Linha do tempo de oito décadas de descoberta de antibióticos ao lado o surgimento da resistência.....	30
Figura 5: Estrutura química. a) Anel Beta-lactâmico; b) Carbapenem associado ao anel beta-lactâmico. ....	33
Figura 6: Mortes globais por síndromes infecciosas em 2019 associadas e atribuíveis à resistência bacteriana. ....	34
Figura 7: Esquema dos mecanismos de resistência a carbapenêmicos. ....	35
Figura 8: Distribuição de Metalo-beta-lactamases. ....	37
Figura 9: Estrutura molecular do IMP.....	38
Figura 10: Comparação do diâmetro das Nanopartículas a células biológicas, bactérias, vírus e entre outros. ....	41
Figura 11: Caracterização da síntese das nanopartículas de prata.. ....	56
Figura 12: Caracterização das nanopartículas de prata recobertas com ácido-alfa lipóico. ....	58
Figura 13: Teste de estabilidade química das nanopartículas. ....	60
Figura 14: Atividade metabólica do ensaio de resazurina em células planctônicas de <i>K. pneumoniae</i> .. ....	63
Figura 15: Representação esquemática descrevendo a interação e ação antimicrobiana das AgNPs, IMP e associação dos agentes sobre a bactéria Gram-negativa.....	64
Figura 16: Estudo comparativo do potencial Zeta em cepa ATCC e análises de cepas clínicas em água-ultrapura. Ensaio realizado em triplicata. ....	66
Figura 17: Formação dos biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> . ....	68
Figura 18: Indicador da qualidade do ensaio de formação dos biofilmes de <i>K. pneumoniae</i> .....	69
Figura 19: Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de resazurina após administração das nanopartículas de prata associadas ao Imipenem.....	70
Figura 20: Micrografia das concentrações inibitórias dos biofilmes comparado ao grupo controle.....	72

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Perfil de susceptibilidade das cepas clínicas de *K. pneumoniae* isoladas de ponta de cateter (Kp-S e Kp-I) e amostra de urina (Kp-R). S = Sensível, I = Intermediário e R = Resistente. ....50
- Tabela 2: Ponto de corte de Enterobactérias\* ao carbapenêmico IMP.  
\*Enterobactérias incluindo *K. pneumoniae*. ....61
- Tabela 3: Resultado dos ensaios da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima das nanopartículas de prata, Imipenem e sua associação em diferentes perfis de *K. pneumoniae* com ensaios realizados em triplicata. AgNPs (nanopartículas de prata):  $\times 10^{11}$  partículas/mL, Imipenem (IMP):  $\mu\text{g/mL}$  e AgNPs+IMP:  $2 \times 10^{11}$  partículas/mL + concentração do IMP em  $\mu\text{g/mL}$ .....62
- Tabela 4: Estudo do potencial Zeta dos antimicrobianos IMP e AgNPs e suas associações. ....67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%T>CIM	Porcentagem do tempo durante o qual a concentração do fármaco esteve acima da CIM
µg	Micrograma
µl	Microlitro
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
as	Assimétrico
ATP	Adenosine TriPhosphate, em português Adenosina trifosfato
ATR	Attenuated Total Reflectance, em português Reflexão total atenuada
Au	Ouro
AUC	Área sob a curva em determinado tempo
AUC <sub>24h</sub> /CIM	Razão da área sob a curva no regime de dose de 24 horas pela CIM
BHI	Brain Heart Infusion, em português Infusão cérebro coração
<i>bla</i>	Genes codificadores da beta-lactamase
<i>blaKPC</i>	Genes codificadores da beta-lactamase KPC
<i>blaMBL</i>	Genes codificadores da beta-lactamase MBLs
<i>blaOXA</i>	Genes codificadores da beta-lactamase OXA
BrCAST/EUCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl	Clearance
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM	Controle do material
C <sub>máx</sub>	Concentração sérica máxima
C <sub>máx</sub> /CIM	Razão da Concentração sérica máxima pela CIM
CP	Controle positivo

CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , em português Agrupados de curtas repetições palindrômicas regularmente interespaçadas
Cu	Cobre
%CV	Porcentagem do coeficiente de variação
DHP-1	Desidropeptidase renal-1
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> , em português Espalhamento dinâmico de luz
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , em português Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de raios X
EPS	Exopolissacarídeos
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> , em português Beta-actamases de espectro estendido
ESKAPE	Acrônimo dos patógenos: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter spp</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FBCI	<i>Fractional bactericidal concentration index</i> , em português Índice da concentração bactericida fracionada
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i> , em português Índice da concentração inibitória fracionada
FIR	<i>Far Infrared</i> , em português Infravermelho distante
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kel	Constante da taxa de eliminação
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MBIC	<i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i> , em português Concentração inibitória mínima do biofilme
MBLs	Metalo-beta-lactamases
MDR	Multi-resistente a drogas

MHB	<i>Mueller-Hinton broth</i> , em português Caldo Mueller-Hinton
MRT	Tempo médio de residência
NPs	Nanopartículas
OD	<i>Optical density</i> , em português Densidade óptica
OXA	Oxacilinas
PBP	<i>Penicillin-binding proteins</i> , em português Proteína de ligação à penicilina
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , em português Tampão fosfato salino
PD	Farmacodinâmica
PdI	<i>Polydispersity index</i> , em português Índice de polidispersão
PDR	Pan-resistente a drogas
PK	Farmacocinética
PK/PD	Modelagem farmacocinética/farmacodinâmica
QS	Quorum-sensing
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , em português Espécies reativas de oxigênio
s	Simétrico
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
Spp.	Espécies
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> , em português Ressonância plasmônica de superfície
TSA	Testes de susceptibilidade antimicrobiana
u.a.	Unidade arbitrária
UFC	Unidade formadora de colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Vd	Volume de distribuição
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	Extensivamente resistente a drogas
Z'	<i>Z-factor</i> , em português Fator-Z
Zn	Zinco
$\lambda$ Máx	Absorção máxima

## LISTA DE SÍMBOLOS

- $\lambda$  Lambda, presente em  $\lambda_{M\acute{a}x}$  que se refere ao comprimento de onda em que as NPs possuem maior absorção
- $\nu$  Nu, presente na descrição dos modos vibracionais em espectroscopia no infravermelho: estiramento
- $\delta$  Delta, presente na descrição dos modos vibracionais em espectroscopia no infravermelho: deformação
- $\pi$  Pi, é uma constante utilizada para calcular grandezas envolvendo formas circulares

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	OBJETIVO GERAL	21
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
2.1	INFECÇÕES BACTERIANAS	22
2.2	BIOFILMES BACTERIANOS	24
2.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
2.4	ANTIBIOTICOTERAPIA	28
<b>2.4.1</b>	<b>Carbapenêmicos</b>	32
2.5	TERAPIAS EMERGENTES	39
2.6	NANOTECNOLOGIA	40
<b>2.6.1</b>	<b>Nanomateriais</b>	41
<b>2.6.2</b>	<b>Nanopartículas de prata</b>	42
2.7	FASES DE ESTUDO DE NOVAS DROGAS ANTIMICROBIANAS	43
2.8	STEWARDSHIP ANTIMICROBIANO	44
2.9	ONE HEALTH	45
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	46
3.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	46
3.2	ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL	47
3.3	ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ	47
3.4	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	48
3.5	DIFRAÇÃO DE RAIOS X	48
3.6	DILUIÇÃO DO ANTIBIÓTICO	48
3.7	ESTABILIDADE QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS ASSOCIADAS AO IMIPENEM	49
3.8	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTURA	49
3.9	ENSAIO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	50
3.10	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS	51

3.11 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS.....	52
3.12 FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	52
3.13 CLASSIFICAÇÃO DO BIOFILME PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA.....	53
3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME PELO ENSAIO DE RESAZURINA.....	53
3.15 MICROGRAFIAS DOS BIOFILMES.....	54
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA .....	55
4.2 EFICIÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA RECOBERTAS ASSOCIADA AO IMIPENEM EM CEPAS DE <i>K. pneumoniae</i> .....	60
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas graves requerem tratamento hospitalar e estão comumente associadas à alta mortalidade, morbidade e custos de saúde consideráveis. Entre as bactérias clinicamente significantes com relato de infecções com falha na terapia e que vem despertando grande preocupação na saúde pública se encontra a espécie *K. pneumoniae* (EFFAH *et al.*, 2020; ZASOWSKI *et al.*, 2020).

*K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa oportunista que coloniza o trato gastrointestinal, nasofaringe de humanos, mucosa de animais e ambientes como água e solo. Naturalmente apresentam resistência às Penicilinas e diversos perfis de susceptibilidade a outros antimicrobianos, atribuído principalmente a resistência adquirida. Atualmente têm chamado atenção devido ao surgimento e disseminação de cepas hipervirulentas e resistente a classe de antibióticos carbapenêmicos. Os intensivistas e infectologistas tem sido constantemente desafiados ao tratar tais cepas com os atuais antibióticos, aumentando o risco de complicações em pacientes e tempo de permanência hospitalar (ALI *et al.*, 2022; BENGOCHEA; PESSOA, 2019; MARTIN; BACHMAN, 2018; PEIRANO *et al.*, 2020; RIPABELLI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos como um patógeno de alta prioridade para a pesquisa, descoberta e o desenvolvimento de novos antimicrobianos (TACCONELLI; MAGRINI, 2017). A Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) também abordou a necessidade de novas drogas para o tratamento de infecções bacterianas graves e recentemente aprovou o Recarbrio®, nome comercial da combinação entre os princípios ativos: IMP, Cilastatina e Relebactam (FDA, 2020). O IMP é um antibiótico carbapenêmico que atua na inibição da síntese da parede celular bacteriana, já a Cilastatina e o Relebactam atuam na prevenção da inativação do IMP por enzimas renais e na degradação ocasionada pelas enzimas beta-lactamases, respectivamente (POURALI, 2020). A resistência antimicrobiana é tema de constante discussão entre a comunidade científica em que a utilização inadequada e indiscriminada dos antibióticos tem colocado a população em risco (PEIRANO *et al.*, 2020; RIPABELLI *et al.*, 2018; WHO, 2015).

A pandemia global causada pelo SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) promoveu grandes impactos na resistência aos antimicrobianos, devido à administração excessiva de antibióticos (LAI *et al.*, 2021). As consequências são difíceis de prever e poderão variar a curto, médio e longo prazo com desafios persistentes em diversas esferas da sociedade (KNIGHT *et al.*, 2021).

Novas tecnologias em diversas áreas têm sido propostas para o desenvolvimento de antimicrobianos, entre tais se encontra a nanotecnologia que tem apresentado resultados relevantes devido à utilização de materiais em escala nanométrica que resultam em maior contato e absorção com a bactéria podendo resultar em sua inibição ou erradicação. Entre os nanomateriais as AgNPs têm sido alvo extensivo de estudo como agente antimicrobiano (LIMA; DEL FIOLE; BALCÃO, 2019; SINGH; SMITHA; SINGH, 2014), ocasionando na aprovação e utilização em dispositivos como: contraceptivos, curativos, equipamentos cirúrgicos e cateteres (TOHAMY *et al.*, 2022). A combinação das AgNPs com outros agentes antimicrobianos também tem sido relatado podendo aumentar o efeito microbicida em células planctônicas e biofilmes (FRANCI *et al.*, 2015). No entanto, em biofilmes a eliminação tem sido complexa devido à composição química e estrutura física sintetizada pelas bactérias. A propriedade altamente resistente a antibióticos de alguns biofilmes também exigem novos agentes antimicrobianos e novas estratégias antibiofilme (BI *et al.*, 2021). Embora as indústrias farmacêuticas tenham-se comprometido no desenvolvimento de novos antibióticos, o número tem diminuído constantemente nos últimos anos, com apenas novas classes tornando-se acessíveis (MURUGAIYAN *et al.*, 2022).

Visando a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e novas estratégias contra microrganismos resistentes, a presente tese propôs analisar o efeito da associação das AgNPs ao antibiótico carbapenêmico IMP em formas planctônicas e biofilmes de *K. pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a eficácia das AgNPs associadas ao antibiótico carbapenêmico IMP em cepas planctônicas e biofilmes de *K. pneumoniae*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntetizar AgNPs e caracterizar as propriedades químicas e físicas pelas técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz, Potencial Zeta, Espectroscopia UV-visível e Difração de Raio X.
- Analisar alterações espectrais provenientes do recobrimento das AgNPs com ácido-alfa lipóico por meio da espectroscopia FT-IR.
- Avaliar a estabilidade química das AgNPs associada ao antibiótico IMP.
- Avaliar a eficiência das AgNPs associadas ao IMP em cepas planctônicas com diferentes perfis de susceptibilidade de *K. pneumoniae* por meio dos testes de susceptibilidade antimicrobiana.
- Avaliar a eficiência das AgNPs associadas ao IMP em biofilmes com diferentes perfis de susceptibilidade de *K. pneumoniae* por meio da quantificação da biomassa e atividade metabólica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na elaboração desta seção buscou-se a realização de uma estrutura conceitual sobre a importância de se investigar novas tecnologias para o tratamento de infecções graves causadas por microrganismos resistentes como a *K. pneumoniae*, as quais deram sustentação para o desenvolvimento da pesquisa.

### 2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS

As bactérias são um componente essencial do microbioma humano, colonizando tecidos, desde o trato gastrointestinal a pele. O microbioma geralmente é abundante e não causa enfermidades, mas atinge um equilíbrio garantindo a sobrevivência e crescimento bacteriano. A capacidade de uma bactéria causar infecções reflete sua patogenicidade, ou seja, algumas são patogênicas enquanto outras são não patogênicas. A categorização como não patogênica pode alterar devido à adaptabilidade das bactérias e ao efeito a tratamentos, mecanismos de resistência e entre outros. De fato, bactérias anteriormente consideradas não patogênicas são conhecidas por causar morbidades. Embora a maioria das bactérias não sejam patogênicas e algumas espécies até ofereçam benefícios na digestão e competição com patógenos oportunistas, as infecções bacterianas estão entre as principais doenças humanas (BARON, 1996; CARROLL; BUTEL; MORSE, 2016; DEUSENBERRY; WANG; SHUKLA, 2021).

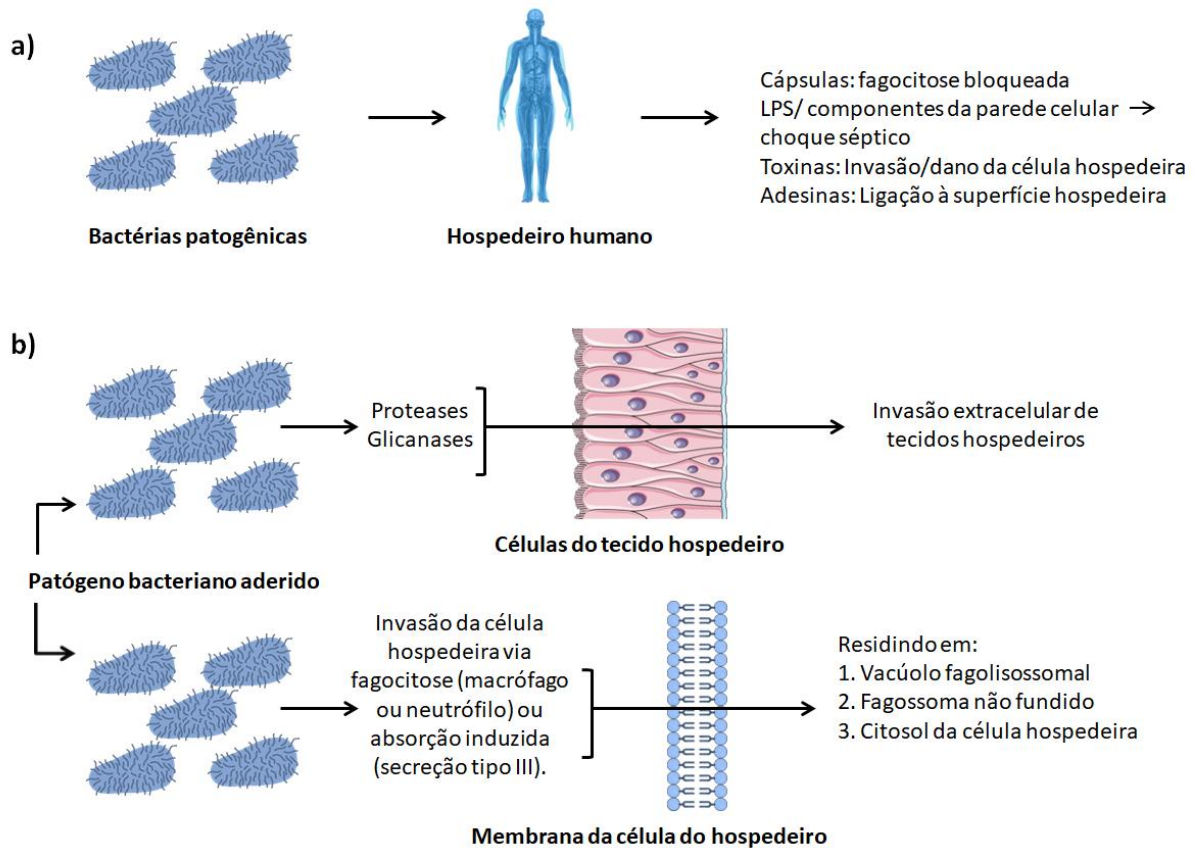
A interrupção na coexistência normal de bactérias e células hospedeiras observadas em indivíduos saudáveis ocasionam em infecções bacterianas. Estas infecções ocorrem mais comumente quando há migração de áreas com uma microbiota subjacente. A migração pode ocorrer da mucosa nasal, oral, intestinal e uretral para áreas de colonização atípica como: pulmões, pâncreas, sangue, cérebro, bexiga e rim. Implantes temporários como cateteres, tubos de endotraqueais e implantes de longo prazo como dispositivos cardíacos e próteses ortopédicas podem facilitar a migração bacteriana. A susceptibilidade a infecções bacterianas é aumentada quando a imunidade do hospedeiro está comprometida com condições como inflamação ou outras infecções. Vários fatores específicos das bactérias podem levar a infecções graves que podem exigir amputações, causar sepse e elevar a mortalidade (DEUSENBERRY; WANG; SHUKLA, 2021).

Diversos componentes bacterianos interagem com o hospedeiro uma vez aderido à superfície (Figura 1), invadindo ainda mais os tecidos. Patógenos podem penetrar em um tecido, lisar proteínas, polissacarídeos da matriz extracelular e invadir células de tecidos obtendo acesso ao ambiente intracelular. Isto pode ser facilitado pelos mecanismos naturais de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos ou por absorção induzida (WILSON *et al.*, 2002).

Demais fatores de virulência também são comumente observados e alguns são expressos por seus genes que podem ser utilizados para colonizar, invadir, evadir, suprimir ou adquirir diversas características. Estes fatores são parte integrante da estrutura biológica das bactérias e outros são sintetizados utilizando os processos metabólicos da célula-alvo. As adesinas auxiliam na colonização de células e tecidos. As invasinas contribuem na invasão de substâncias alvo, células e tecidos. Algumas enzimas e toxinas atuam na evasão de sistemas de barreira, mecanismos de defesa e na supressão de respostas imunes inatas e adaptativas. Por fim, os sideróforos participam na aquisição de nutrição de substâncias de células e/ou tecidos alvo. Em consequência, os fatores de virulência poderão promover disseminação local, regional ou sistêmica (ZACHARY, 2017).

Nos últimos 40 anos os microbiologistas categorizaram as bactérias em duas formas de vida na natureza. Entre elas as apresentações únicas, independentes, flutuantes, chamadas de células planctônicas; além de se apresentarem em agregados microbianos conhecidos como biofilmes (SAUER *et al.*, 2022).

Figura 1: Visão geral dos mecanismos de patogenicidade bacteriano.



Fonte: Wilson *et al.*, 2002 adaptado.

## 2.2 BIOFILMES BACTERIANOS

Os biofilmes são agregados de células de microrganismos que se aderem umas às outras e se incorporam em uma matriz extracelular auto-sintetizada de substâncias poliméricas chamados de exopolissacarídeos (EPS). Os EPS que consistem principalmente em meio aquoso, atuam como uma barreira física e química à penetração de antimicrobianos. Esta matriz oferece estrutura, suporte e permite a formação de elementos macroscópicos que determinam condições de vida neste microambiente. A porosidade, densidade, teor de água, hidrofobicidade e estabilidade mecânica são controladas pelo EPS (BI *et al.*, 2021; MAIER, 2021; SAUER *et al.*, 2022).

Um biofilme bacteriano pode ser composto por populações de uma ou de múltiplas espécies se apresentando em estado sésil, ou seja, estado aderido a uma

superfície. Além de apresentar células persistentes que são células que sobrevivem em baixos níveis metabólicos, localizadas na parte mais profunda no processo de maturação do biofilme. A configuração do biofilme apresenta em diferentes profundidades alterações do pH, do teor de oxigênio e também do metabolismo (BI *et al.*, 2021; MAIER, 2021; SAUER *et al.*, 2022).

As interações físicas das bactérias podem controlar a estrutura local dos biofilmes por expressão gênica diferencial e variação da taxa de crescimento como resposta a diversos estresses ambientais. Este ambiente hostil leva a regulação de proteínas expostas à superfície, aumento da produção de matriz extracelular e mudanças no formato da célula (MAIER, 2021).

A adesão do biofilme pode ser mediada por uma grande variedade de moléculas extracelulares. Estas moléculas dependem de uma combinação de atração eletrostática, atração polar e ligação de hidrogênio. A modelagem molecular fornece informações sobre as energias de interação entre as estruturas de superfície e como as bactérias podem se ajustar a estas cargas (MAIER, 2021).

As forças de depleção causam agregação de bactérias. Em solução, os polímeros formam espirais aleatórios com um raio típico menor que o raio das bactérias. Os polímeros não aderentes não podem se aproximar da bactéria por uma distância menor que o tamanho do seu raio, dando origem a um volume não incluído. Como consequência, a presença de bactérias reduz o volume efetivo disponível para os polímeros, reduzindo a entropia do sistema. Quando as bactérias se agrupam, elas minimizam o volume não incluído e maximizam a entropia agregando as bactérias e formando biofilmes (MAIER, 2021).

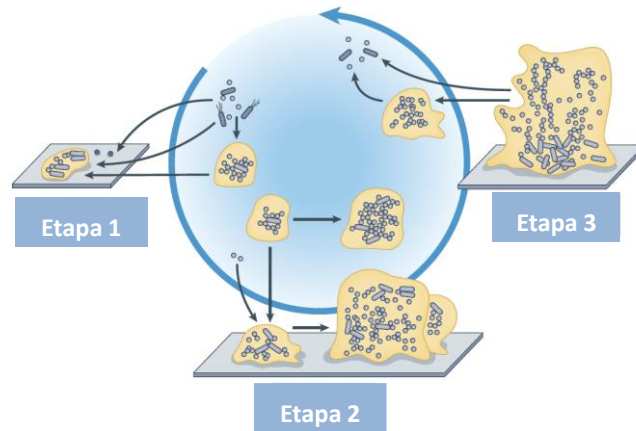
Os biofilmes também causam infecções, primariamente crônicas e crescem predominantemente, como: infecção pulmonar por fibrose cística, otite média crônica recorrente, feridas crônicas e infecções associadas a implantes e cateteres. As infecções crônicas baseadas em biofilme são recalcitrantes à antibioticoterapia convencional e por vezes não apresentam respostas imunes do hospedeiro como a fagocitose que ajudam a persistir por mais tempo. A regulação da formação do biofilme em infecções crônicas está diretamente ligada ao *quorum-sensing* (QS) que desempenha um papel importante na indução de virulência (PENA *et al.*, 2019; WARRIER; SATYAMOORTHY; MURALI, 2021; WILKINS *et al.*, 2014).

O QS é o resultado da mudança comportamental em um sistema de comunicação entre as bactérias em biofilmes que coordena as atividades como se

fossem organismos multicelulares. As bactérias sintetizam e exportam moléculas sinalizadoras chamadas autoindutoras. Em uma determinada concentração de moléculas autoindutoras extracelulares, as bactérias do biofilme percebem a existência desses compostos sinalizadores e uma cascata celular é ativada simultaneamente permitindo a expressão gênica populacional de vários fatores de virulência (WRIGHT; RAMACHANDRA, 2022). Todos estes fatores fazem com que as bactérias em biofilmes sejam até 1000 vezes menos sensíveis aos antibióticos do que em forma planctônicas (BI *et al.*, 2021).

A Figura 2 apresenta o modelo atualizado de formação de biofilme incluindo três principais eventos. A primeira etapa da formação do biofilme é a agregação e adesão (Etapa 1), em que durante este evento as bactérias agregam-se umas às outras ou aderem a superfícies bióticas e abióticas. Após esta etapa ocorre o crescimento e acumulação (Etapa 2), em que as colônias bacterianas agregadas e aderidas se expandem pelo crescimento e recrutamento de células vizinhas. A última etapa de formação é descrita pela desagregação e destacamento (Etapa 3), no qual as bactérias podem deixar o biofilme como agregados e como células únicas, dependendo do mecanismo. Estes três eventos caracterizam e representam à maioria, se não todos, os biofilmes com cenários independente do tempo e maturidade (SAUER *et al.*, 2022). Ao contrário do modelo estudado por diversos anos, o presente modelo considera diferentes habitats, condições e microambientes bem como o possível influxo de novas células. As bactérias podem ser inseridas no modelo em qualquer ponto. O que permite uma visão geral mais dinâmica que pode ser usada para explicar a maioria dos cenários do biofilme em habitats clínicos, ambientais e industriais (SAUER *et al.*, 2022).

Figura 2: Desenho esquemático do modelo atualizado da formação de biofilme.



Fonte: Sauer *et al.*, 2022 adaptado.

### 2.3 KLEBSIELLA PNEUMONIAE

*K. pneumoniae* (Figura 3) é a espécie bacteriana mais relevante do gênero *Klebsiella* pertencente à família Enterobacteriaceae. É um bacilo encapsulado Gram-negativo, fermentador de lactose, anaeróbio facultativo, imóvel, oportunista e que frequentemente causam infecções nosocomiais. Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1882 por Carl Friedlander que a isolou do pulmão de um paciente que foi a óbito por pneumonia (ASHURST ; DAWSON, 2022; LI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2021).

Este patógeno além de causar diversas infecções clinicamente relevantes, ainda é considerado um importante causador de pneumonias. Assim, uma vez que exista a suspeita ou confirmação da infecção por *K. pneumoniae*, o tratamento deve ser iniciado. Em leitos hospitalares a antibioticoterapia tem sido o único tratamento de escolha apesar dos desafios impostos pela hipervirulência e resistência (ASHURST ; DAWSON, 2022; CHANG *et al.*, 2021; PAVAN *et al.*, 2022).

A virulência desta bactéria é fornecida por uma ampla gama de fatores que podem levar à infecção. A cápsula polissacarídica que a envolve é o fator de virulência mais importante. Um segundo fator são os lipopolissacarídeos presentes na superfície externa das bactérias Gram-negativas. As fímbrias que permitem a adesão às células hospedeiras são também fatores que permitem a disseminação deste patógeno (ASHURST ; DAWSON, 2022). A hipervirulência incluem

principalmente o aumento da espessura capsular e presença de fímbrias do tipo 1 e 2, além do fenótipo de hiper mucoviscosidade (ZHU *et al.*, 2021).

Figura 3: *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: Dorward, (2014)

A resistência bacteriana a antimicrobianos apresenta grande relevância devido aos seus diversos mecanismos de resistência, com evidência na produção de enzimas que hidrolisam e inativam os antibióticos dificultando o esquema terapêutico (AFONSO; MILER-DA-SILVA; GARRIDO, 2022). Todas as características apresentadas levaram a *K. pneumoniae* à integração no grupo de patógenos bacterianos do acrônimo *ESKAPE*, o qual corresponde ao *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* O grupo *ESKAPE* são patógenos resistentes a antibióticos que representam uma ameaça global à saúde humana (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

## 2.4 ANTIBIOTICOTERAPIA

Infecções bacterianas eram uma grande ameaça à saúde humana causando diversas doenças e alta mortalidade antes da descoberta dos antibióticos. A antibioticoterapia surgiu como opção de tratamento e a Penicilina representou o primeiro agente terapêutico que combateu bactérias *in vivo* sem degradação e citotoxicidade em humanos. A Penicilina foi descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming em Londres. Fleming observou um halo de inibição promovido por *Penicillium notatum* em uma cultura de *Staphylococcus aureus*. Howard Walter

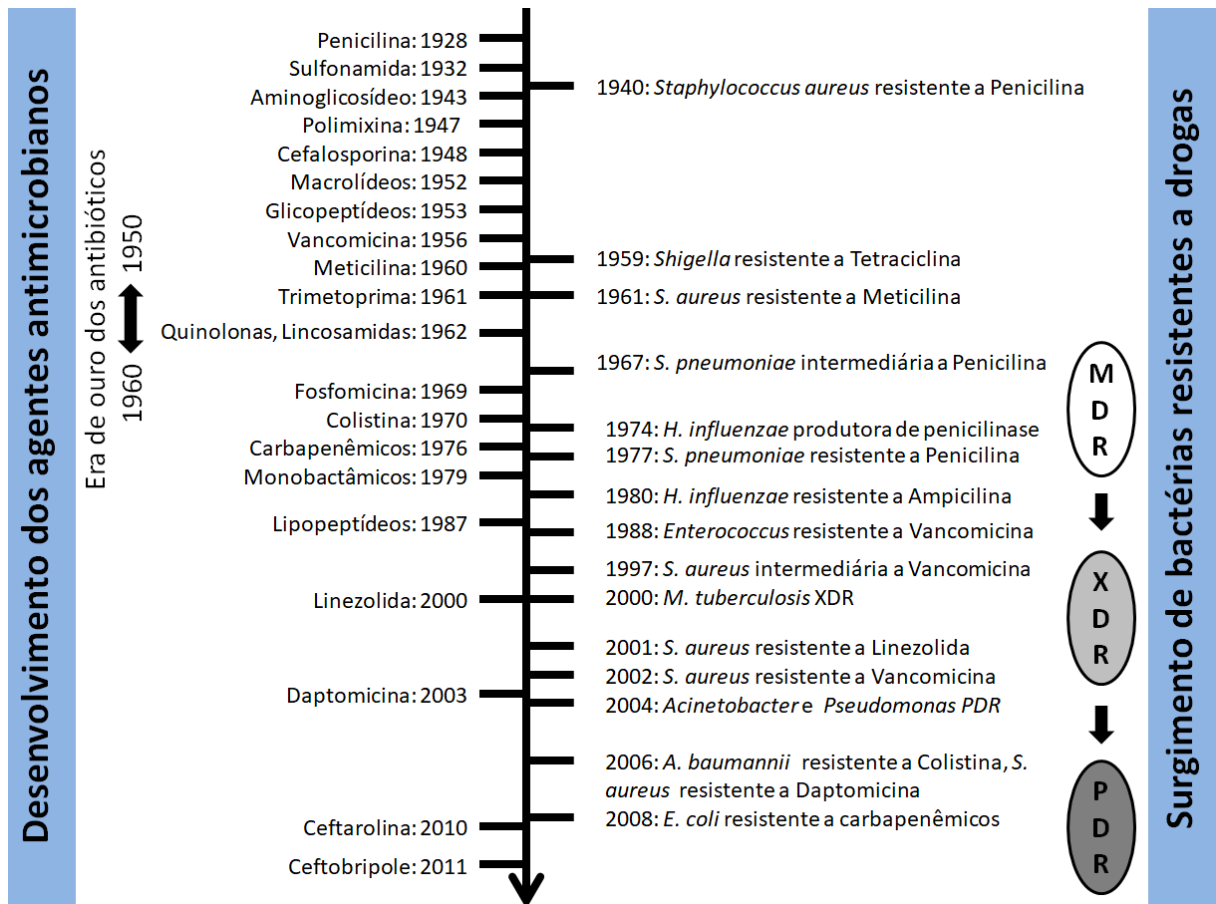
Florey e Ernst Boris Chain elucidaram a estrutura da Penicilina e iniciou-se a produção em larga escala. Fleming, Florey e Chain foram laureados em 1945 com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta da Penicilina, seus efeitos em diversas doenças infecciosas e com papel fundamental na Segunda Guerra Mundial. (BI *et al.*, 2021; KARDOS; DEMAIN, 2011; MOHR, 2016; MURUGAIYAN *et al.*, 2022).

Em 1947 o termo antibiótico foi definido por S. A. Waksman como uma substância química produzida por microrganismos, que apresentava a capacidade de inibir o crescimento e até eliminar bactérias e outros microrganismos. Em 2000 D. R. Forsdyke trouxe uma nova descrição para o termo antibiótico, como uma substância química que geralmente em baixas concentrações inibem microrganismos em um organismo hospedeiro (BENTLEY; BENNETT, 2003; MOHR, 2016).

Os grandes resultados e de longo alcance da era de ouro dos antibióticos na década seguinte a Penicilina tiveram um início tranquilo, uma variedade de antibióticos foram desenvolvidos (Figura 4) e continuaram a melhorar em relação à eficácia intrínseca e espectro de atividade. A utilização para tratar infecções bacterianas salvaram e aumentaram a expectativa de inúmeras vidas (MURUGAIYAN *et al.*, 2022).

Os antibióticos além de tratar inúmeras doenças infecciosas, também predispueram a resistência à própria antibioticoterapia através da pressão seletiva. O desenvolvimento da resistência é causado pela rápida evolução bacteriana sob pressão seletiva podendo progredir para qualquer antibiótico. Uma pressão seletiva contínua de antibióticos usados rotineiramente é uma pré-condição importante para o aumento de cepas resistentes (KOLAR; URBANEK; LATAL, 2001; WRIGHT; PAAUW, 2013). Na Figura 4 observa-se o surgimento da resistência antimicrobiana com suas classificações em detrimento ao surgimento de novos antibióticos.

Figura 4: Linha do tempo de oito décadas de descoberta de antibióticos ao lado o surgimento da resistência. MDR: multi-resistente a drogas, XDR: extensivamente resistente a drogas e PDR: pan-resistente a drogas.



Fonte: Murugaiyan *et al.*, 2022 adaptado.

Os agentes antimicrobianos são classicamente subdivididos em dois grupos com base em seu efeito *in vitro* sobre as bactérias, podendo ser bacteriostáticos ou bactericidas. Os agentes bacteriostáticos são conhecidos por inibirem o crescimento bacteriano e bactericidas por erradicarem as bactérias, assim para definir com precisão esta classificação os testes de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) são utilizados, tais como a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). A CIM é considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível, enquanto a CBM é a menor concentração de um antibiótico que não apresenta crescimento bacteriano em agar por 24 horas (CALHOUN; WEMUTH; HALL, 2022). Os TSAs além de classificar os antibióticos orientam a escolha da terapia antimicrobiana mais adequada e guiam estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. As técnicas indicadas para a realização dos testes são conduzidas por normativas frequentemente atualizadas, tais como a

*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (CUSACK et al., 2019).*

No Brasil por meio da portaria 64 do diário oficial nº 240 de 11 dezembro de 2018 (BRASIL, 2018), instituiu o seguinte artigo:

Art. 1º: Fica determinado aos laboratórios da rede pública e rede privada, de todas as Unidades Federadas, a utilização das normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), tendo como base os documentos da versão brasileira do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST / versão BrCAST)*.

A análise dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos proporcionado pelos resultados dos TSAs são essenciais para orientar e maximizar a eficácia da terapia antimicrobiana por meio de ajustes de doses e intervalos, otimizando o tratamento. A farmacocinética (PK) define o curso do fármaco no organismo por meio do estudo da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) no sangue e outros fluidos, bem como nos tecidos onde a infecção pode se desenvolver. Os principais parâmetros analisados são a concentração sérica máxima (C<sub>máx</sub>), área sob a curva (AUC) em determinado tempo, constante da taxa de eliminação (K<sub>el</sub>), tempo médio de residência (MRT), volume de distribuição (V<sub>d</sub>), clearance (CL) e meia-vida. A farmacodinâmica (PD) descreve o efeito da droga no corpo quando atinge o alvo da infecção. Em UTI um volume de distribuição maior é comum e em alguns casos, doses de ataque são necessárias para rapidamente atingir concentrações terapêuticas. Doses de manutenção devem ser baseadas em estimativas de eliminação das drogas que geralmente estão correlacionadas com a função renal (CALHOUN; WEMUTH; HALL, 2022; DEL BONO *et al.*, 2017; ROBERTS; TACCONE; LIPMAN, 2016).

Todos os medicamentos podem apresentar reações adversas e os antibióticos não são exceção. Em determinadas doses ou devido a condições clínicas dos pacientes o antibiótico pode trazer toxicidade direta e com inúmeros efeitos colaterais, atingindo altos níveis no organismo devido à redução do metabolismo e da eliminação. Alguns antibióticos requerem análise dos índices PK/PD para prevenção de efeitos adversos que incluem: alterações renais, cardíacas, hematológicas, dermatológicas, neurológicas, hepatológicas, miopatias, anormalidades eletrolíticas e etc (CALHOUN; WEMUTH; HALL, 2022; WRIGHT; PAAUW, 2013).

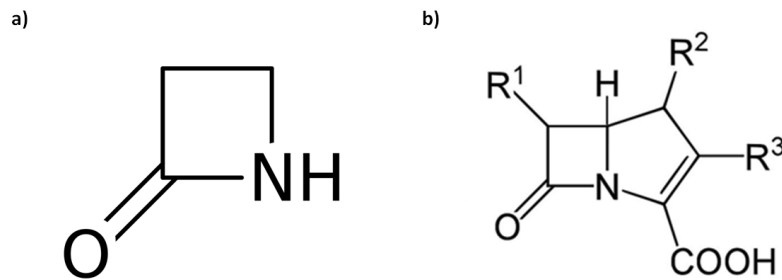
Os antibióticos apresentam uma toxicidade seletiva aos patógenos e são agrupados em classes com base em sua estrutura molecular ou diferentes mecanismos de ação. As classes de antibióticos de acordo com sua estrutura molecular são classificadas como: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e fluoroquinolonas, estreptograminas, sulfonamidas, tetraciclina, nitroimidazólicos, cloranfenicol, ansamicinas, oxazolidinonas, pleuromutilinas, glicopeptídeos, lipopeptídeos, lipoglicopeptídeos, polimixinas, lincosamidas e entre outros. Os mecanismos de ação incluem a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de proteínas, inibição da replicação de ácidos nucleicos e da transcrição, dano à membrana plasmática e inibição da síntese de metabólitos essenciais (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; ULLAH; ALI, 2017).

#### **2.4.1 Carbapenêmicos**

Os beta-lactâmicos são uma classe de antibióticos com elevada importância terapêutica que se define pela presença do anel beta-lactâmico (Figura 5a). As penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos fazem parte desta classe que apresentam estruturas e espectro de ação diferentes; porém com o mecanismo de ação semelhante, ligando e inativando as proteínas de ligação à penicilina (Penicillin-binding proteins, PBPs) resultando em lise e morte bacteriana (AURILIO *et al.*, 2022; MELETIS, 2016).

Modificações estruturais no anel beta-lactâmico por meio da associação de um carbapenem (Figura 5b) deram origem à classe de antibióticos carbapenêmicos. Os carbapenêmicos são antimicrobianos bactericidas que conferem um amplo espectro de ação, incluindo atividade contra a maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Os antibióticos mais comuns em uso clínico são o IMP, Meropenem, Ertapenem e o Doripenem (CODJOE; DONKOR, 2017; EYLER; SHVETS, 2019; MELETIS, 2016; YEKANI *et al.*, 2022).

Figura 5: Estrutura química. a) Anel Beta-lactâmico; b) Carbapenem associado ao anel beta-lactâmico.



Fonte: (a) Imming; Klar; Dix, (2000) (b) Thomas, (2020).

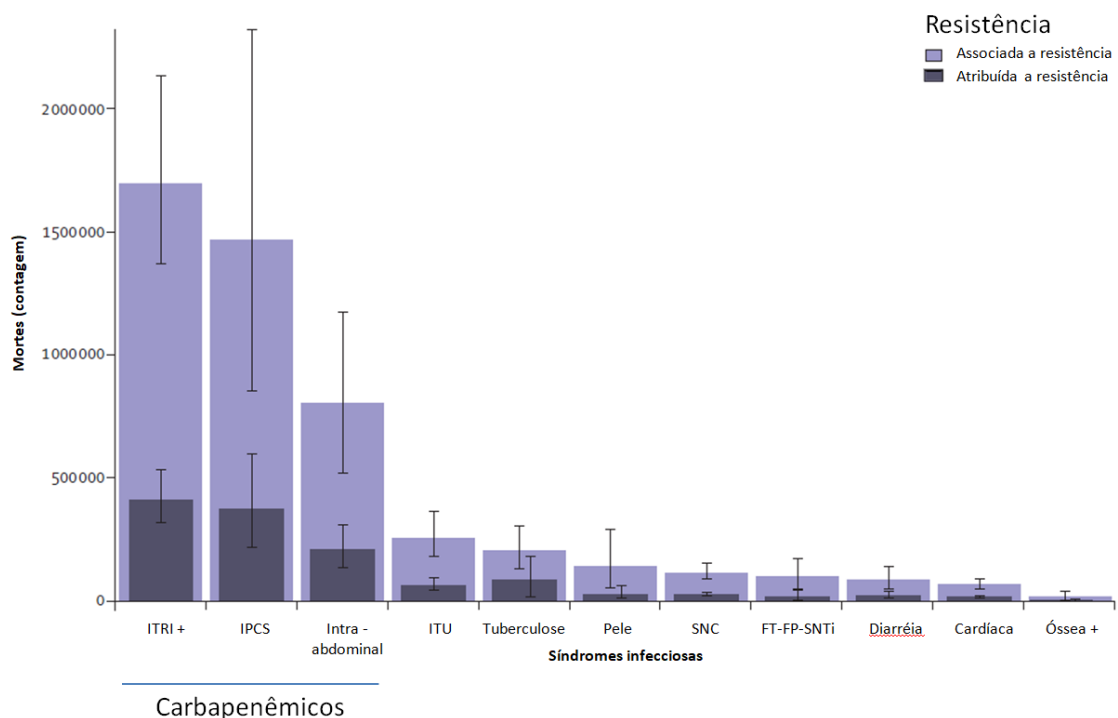
#### 2.4.1.1 Resistência a carbapenêmicos

*K. pneumoniae* tem sido constantemente estudada por produzir enzimas que hidrolisam determinadas classes de antibióticos. As enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) foram observadas na Europa em 1983 e nos Estados Unidos em 1989, as quais podem hidrolisar as cefalosporinas de terceira geração tornando ineficaz o tratamento. Devido a este mecanismo de resistência, os carbapenêmicos passaram a ser uma opção de tratamento para ESBLs, entretanto a resistência aos carbapenêmicos começaram a ser notificadas (ASHURST; DAWSON, 2022).

Os regimes terapêuticos atuais para pneumonia por *K. pneumoniae* por infecções nosocomiais e confirmação de ESBL incluem os carbapenêmicos que podem ser utilizados como monoterapia até que a sensibilidade seja relatada. Quando a resistência a carbapenêmicos é identificada opções para o tratamento incluem antibióticos da classe das polimixinas, tigeciclina, fosfomicina, aminoglicosídeos, carbapenêmicos com terapia combinada a inibidores de beta-lactamase (Vaborbactam e Relebactam) e Ceftazidima-Avibactam também tem sido terapia de escolha no tratamento. Sendo que a notificação de resistência já foi relatada para a maioria das drogas citadas, com exceção a terapias combinadas. Estudos demonstram que a terapia combinada de dois ou mais agentes pode diminuir a mortalidade em comparação com a monoterapia isolada. No Brasil as terapias combinadas com Vaborbactam e Relebactam ainda não foram aprovadas. (AFONSO; MILER-DA-SILVA; GARRIDO, 2022; ASHURST ; DAWSON, 2022).

Murray e colaboradores (MURRAY *et al.*, 2022) apresentaram as três principais síndromes infecciosas que dominaram as incidências globais em 2019 (Figura 6), são elas: infecções respiratórias e torácicas inferiores (ITRI+), infecções da corrente sanguínea (IPCS) e infecções intra-abdominais. Combinadas, estas três síndromes foram responsáveis por 78,8% das mortes atribuíveis a resistência a antimicrobianos e apresentam correlação direta com resistência a carbapenênicos. Somente as infecções respiratórias inferiores foram responsáveis por mais de 400.000 mortes e 1,5 milhões de mortes associadas a resistência antimicrobiana. Seguidas das infecções do trato urinário (ITU), pielonefrite, tuberculose, infecções bacterianas de pele/sistemas subcutâneos, meningite/outras infecções bacterianas do sistema nervoso central (SNC), febre tifóide, febre paratifóide, *Salmonella* spp. não tifóide invasiva (FT-FP-SNTi), diarreia, endocardite, outras infecções cardíacas, infecções ósseas, articulações e órgãos relacionados (MURRAY *et al.*, 2022).

Figura 6: Mortes globais por síndromes infecciosas em 2019 associadas e atribuíveis à resistência bacteriana.

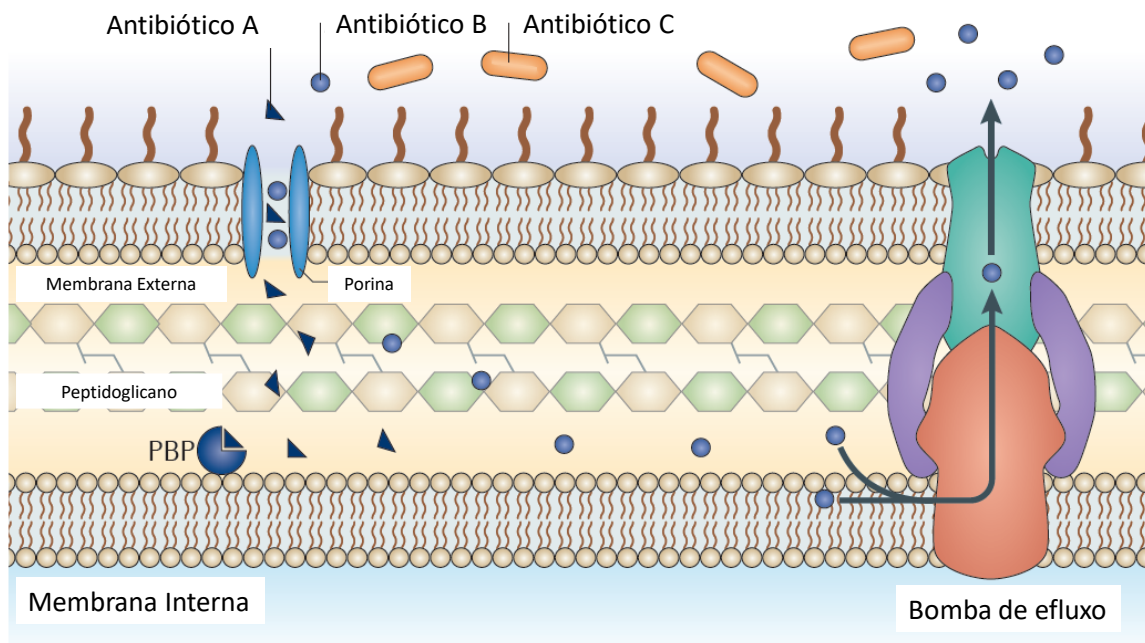


Fonte: Murray *et al.*, 2022 adaptado.

A resistência a carbapenênicos pode ser decorrente de múltiplos mecanismos, incluindo a hiperexpressão de bombas de efluxo, que reduzem a concentração do antibiótico no interior das células, perda ou expressão reduzida das

porinas e produção de enzimas que degradam a droga e diminuem a permeabilidade da membrana externa aos antibióticos (CODJOE; DONKOR, 2017; JENSEN, 2003; WYRES; LAM; HOLT, 2020). A Figura 7 apresenta uma visão geral da ação do antibiótico e mecanismos de resistência descrita por BLAIR *et al.* (2015). Neste esquema o antibiótico A atravessa a célula bacteriana através de uma proteína chamada porina que atinge seu alvo e inibe a síntese do peptidoglicano. O antibiótico B também atravessa a célula através da porina, porém ao contrário do Antibiótico A, o mesmo é eficientemente removido pela bomba de efluxo. O antibiótico C não atravessa a membrana externa e não consegue acessar a PBP alvo, devido à perda de porinas (BLAIR *et al.*, 2015).

Figura 7: Esquema dos mecanismos de resistência a carbapenêmicos.



Fonte: Blair *et al.*, (2015) adaptado.

#### 2.4.1.1.1 Carbapenemases

As carbapenemases são um tipo específico de beta-lactamase, são enzimas que frequentemente se localizam no espaço periplasmático e atribuem às bactérias resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, já que hidrolisam o anel beta-lactâmico, o antimicrobiano perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017).

Inúmeros critérios de classificação foram propostos para a classificação destas enzimas, porém o mais difundido e utilizado pela comunidade científica é a classificação de Ambler (1980). Na classe de Ambler as beta-lactamases são analisadas de acordo com suas sequências genéticas, bem como propriedades fenotípicas. As carbapenemases são incluídas nas classes A, B e D com enzimas de sítio ativo de serina e enzimas que requerem a presença de zinco para atuar. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é um tipo de carbapenemase de classe A de Ambler, com primeira notificação em 2001 na Carolina do Norte-EUA em um isolado de *K. pneumoniae*. Já na Classe B estão as Metallo-beta-lactamases (MBLs), sendo a mais comum as Imipenemases. Na Figura 8 as distribuições das Metallo-beta-lactamases são apresentadas com consequente presença de clones disseminados em diversos continentes. Na Classe C estão presentes lactamases que não conferem resistência aos carbapenêmicos. Enquanto na Classe D encontram-se as Oxacilinasas (OXA), que também hidrolisam os carbapenêmicos e as mais conhecidas são a do subtipo OXA-48, mais difundidas no continente Europeu. (JONES, 1998; ROSSI GONÇALVES *et al.*, 2017; ZHAO; HU, 2015).

Embora as bactérias possam ser intrinsecamente resistentes, elas também acumulam genes que são capazes de mediar seu movimento dentro do genoma ou entre diferentes células. Desta forma os elementos genéticos móveis são responsáveis por grande parte da variabilidade fenotípica observada na resistência antimicrobiana e entre as espécies bacterianas. Os elementos mais relevantes para a resistência a carbapenemase, são os plasmídeos, os genes (*blaKPC*, *blaMBL* e *blaOXA*) e os transposons (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Plasmídeos são fragmentos de DNA extracromossomais de fita dupla que entre outras funções carregam genes que conferem uma maior vantagem quanto à adaptação da bactéria em diferentes ambientes e genes de resistência a antibióticos. Genes como *blaKPC*, *blaMBL* e *blaOXA* são comumente associados à resistência e reportados em plasmídeos conjugativos. A presença de diversos genes de resistência em um mesmo plasmídeo é detectado rotineiramente, colaborando para a disseminação de bactérias MDR, XDR e PDR. Transposons são elementos genéticos com habilidade de se movimentar no genoma bacteriano através de um mecanismo denominado transposição. Devido a sua alta mobilidade no genoma bacteriano, comumente os transposons associam-se a plasmídeos conjugativos, facilitando também a mobilidade de genes de resistência entre diferentes

microrganismos (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Figura 8: Distribuição de Metalo-beta-lactamases. VIM (Verona Imipenemase), SPM-1 (São Paulo Imipenemase), GIM (Germany Imipenemase), SIM-1 (Seul Imipenemase), AIM-1 (Australian Imipenemase), KHM (Kyorin University Hospital) e NDM-1 (New Delhi Imipenemase).

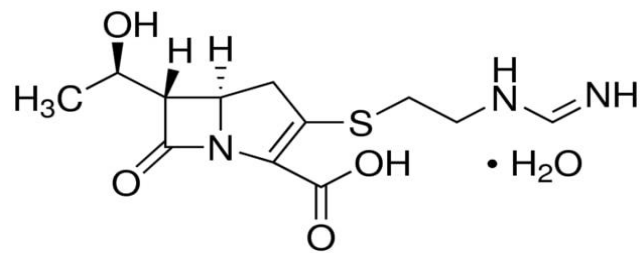


Fonte: A autora.

#### 2.4.1.2 Imipenem

O primeiro carbapenêmico, tienamicina, foi descoberto em 1976 como um produto natural de *Streptomyces cattleya*, uma bactéria Gram-positiva isolada do solo. Devido à sua instabilidade, a tienamicina foi sinteticamente modificada para N-formimidoil-tienamicina, que recebeu o nome de Imipenem (Figura 9) e em 1985 foi aprovado pelo FDA para a utilização nos Estados Unidos (HENRY, 2019; NORRBY, 1995; RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006).

Figura 9: Estrutura molecular do IMP.



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2022.

O IMP é rapidamente degradado pela enzima desidropeptidase renal-1 (DHP-1) sendo co-administrado na proporção de 1:1 com a Cilastatina, um inibidor desta enzima. Além de inibir o metabolismo renal do IMP a Cilastatina aumenta sua concentração sérica, prolongando sua meia-vida e protegendo os rins contra potenciais efeitos tóxicos exercidos por altas doses do antibiótico. A Cilastatina não possui atividade antimicrobiana, assim apenas a dosagem do IMP é fornecida, variando clinicamente entre pacientes não-críticos e críticos (CLISSOLD; TODD; CAMPOLI-RICHARDS, 1992; CODJOE; DONKOR, 2017; RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006). O IMP é uma molécula hidrofílica caracterizada por uma meia-vida de cerca de uma hora, rápida distribuição para a maioria dos tecidos e baixa ligação às proteínas plasmáticas (<20%). Exibe efeito bactericida dependente do tempo e efeito pós-antibiótico significativo. Tal como acontece com outros beta-lactâmicos, um importante índice PK/PD que se correlaciona com sua eficácia terapêutica é a %T>CIM (porcentagem do tempo maior que a CIM) de um patógeno. Infecções graves em pacientes críticos que a alteração da fisiologia pode levar a concentrações plasmáticas sub-terapêuticas e as metas %T>CIM podem exigir um valor de até 100%, em comparação com a meta convencional de 40% para pacientes não críticos (DINH *et al.*, 2022; LIPS *et al.*, 2014; VALERO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). Além de apresentar amplo espectro de ação o antibiótico é eficaz contra espécies que sintetizam enzimas beta-lactamases, como as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (MOHAMMED; ABASS, 2019).

## 2.5 TERAPIAS EMERGENTES

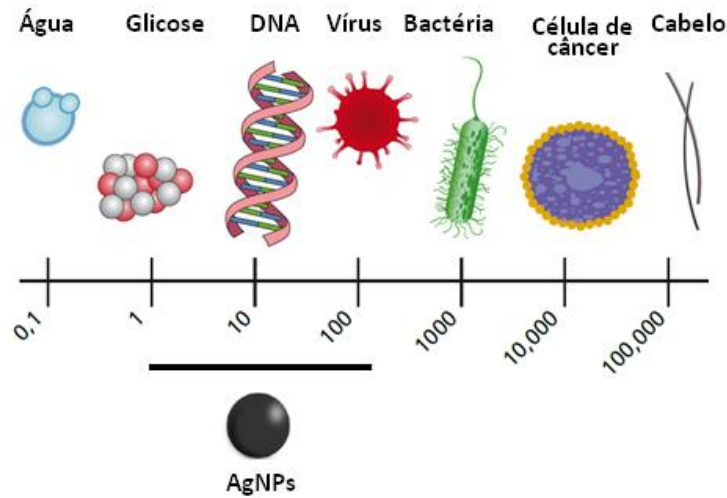
Os agentes antibacterianos são drogas complexas para pesquisa, descoberta e desenvolvimento; especialmente para patógenos Gram-negativos que possuem estruturas únicas de revestimento celular. Novas plataformas emergentes de química sintética auxiliaram na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. Pesquisas, colaborações, financiamento são necessários para a inovação e o combate aos microrganismos resistente; embora avanços significativos tenham ocorrido na terapia antibacteriana (KONG; YANG, 2021). Assim, diversos estudos têm empregado tecnologias na identificação de antígenos que poderiam ser potencialmente usados para desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em estágio inicial forneceram resultados promissores em microrganismos resistentes (MCCONNELL, 2019). Bacteriófagos foram utilizados como tratamentos para controlar infecções bacterianas no início da década de 1920-1930 e as pesquisas retornaram após a necessidade de novos antimicrobianos. Os bacteriófagos também tem auxiliado na linha de pesquisa de engenharia genética CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, do inglês, *Clustered regularly interspersed short palindromic repeats*). Os sistemas CRISPR estão relacionados a edição genética com o objetivo de oferecer uma especificidade inerente para um patógeno alvo e pode ser utilizado para erradicar seletivamente espécies de bactérias patogênicas específicas (SEAL *et al.*, 2018). Tecnologias baseadas em complexos metálicos indicam que alguns íons metálicos causam diferentes tipos de danos ao microrganismo como resultado da degradação da membrana, disfunção proteica e estresse oxidativo. Estes mecanismos de ação, combinados com a ampla gama de geometrias tridimensionais que os complexos metálicos nanométricos podem adotar, tem apresentados resultados adequados para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020).

## 2.6 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia tem sido descrita como uma das áreas mais promissoras do século XXI e está relacionada à manipulação da matéria em nível atômico. Este conceito foi apresentado em 1959 pelo físico norte-americano Richard Feynman durante o encontro da Sociedade Americana de Física, tornando-o precursor da nanotecnologia. Em 1974, Norio Taniguchi foi o primeiro a utilizar o termo nanotecnologia para descrever processos em escala nanométrica, que consistia em separação, consolidação e deformação de materiais em nível atômico ou molecular (BAYDA *et al.*, 2020; HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

A nanotecnologia é definida como a compreensão e controle da matéria em dimensões nanométricas, entre 1 e 100 nm. Sendo que o termo nanômetro representa a milionésima parte de um metro ( $10^{-9}$  m), que geralmente consiste de 10 a  $10^5$  átomos. Diferentes diâmetros dos nanomateriais são comparados com a dimensão em nanoescala, conforme apresentada na Figura 10 (BAYDA *et al.*, 2020; NASROLLAHZADEH *et al.*, 2019). Atualmente a nanotecnologia tem sido aplicada em diversas áreas, desde o tratamento de água (MACHADO *et al.*, 2019), agricultura (USMAN *et al.*, 2020), formulação cosmética (SANTOS *et al.*, 2019), medicina humana (SINDHWANI; CHAN, 2021), medicina veterinária (EL-SAYED; KAMEL, 2020), biomedicina (JAVED *et al.*, 2020) e entre outros. Em particular, a aplicação da nanotecnologia em microbiologia tem contribuído principalmente na detecção de agentes infecciosos e na elaboração de novas drogas com atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. A ação em bactérias patogênicas causadores de infecções graves, inclusive resistentes aos antimicrobianos convencionais também tem sido frequentemente relatada (KOBAYASHI; NAKAZATO, 2020).

Figura 10: Comparação do diâmetro das Nanopartículas a células biológicas, bactérias, vírus e entre outros.



Fonte: Savolainen *et al.*, 2013 adaptado.

### 2.6.1 Nanomateriais

As NPs são classificadas de acordo com suas dimensões, formas, tamanhos e o material utilizado em sua síntese. Elas podem apresentar formatos cilíndrico, esférico, tubular, espiral e até irregular. O material constituinte determinará a característica de uma nanopartícula sendo orgânica ou inorgânica. As NPs orgânicas são biodegradáveis e atóxicas, sendo compostas por biopolímeros, lipossomas, micelas, quitosana, lignina e entre outros biocomponentes. Estas NPs são amplamente utilizadas principalmente na administração de fármacos garantindo sua distribuição direcionada. As NPs inorgânicas são compostas por metais ou óxidos metálicos, como ouro (Au), prata (Ag), cobre (Cu) e zinco (Zn); que apresentam alta relação superfície-volume (MADDELA; CHAKRABORTY; PRASAD, 2021).

A síntese de nanoestruturas inorgânicas se enquadra em duas categorias: *top-down* e *bottom-up*. A abordagem *top-down* consiste na remoção da matéria com estruturas originalmente maiores para a obtenção de nanoestrutura desejada. A abordagem *bottom-up* refere-se à construção de nanoestruturas, átomo por átomo ou molécula por molécula por métodos físicos e químicos (BAYDA *et al.*, 2020). A caracterização das NPs visa verificar sua morfologia, área de superfície, diâmetro,

distribuição e outros parâmetros importantes que a tornam essencial para aplicações biomédicas. Assim, diversas técnicas de caracterização podem ser utilizadas, como a espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), difração de raio-X (DRX), espalhamento dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), entre outras (MADDELA; CHAKRABORTY; PRASAD, 2021).

### 2.6.2 Nanopartículas de prata

A prata é reconhecida pela ação antibacteriana desde a Grécia antiga. Um exemplo de eficiência da atividade da prata é a sulfadiazina de prata 1%, conhecida como Silvadene® (Dermazine®, no Brasil), que foi aprovada em 1968 pelo FDA para uso como um antibiótico de amplo espectro em queimaduras (CLAUDEL; SCHWARTE; FROMM, 2020). Em nanotecnologia tem sido evidenciada o uso de AgNPs com o crescimento da resistência bacteriana (PANACEK *et al.*, 2018). Considerando as propriedades intrínsecas da prata associadas à pequena propensão de induzir resistência microbiana, além de possuir baixa toxicidade para célula humana, as AgNPs representam uma nova geração de antimicrobianos com um amplo espectro de ação.

Os mecanismos de ação das AgNPs estão diretamente relacionada a destruição da parede celular, desestabilização ribossomal, formação de radicais livres e a intercalação entre bases de DNA dos organismos. Estudos relatam que as AgNPs podem danificar as membranas celulares levando a mudanças estruturais, que tornam as bactérias mais permeáveis (LAZAR, 2011; FRANCI *et al.*, 2015; JESUS *et al.*, 2018). Este efeito está associado ao tamanho, forma e concentração das NPs, em que o seu acúmulo na membrana cria lacunas na integridade da bicamada predispondo um aumento da permeabilidade, levando a morte celular bacteriana. As interações com as membranas e qualquer dano resultante, estão fortemente relacionadas às NPs com um menor diâmetro (RAI *et al.*, 2014; FRANCI *et al.*, 2015).

O elevado nível de formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio estão atribuídos à liberação de íons de prata da superfície das NPs, em que o efeito combinado entre a atividade das NPs e os íons livres contribuem para produzir uma

forte atividade antibacteriana de amplo espectro. Além disso, os íons de prata preferem interagir com os grupos tióis, fosfatos, hidroxilas entre outros, carregados negativamente; causando alterações estruturais e deformações na parede, nas membranas e danos em suas estruturas intracelulares. Como consequência, os ribossomos podem ser desnaturados com inibição da síntese proteica, assim como a tradução e a transcrição podem ser bloqueadas pela ligação com o material genético da célula bacteriana (FOLDBJERG; DANG; AUTRUP, 2011; FRANCI *et al.*, 2015; SRINIVASAN *et al.*, 2016).

A associação das NPs com agentes antimicrobianos tem sido relatada na literatura em busca de métodos alternativos ao tratamento de microrganismos resistentes. As AgNPs são consideradas opções ideais para se associar a antibióticos sem comprometer sua atividade. Além disso, a interação entre as AgNPs e os antibióticos são frequentemente utilizados como agentes antimicrobianos devido à sua capacidade de agir em conjunto, obtendo maior eficácia na penetração celular e na destruição da parede celular. A vantagem de utilizar a combinação refere-se à eficiência na ação, em que bactérias resistentes a um dos componentes, o outro componente poderá combatê-los de uma maneira alternativa (AHAMED; ALSALHI; SIDDIQUI, 2010; RAI; PRABHUNE; PERRY, 2010; SMEKALOVA *et al.*, 2016).

## 2.7 FASES DE ESTUDO DE NOVAS DROGAS ANTIMICROBIANAS

A *pipeline* para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas no FDA (EUA) envolve a propriedade intelectual e estudos pré-clínicos, onde o sucesso traz um pedido investigacional. A droga é então avaliada em humanos por meio de uma série de ensaios clínicos (Fase I–III). O sucesso leva a administração da nova droga, permitindo a entrada no mercado para prescrição e venda a pacientes/consumidores. Em média esta rota leva de 10 a 17 anos (FARHA; BROWN, 2019).

Um estudo apresentado por europeus se assemelha a *pipeline* do FDA. Lacunas no financiamento são encontradas nos estágios iniciais da descoberta, bem como durante a otimização do antimicrobiano, que estão associados principalmente a pesquisas acadêmicas e a pequenas/médias empresas. Os números de antimicrobianos submetidos em fases iniciais são consideráveis e pelo menos uma

droga comercializável é aprovada. O tempo depende de vários fatores e podem variar. Um intervalo mínimo a máximo na Europa para o desenvolvimento completo da droga, da descoberta ao mercado é de 8 a 18 anos com média de 13 a 14 anos. O custo por droga (em milhões de euros) não inclui os custos associados a falhas e extensões do projeto que podem aumentar o orçamento necessário para as fases iniciais, sendo necessário na área de antimicrobianos não só investimentos em drogas mas o uso racional de antimicrobianos e unificação da saúde (MIETHKE *et al.*, 2021).

## 2.8 STEWARDSHIP ANTIMICROBIANO

*Stewardship* antimicrobiano é um conjunto coerente de ações que promovem o uso de antimicrobianos de forma a garantir acesso a terapia adequada (DYAR *et al.*, 2017). O programa é a chave para a prevenção do surgimento de resistência antimicrobiana. A correta administração envolve a seleção de um antibiótico apropriado, otimização da sua dose através da análise PK/PD e duração para o tratamento de infecções. Várias estratégias, incluindo prescrição, educação, simplificação, ciclo de antibióticos e criação de softwares foram propostos para melhorar a administração de antibióticos (FISHMAN, 2006).

O termo *Stewardship* foi correlacionado ao uso de antibióticos em um manuscrito de 1996, onde John McGowan e Dale Gerding abordaram sobre a crescente resistência antimicrobiana em hospitais e questionaram a melhor forma de controlar a resistência e otimizar a administração do uso de antimicrobianos (CHARANI; HOLMES, 2019).

Em hospitais inicialmente há escalonamento de agentes antimicrobianos de amplo espectro na ausência da identificação e TSAs do agente etiológico da infecção, como consequência a flora comensal normal é reduzida, comprometendo assim a imunidade do hospedeiro e levando ao desenvolvimento de várias infecções oportunistas. O programa *Stewardship* orienta sobre o descalonamento e reescalonamento de antimicrobianos específicos com o espectro de ação mais estreito possível, após o resultado microbiológico (LAPLANTE *et al.*, 2017).

Apesar dos novos antibióticos e novas tecnologias a visão do programa *Stewardship* antimicrobiano deverá permanecer devido a rapidez em que as bactérias desenvolvem resistência (RUIZ-RAMOS; RAMÍREZ, 2022).

## 2.9 ONE HEALTH

Em 2005 o *The Lancet* publicou sua primeira referência ao conceito *One Health* em um artigo sobre a cooperação entre saúde humana e animal fortalecendo os sistemas de saúde. A abordagem *One Health* implica na integração e unificação em vários níveis: em primeiro lugar unificação da saúde humana, animal e ambiental; em segundo lugar, mobilização da cooperação intersetorial e multidisciplinar, quebrando barreiras em sistemas governamentais; em terceiro lugar, promoção da cooperação conjunta entre países e regiões para enfrentar as ameaças a níveis: global, regional e local como preparação, resposta a pandemias, mudanças climáticas e entre outros; e em quarto lugar, promoção da participação e melhor consciência social para o desenvolvimento sustentável da tríade homem-animal-ambiente (ZHOU *et al.*, 2022).

A visão *One Health* para resistência antimicrobiana envolve a administração de antimicrobianos em seres humanos, animais e ambiente. A disseminação global de bactérias resistentes na tríade deve ser analisada. A necessidade da adoção de medidas para preservar a eficácia contínua dos antimicrobianos existentes e eliminar seu uso inapropriado, principalmente quando utilizados em grandes volumes como em dietas animais para promoção do crescimento com a adição de colistina, tetraciclina e macrolídeos. Em humanos é essencial a interrupção da propagação de bactérias resistentes. No ambiente o tratamento inadequado de resíduos industriais, residenciais e agrícolas vem ampliando a resistência bacteriana (COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

### 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 DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As AgNPs foram sintetizadas utilizando o método químico *bottom-up* por meio da redução do nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ , Sigma-Aldrich, 209139) por borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ , Sigma-Aldrich, 452882) para a obtenção da solução coloidal. Sendo, todas as vidrarias e barras magnéticas utilizadas lavadas com água régia, com proporção de 1:3 de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ,  $\geq 65\%$ , Sigma-Aldrich, 84378) e ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ , 37%, Neon, 02618) para remoção de metais contaminantes (KING; MASSICOT; MCDONAGH, 2015). Uma alíquota de 30 mL da solução de  $\text{NaBH}_4$  a 1 mM foi resfriada e agitada por 1 h a  $0^\circ\text{C}$  em um banho ultratermostático (Marconi, MA-184). Posteriormente 10 mL de  $\text{AgNO}_3$  a 2mM foi adicionado à solução e após 7 minutos a solução de prata coloidal com coloração amarela foi observada (MULFINGER *et al.*, 2007). A estabilização das NPs foram realizadas por meio do recobrimento com o ácido-alfa lipóico (Sigma Aldrich, T5625) em uma concentração de 7 mM (COTTON *et al.*, 2019; GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2020; NISKA *et al.*, 2016). Os subprodutos químicos da síntese foram removidos por meio da centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos (Multifuge X1R; Thermo Scientific), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em água ultrapura. A amostra foi armazenada ao abrigo de luz e a caracterização realizada pelas técnicas de espectroscopia UV-Vis, DLS e espectroscopia FT-IR.

A determinação da concentração das AgNPs foi calculada pela Lei de Lambert-Beer, conforme descrito na Equação 1 (PARAMELLE *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2018). A lei de Lambert Beer é uma relação empírica que, na óptica, relaciona o valor do pico de absorção de luz sendo proporcional à concentração das NPs em

solução, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática colimada (OKA *et al.*, 2019). Na Equação 1,  $c$  representa a concentração molar da espécie em solução (mol/L),  $l$  a distância percorrida pela radiação através da solução (cm) e  $\epsilon$  o coeficiente de extinção e  $A$  absorção das NPs no pico de ressonância plasmônica de superfície ( $\lambda_{\text{Máx}}$ ) determinado pela espectroscopia Uv-Vis.

$$A = \epsilon lc \quad [1]$$

O coeficiente de extinção da AgNPs varia de acordo com o tamanho da partícula e pode ser calculado utilizando a teoria de Mie - lei de potência, de acordo com a Equação 2 descrita por Navarro e colaboradores (NAVARRO; WERTS, 2013).

$$\epsilon_{\text{máx}}^{\text{prata}} = Ad^{\gamma}, \text{ onde } A = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \gamma = 3,48; d = \text{diâmetro} \leq 38 \text{ nm} \quad [2]$$

### 3.2 ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL

A aquisição dos espectros de absorção UV-Vis foi realizada no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc., EUA) que apresenta uma resolução de 1,5 nm. A região espectral de 220-750 nm foi selecionada no modo microvolume com utilização de 2  $\mu$ l de cada amostra no pedestal. Os dados foram plotados utilizando o programa OriginPro version 8.5.1 (Origin Lab., EUA).

### 3.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

O diâmetro hidrodinâmico das NPs e o potencial Zeta foram determinados pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). A análise do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (Pdl) foram realizados no modo “size”, sendo utilizado uma alíquota de 400  $\mu$ l das AgNPs depositadas em uma cubeta de poliestireno (ZEN 0118, Sarstedt). As leituras foram realizadas em temperatura de 25°C, tempo de equilíbrio de 120 segundos, com três mensurações de cada amostra no ângulo de 90°. A análise do potencial Zeta das AgNPs foi mensurada no modo “zeta” utilizando os mesmos parâmetros citados anteriormente

com 1 mL da solução coloidal depositadas em uma célula capilar (DTS1070, Malvern). Os resultados correspondem à média de três leituras independentes e com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1 os dados exportados foram plotados.

### 3.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Os espectros no infravermelho médio foram adquiridos no equipamento Spectrum 400 FT-IR/FIR (Perkin Elmer, EUA) utilizando o acessório Gladi-ATR (PIKE Technologies, EUA). Três espectros com 16 varreduras no intervalo de 4000–450  $\text{cm}^{-1}$ , no modo de absorbância, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  foram os parâmetros utilizados para a obtenção do espectro médio. A normalização espectral foi realizada no programa OPUS version 4.2 (Bruker, Alemanha), sendo plotados no programa OriginPro version 8.5.1 (Origin Lab., EUA).

### 3.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A estrutura cristalina das AgNPs sintetizadas foram analisadas em um difratômetro de raios X (XRD-6000, Shimadzu, Japão) com uma fonte Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ), velocidade de 2/min, voltagem 40 kV, corrente de 30 mA e faixa de varredura entre 30° a 90° ( $2\theta$ ). A aquisição foi realizada após a formação de um filme fino em substrato de vidro, sendo identificadas as fases com relação a fichas cristalográficas do Centro Internacional de Dados de Difração no software High Score.

### 3.6 DILUIÇÃO DO ANTIBIÓTICO

O antibiótico IMP (Sigma-Aldrich, PHR-1796) foi previamente diluído seguindo as concentrações descritas pelo Comitê Brasileiro de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCast - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) no guia de pontos de corte (BRCAST; EUCAST, 2022). Uma análise do espectro de absorção foi realizada para certificar a integridade do fármaco para as aplicações biológicas por meio da espectroscopia UV-Vis.

### 3.7 ESTABILIDADE QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS ASSOCIADAS AO IMIPENEM

O estudo da estabilidade química das NPs associadas aos antibióticos em função da concentração de sal se fez necessário devido às aplicações biológicas, as quais envolvem a utilização de meios de cultura e solução salina, com alto teor de sais. Assim, o efeito das diferentes concentrações de NaCl sob a estabilidade das NPs recoberta e associadas aos antibióticos foram analisados pela espectroscopia UV-Visível, permitindo analisar as possíveis curvas de aglomeração impossibilitando sua degradação durante os ensaios susceptibilidade.

### 3.8 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CULTURA

As cepas de *K. pneumoniae* utilizadas para os ensaios microbiológicos foram a cepa-padrão (ATCC 700603) e as cepas clínicas (Kp-S, Kp-I and Kp-R) com diferentes perfis de susceptibilidade ao IMP. As cepas clínicas foram cedidas por meio de um convênio firmado entre o Laboratório Oswaldo Cruz (Kp-S and Kp-I) e o Hospital de Clínicas Sul (Kp-R) de São José dos Campos/SP. A identificação e o TSA das cepas clínicas foram realizados por meio do sistema de automação no equipamento BD Phoenix (Becton Dickinson, EUA), conforme descrito na Tabela 3. As bactérias foram armazenadas em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) (Oxoid, CM 1135) com 20% de glicerol (LGC, 13-1325-10) em ultrafreezer a -80°C. Para os ensaios as cepas foram reativadas em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica (Heratherm, Thermo Scientific, Alemanha) por 24 h a 35°C ( $\pm$  2°C), seguida de semeadura por esgotamento em agar BHI (Oxoid, CM 1136) e incubação. Após o crescimento das subculturas foram realizadas a análise da morfologia das colônias e coloração de Gram.

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade das cepas clínicas de *K. pneumoniae* isoladas de ponta de cateter (Kp-S e Kp-I) e amostra de urina (Kp-R). S = Sensível, I = Intermediário e R = Resistente.

Antimicrobianos	Kp-S SIR	Kp-I SIR	Kp-R SIR
Ampicilina	R	R	R
Ampicilina/Sulbactam	R	R	R
Piperacilina/Tazobactam	R	R	R
Cefuroxima	R	R	R
Cefoxitina	R	R	R
Ceftazidima	R	R	R
Ceftriaxona	R	R	R
Cefepime	R	R	R
Ertapenem	R	R	R
<b>Imipenem</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Meropenem	R	R	R
Amicacina	S	S	S
Gentamicina	S	S	S
Ciprofloxacina	R	R	R

Fonte: A autora.

### 3.9 ENSAIO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a CIM de acordo com a ISO 20776-1 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2019), a qual avalia a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano. Assim, o caldo Mueller-Hinton (MHB, HIMEDIA, M391) foi pipetado em placa de 96 poços e os ensaios com o antibiótico IMP (16 µg/mL a 0,007 µg/mL) e AgNPs ( $32 \times 10^{11}$  partículas/mL a  $0,5 \times 10^{11}$  partículas/mL) foram iniciados. Após a preparação da placa os inóculos foram padronizados na escala McFarland 0,5 com o uso do turbidímetro Densichek plus (BioMerieux, França), seguida de diluição 1:20 ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) com concentração no final do teste de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Os controles negativos (IMP, AgNPs e MHB) e controles positivos também foram incluídos na microplaca que foram seladas e incubadas em estufa por 18 h a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ). Após a incubação houve investigação visual da CIM sendo confirmada pela leitura de densidade óptica por absorbância no comprimento de

onda de 600 nm (OD 600) no espectrofotômetro Synergy HTX (BioTek Instruments, EUA), equipamento disponibilizado pelo laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (UNIVAP). As concentrações utilizadas na associação para a determinação da CIM foram baseadas em experimentos realizados em triplicata e os dois princípios ativos previamente testados isoladamente.

A CBM foi determinada pelo método da microgota, em que um volume de 10 µL dos ensaios da CIM foram depositados na superfície do agar BHI. Após a absorção das microgotas as placas foram invertidas e incubadas por 24 h a 35°C (± 2°C). A ausência de crescimento bacteriano no agar indicaram o efeito bactericida.

Os resultados dos testes de susceptibilidade foram utilizados para determinar o efeito sinérgico entre a associação das AgNPs e o IMP, o qual pode ser calculado por meio do índice de concentração inibitória fracionária (FICI) (Equação 3) e pelo índice de concentração bactericida fracionária (FBCI) (Equação 4).

$$FICI = \frac{CIM \text{ das AgNPs na combinação}}{CIM \text{ das AgNPs}} + \frac{CIM \text{ do Imipenem na combinação}}{CIM \text{ do Imipenem}} \quad [3]$$

$$FBCI = \frac{CBM \text{ das AgNPs na combinação}}{CBM \text{ das AgNPs}} + \frac{CBM \text{ do Imipenem na combinação}}{CBM \text{ do Imipenem}} \quad [4]$$

### 3.10 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS CÉLULAS PLANCTÔNICAS

A determinação da atividade metabólica das células planctônicas foram realizadas por meio do ensaio de resazurina (resazurin sodium salt - Sigma, R7017). Portanto, em cada um dos poços testados na CIM foram adicionados 2 µl do reagente a 6,75 mg/mL e incubado por 2 horas em estufa bacteriológica. Todo o procedimento foi executado ao abrigo de luz. A leitura das unidades relativas de fluorescência (RFU, do inglês *Relative Fluorescence Units*) foi realizada no espectrofotômetro Synergy HTX (BioTek Instruments, EUA) com excitação de 528 nm e emissão de 645 nm. A porcentagem da viabilidade das células planctônicas em

relação ao controle positivo (CP) foi determinada de acordo com a Equação 5, na qual foi subtraído o valor de absorção do grupo controle do material (CM).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{RFU_{amostra} - RFU_{CM}}{RFU_{CP} - RFU_{CM}} \times 100\% \quad [5]$$

### 3.11 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

As cepas planctônicas foram previamente preparadas para as análises do potencial Zeta a fim de remover qualquer influência do agar BHI na superfície bacteriana. Deste modo, três colônias foram removidas do agar, ressuspensas em 5 mL de (solução salina 0,9% e água ultrapura) e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a suspensão bacteriana de  $1 \times 10^5$  UFC/mL utilizada na CIM foi inserida em uma célula capilar (DTS1070, Malvern) e analisada imediatamente pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) no modo “zeta” utilizando os mesmos parâmetros citados na sessão 4.3.

### 3.12 FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os biofilmes foram formados em microplacas de 96 poços por meio da adição de 100  $\mu$ L de caldo BHI e 100  $\mu$ L do inóculo padronizado em solução salina (0,9%) a  $10^7$  UFC/mL, as quais foram incubadas a 35°C ( $\pm$  2°C) em estufa bacteriológica. A cada 24h de incubação o meio foi renovado. A formação do biofilme ocorreu em 48h, após a formação o meio de cultura foi removido e 200  $\mu$ L das AgNPs ( $2 \times 10^{11}$  partículas/mL) combinado com diferentes concentrações do IMP (16  $\mu$ g/mL a 0,25  $\mu$ g/mL) foram adicionadas nos poços por 24h a 35°C ( $\pm$  2°C). Decorrido este período, as microplacas foram cuidadosamente lavadas e determinada a formação do biofilme pela quantificação da biomassa pelo o ensaio do cristal violeta e nos biofilmes tratados foi analisada a atividade metabólica pelo ensaio de resazurina.

### 3.13 CLASSIFICAÇÃO DO BIOFILME PELO TESTE DE CRISTAL VIOLETA

Os biofilmes das cepas de *K. pneumoniae* foram classificados como forte, fraco ou moderado por meio do teste de cristal violeta que avalia a adesão da biomassa. Portanto, após a formação do biofilme o conteúdo de cada poço foi removido e cuidadosamente lavado duas vezes com solução salina estéril 0,9% para remoção de células planctônicas e fracamente aderidas. Adicionou-se em cada poço 200 µL de metanol por 20 minutos para a fixação do biofilme, em seguida o metanol foi retirado e a placa incubada para secagem. Após a fixação os biofilmes foram corados com solução de cristal violeta 1% por 5 min em temperatura ambiente e posteriormente lavado com solução salina estéril 0,9% para a remoção do excesso do corante. Os biofilmes foram submetidos a leitura por absorvância no comprimento de onda de 570 nm no SpectraCount (BS10001, Packard BioScience Company, EUA) após a adição de 200 µL de ácido acético 33% para a determinação da quantificação da biomassa.

### 3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DO BIOFILME PELO ENSAIO DE RESAZURINA

O ensaio de resazurina foi utilizado para determinar a porcentagem da viabilidade dos biofilmes tratados com AgNPs associado ao IMP. Após o tratamento os biofilmes foram lavados cuidadosamente com tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) estéril. Em seguida 200 µL de PBS estéril e 4µl de resazurina (6,75 mg/mL) foram adicionados em cada poço tratado e incubados ao abrigo de luz por 6 horas a 35°C ( $\pm$  2°C) em estufa bacteriológica. A leitura das RFUs foi realizada no espectrofotômetro Synergy HTX (BioTek Instruments, EUA) com excitação 528 nm e emissão 645 nm. Os dados foram submetidos a indicadores estatísticos de qualidade para um bioensaio, particularmente aqueles utilizados em triagens de alto desempenho (*High-Throughput-Screening* - HTS) como em indústrias farmacêuticas. Tais indicadores como o Z-factor (Equação 6), *signal window* (SW, Equação 7) e porcentagem do coeficiente de variação (CV%, Equação 8) foram determinados utilizando o software Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016).

$$Z' = 1 - \frac{3 * (DP amostra + DP controle)}{Média amostra - Média controle} \quad [6]$$

$$SW = \frac{Média amostra - Média controle - 3 * (DP amostra + DP controle)}{DP amostra} \quad [7]$$

$$CV = \frac{DP}{Média} * 100 \quad [8]$$

A porcentagem de viabilidade do biofilme em relação ao controle positivo (CP) foi determinada de acordo com a Equação 6, na qual foi subtraído o valor do grupo controle do material (CM). Portanto, a MBIC foi definida como a concentração que inibe  $\geq 80\%$  da atividade metabólica de cada biofilme tratado em comparação com o controle positivo. Os dados foram analisados em seu nível de significância pelo software Graphpad Prism 8.0.1 (*GraphPad Software*, EUA), utilizando os testes de normalidade e lognormalidade, análise da distribuição dos dados (*Quantile-Quantile*, QQ plot) com avaliação do teste de Shapiro-Wilk considerando uma significância de  $p \leq 0,05$ , seguido da aplicação do ANOVA *one-way* complementado pelo teste de Tukey.

### 3.15 MICROGRAFIAS DOS BIOFILMES

As micrografias dos biofilmes foram obtidas em um microscópio de fluorescência Leica DMIL acoplado a uma câmera DFC 310 FX por meio do software Leica Application suite versão 4.6.1 (Leica Microsystems, Alemanha). O campo claro foi utilizado para os ensaios de cristal violeta e biofilmes tratados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

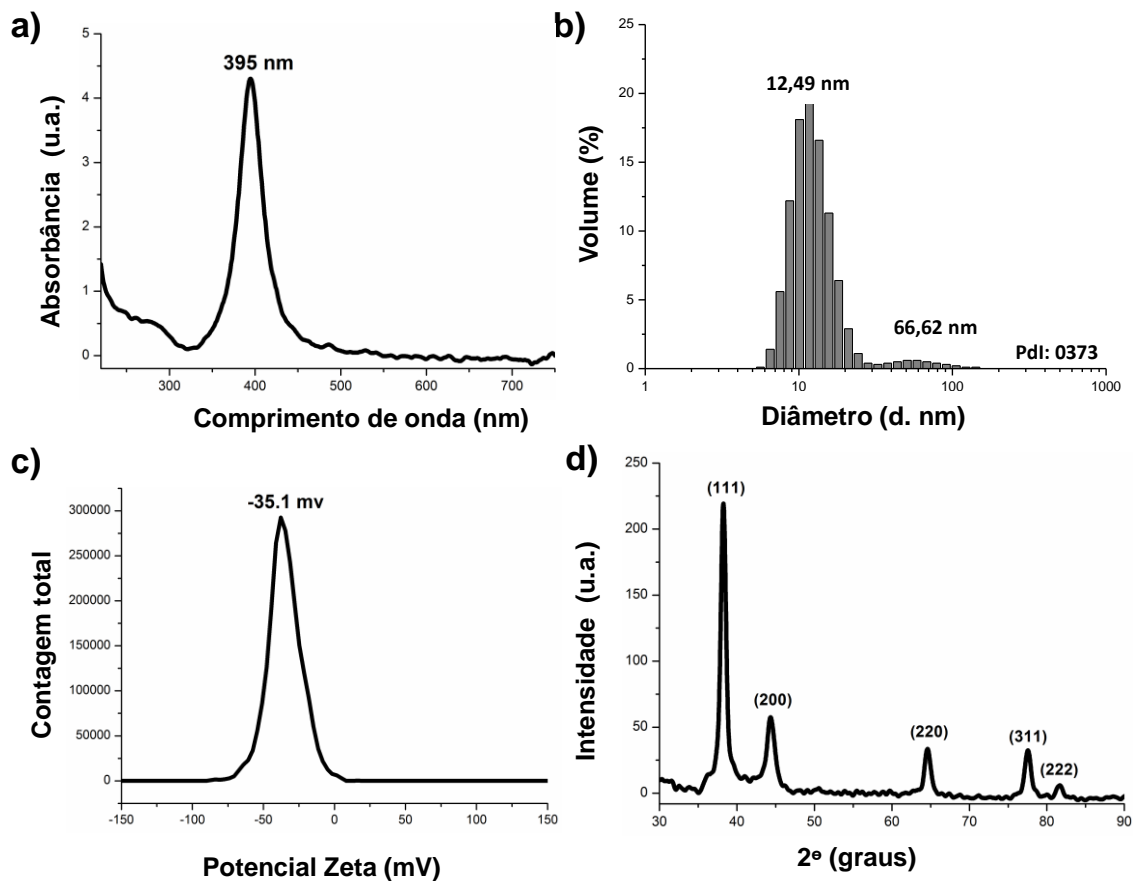
Nesta seção serão abordados os resultados associados a discussões do objetivo proposto. Inicialmente serão apresentadas a caracterização da síntese das AgNPs e recobrimento, bem como os ensaios em forma planctônica e biofilmes. Em forma planctônica são analisadas as concentrações inibitórias, concentrações bactericidas, cálculo do sinergismo, análise do potencial Zeta bacteriano. Em biofilmes são discutidos a adesão das cepas estudadas e análise da atividade metabólica pós-tratamento que são corroborados com micrografias.

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese de AgNPs revestidas com ácido alfa-lipóico utilizou o método químico *bottom-up*, no qual o  $\text{NaBH}_4$  reduziu o  $\text{AgNO}_3$  para formar a solução coloidal de prata de coloração amarela. A AgNPs resultante da síntese apresenta um máximo de absorção em 395 nm (Figura 11a) e uma distribuição bimodal de partículas com um Pdl de 0,373 sendo observado colóides com diâmetro de 12,49 nm e 66,62 nm (Figura 11b). A morfologia das NPs tem uma correlação direta com a absorção máxima ( $\lambda_{\text{Máx}}$ ) no espectro UV-Vísivel e a cor da solução coloidal. NPs esféricas com diâmetros de até 20 nm possuem a  $\lambda_{\text{Máx}}$  entre 350 e 400 nm e exibem tonalidades amarelas (VELGOSOVA *et al.*, 2022). Hajtuch e colaboradores mostram a síntese de AgNPs com aproximadamente 10 nm de diâmetro hidrodinâmico exibindo uma banda de ressonância plasmônica (SPR) centrada em aproximadamente 392 nm (HAJTUCH *et al.*, 2022). O 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 NPs (JESUS *et al.*, 2018). A estabilidade coloidal das AgNPs foi medida por meio da análise do Potencial Zeta, em que valores superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV indicam estabilidade química contra a agregação (ZAHARAN *et al.*, 2018). O valor de -35,1 mV para as AgNPs demonstram que o processo de síntese permitiu a produção de partículas coloidais estáveis para aplicações biológicas, como mostrado na Figura 11c. O difratograma (Figura 11d) apresenta

picos centrados em  $38,24^\circ$ ,  $44,34^\circ$ ,  $64,60^\circ$ ,  $77,56^\circ$  e  $81,68^\circ$  que são atribuídos a (111), (200), (220), (311) e (222) e caracterizam a difração nos planos cristalinos da prata e referem a uma estrutura cúbica de face centrada. A mesma formação de fase foi relatada por Salunke e co-autores (SALUNKE *et al.*, 2014) e Camargo e colaboradores (CAMARGO *et al.*, 2022) em que a análise DRX confirmou a natureza cristalina das AgNPs corroborando com o cartão 4-0783 do Centro Internacional de Dados de Difração (software High Score).

Figura 11: Caracterização da síntese das nanopartículas de prata. a) Espectro UV-visível, b) diâmetro hidrodinâmico, c) Potencial Zeta, d) DRX.



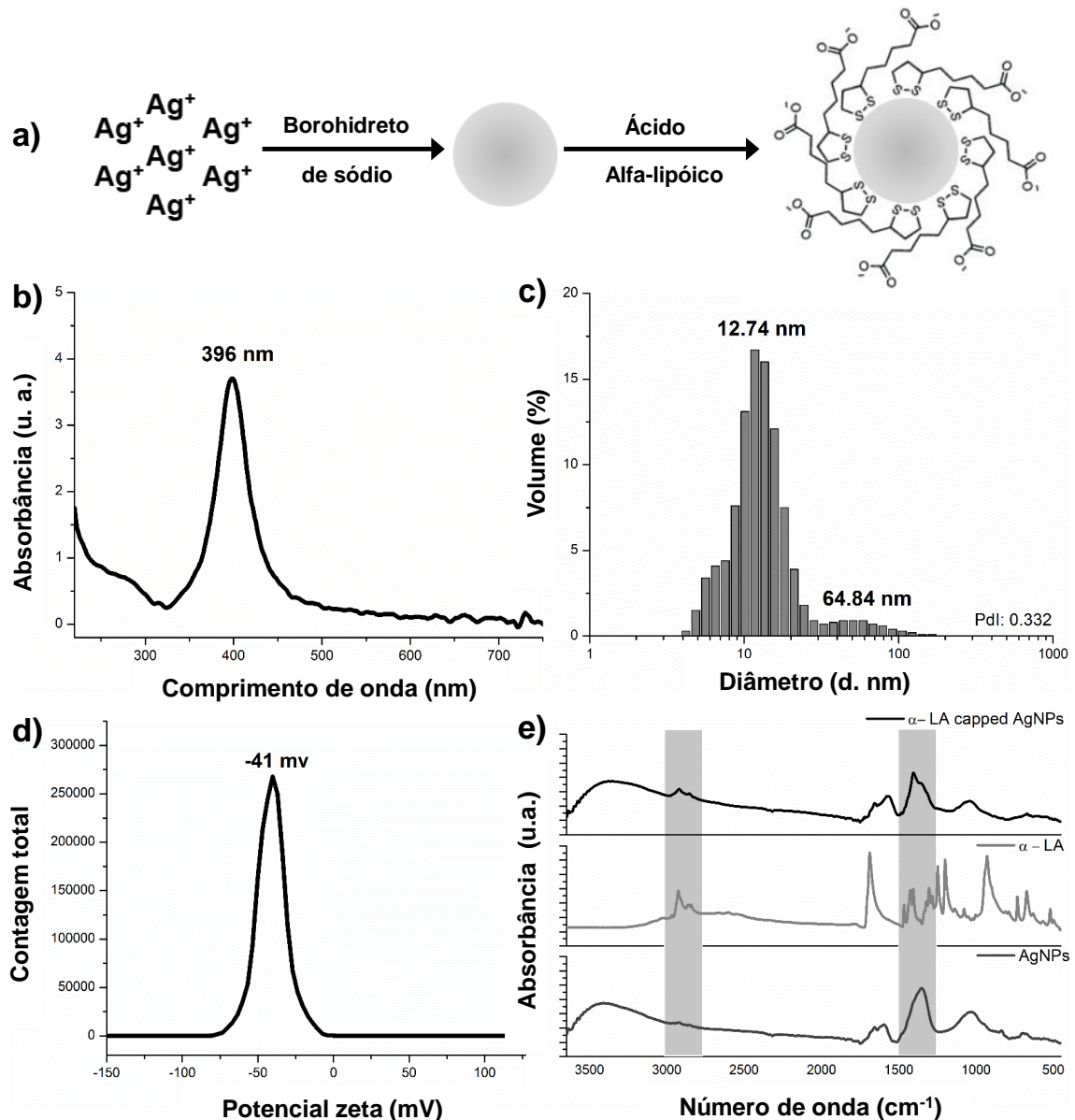
Fonte: A autora.

Na figura 12a mostra o processo de recobrimento das AgNPs com o ácido alfa-lipóico, em que o grupo dissulfeto presente no ácido sugere uma potencial interação com a superfície metálica das NPs (TEEPARUKSAPUN; RASONGCHAN; HAWONSUWAN, 2019). O ácido alfa-lipóico é sintetizado pelas mitocôndrias (DORSAM; FAHRER, 2016), levando à redução da citotoxicidade em células de

mamíferos (COTTON *et al.*, 2019), demonstrando biocompatibilidade envolvendo endotélio, plaquetas e hemácias (HAJTUCH *et al.*, 2022) e possivelmente contribuindo para a aplicabilidade do nanofármaco. Além disso, o recobrimento também confere estabilidade as AgNPs na qual existe uma série de biomacromoléculas que se ligam à superfície, induzindo a aglomeração e impedindo sua interação (GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2020; PANACEK *et al.*, 2018). Estudos também apontaram atividade antimicrobiana, levando ao efeito inibitório que ocorre através da indução da permeabilidade excessiva da membrana celular com alterações na concentração intracelular de adenosina trifosfato (ATP) e diminuição do pH citoplasmático (SHI *et al.*, 2016). AgNPs revestidas com materiais biocompatíveis foram recentemente estudadas *in vitro* e *in vivo* (WU *et al.*, 2020; ZHOU; *et al.*, 2021). *In vitro*, os resultados não apresentaram citotoxicidade, com valores de viabilidade celular superiores a 90% na linha celular L929 (ZHOU; *et al.*, 2021). *In vivo*, análises histológicas com cortes de vários órgãos dos camundongos não apresentaram alterações nos grupos tratados em relação ao grupo controle, e no ensaio de hemocompatibilidade foi apresentado um baixo índice de hemólise. Os estudos apontam potencialidade no bionanomaterial (WU *et al.*, 2020).

A Figura 12b apresenta o espectro UV-visível da solução coloidal das AgNPs recobertas com ácido-alfa lipóico, no qual se observa uma banda centrada em 396 nm. O  $\lambda_{M\acute{a}x}$  e a coloração das NPs não sofreram diferenças significativas quando comparadas a AgNPs sintetizadas, portanto, a partir dos resultados observados, é possível afirmar que as morfologias das AgNPs recobertas com o ácido-alfa lipóico se mantem esféricas. Complementando a análise do espectro Uv-Visível fatores como a diferença de intensidade, largura de banda e deslocamento  $\lambda_{Max}$  são fundamentais para enfatizar a presença do revestimento (GUZMÁN-SOTO *et al.*, 2020; TEEPARUKSAPUN; RASONGCHAN; HAWONSUWAN, 2019). As alterações exibidas no espectro UV-vis corroboram com os resultados obtidos no DLS, em que as NPs recobertas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 12,74 nm com distribuição de volume de 93,3% e um índice de polidispersão (Pdl) de 0,332 (Figura 12c), evidenciando um aumento de 0,25 nm corresponde a presença do ácido-alfa lipóico na área superficial das AgNPs. Além disso, As AgNPs recobertas apresentaram estabilidade na análise do potencial Zeta com valor de -41 mV (Figura 12d).

Figura 12: Caracterização das nanopartículas de prata recobertas com ácido-alfa lipóico. a) Esquema da síntese e recobrimento das nanopartículas de prata, b) Espectros de absorção UV-Vis, c) Diâmetro hidrodinâmico, d) Potencial Zeta, e) Espectros de FT-IR das nanopartículas de prata, ácido-alfa lipóico e nanopartículas de prata recobertas com ácido-alfa lipóico.



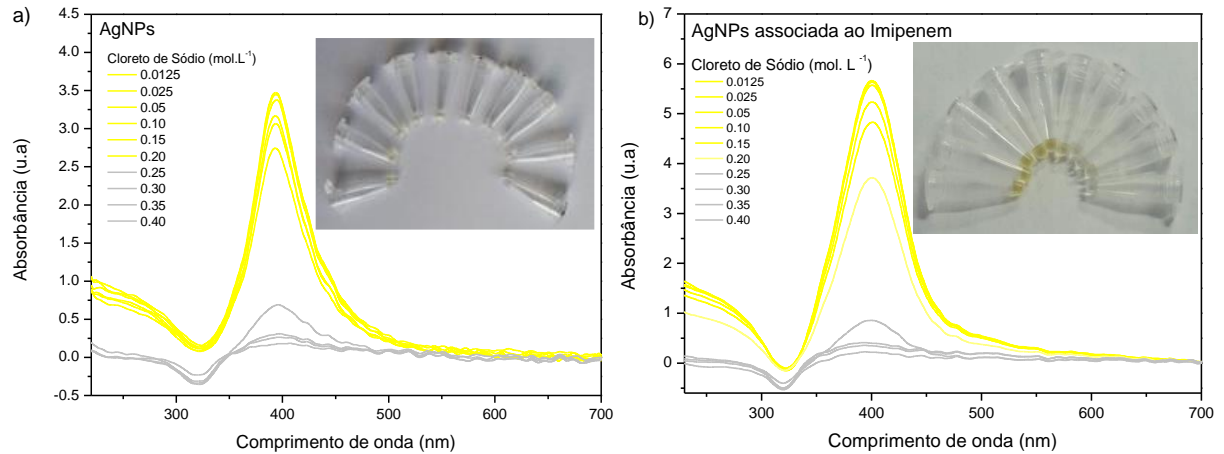
Fonte: A autora.

Os espectros de FT-IR (figura 12e) destacam as diferenças bioquímicas entre as AgNPs e as AgNPs recobertas com ácido alfa-lipóico, demonstrando frequências idênticas com deslocamentos sutis, mudanças conformacionais e um aumento de intensidade de banda. Comparando a região hachurada entre 3000 e 2800  $cm^{-1}$  observa-se um discreto aumento na intensidade das bandas das AgNPs recobertas em comparação com a mesma região das AgNPs sem recobrimento, onde um

discreto ombro é apresentado. Este aumento de intensidade pode ser atribuído às contribuições do estiramento ( $\nu$ ) assimétrico ( $\nu_{as}$ ) e simétrico ( $\nu_s$ ) de C-H do ácido-alfa lipóico em  $2926\text{ cm}^{-1}$ ,  $2864\text{ cm}^{-1}$  e  $2843\text{ cm}^{-1}$ . Contribuições do borohidreto adsorvido pós-síntese são observadas em  $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ , como o modo vibracional de deformação ( $\delta$ ) H-B-H, além dos modos vibracionais do ácido-alfa lipóico, como  $\delta$  CH<sub>2</sub> em tesoura em  $1465\text{ cm}^{-1}$ , curvatura no plano C-O-H em  $1425\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C-H em  $1304\text{ cm}^{-1}$  e  $\nu$  C-O/ $\delta$  O-H fora do plano em  $1248\text{ cm}^{-1}$ . A banda na região hachurada das AgNPs recobertas localizados em  $1404\text{ cm}^{-1}$  atribuídos a  $\nu$  C-C, associados às mudanças nas regiões de  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , evidenciam o recobrimento com ácido-alfa lipóico (DOLININA; AKIMSHEVA; PARFENYUK, 2020; JENSEN, 2003; LE *et al.*, 2019; STUART, 2005). Estes resultados corroboram com o espectro do reagente ácido-alfa lipóico e análises de espectroscopia UV-vis e DLS.

A estabilidade das AgNPs e das AgNPs recobertas e associadas ao IMP foram analisadas por meio de uma curva de aglomeração utilizando uma solução de cloreto de sódio. Na Figura 13 é apresentada a curva de estabilidade das AgNPs produzidas, na qual correlaciona com os valores de absorbância da banda centradas em função da concentração da solução salina (NaCl), representando a estabilidade química das NPs para aplicação biológica. Em baixas concentrações do agente aglomerante, as partículas não desestabilizaram, caracterizando uma intensa banda de absorção na região de 395 nm para as AgNPs sintetizadas por redução de borohidreto, como observados nos espectros pela coloração amarela (Figura 13a). Entretanto, os espectros de cor cinza indicam que as soluções coloidais aglomeraram com adição do sal em maiores concentrações, uma vez que foi observado um decréscimo acentuado de intensidade na banda de ressonância plasmônica, o que indica aumento diâmetro das partículas. As NPs recobertas com o ácido alfa-lipóico e associadas ao antibiótico IMP mostram uma estabilidade química semelhante as NPs puramente sintetizadas (Figura 13b). A desestabilização ocorreu ao adicionar uma solução salina superior à de 0,3M caracterizando uma boa estabilidade para aplicações biológicas.

Figura 13: Teste de estabilidade química das nanopartículas. a) nanopartículas de prata sintetizada com o borohidreto de sódio como agentes redutor/ligante, b) nanopartículas de prata recobertas e associadas ao Imipenem.



Fonte: A autora.

#### 4.2 EFICIÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA RECOBERTAS ASSOCIADA AO IMPENEM EM CEPAS DE *K. pneumoniae*

A eficácia de um agente antimicrobiano em células planctônicas depende dos resultados dos ensaios da CIM e CBM. A tabela 4 apresenta os resultados das CIMs e CBMs das AgNPs, IMP e associação das AgNPs e IMP em quatro cepas de *K. pneumoniae* com os perfis de susceptibilidade: sensível (ATCC e Kp-S), intermediário (Kp-I) e resistente (Kp-R) ao IMP. A CIM das AgNPs nos diferentes perfis foi de  $4 \times 10^{11}$  partículas/mL, e a do IMP realizada nas mesmas condições experimentais confirmou o resultado da automação (Tabela 1) de acordo com os pontos de corte para interpretação da CIM de Enterobactérias ao carbapenêmico IMP do BrCAST/EUCAST (Tabela 2) (BRCAST; EUCAST, 2022). A partir dos resultados dos ensaios individuais das AgNPs e IMP delineou-se concentrações para a associação buscando a redução da concentrações inibitórias/bactericidas e análise da fração inibitória.

Tabela 2: Ponto de corte de Enterobactérias\* ao carbapenêmico IMP. \*Enterobactérias incluindo *K. pneumoniae*.

Antimicrobiano	Critério Interpretativo para CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
IMP	2	4	> 4

Fonte: BrCAST; EUCAST, 2022.

A inibição da associação para as cepas ATCC 700603, Kp-S e Kp-I foi de 0,015 µg/mL de IMP, enquanto para a cepa resistente (Kp-R), a inibição foi obtida com apenas 0,5 µg/mL de IMP, todas as concentrações do IMP foram associadas a uma concentração fixa de  $2 \times 10^{11}$  partículas/mL das AgNPs. A redução na concentração do IMP associada as NPs foi encontrada em todas as cepas estudadas. Em AgNPs os resultados semelhantes de CIM e CBM também foram encontrados por Parvekar e colaboradores (PARVEKAR *et al.*, 2020) ao estudá-las mesmo em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*.

A CIM da associação reduziu concentrações do IMP em 16 a 256 vezes (Tabela 3). As cepas sensíveis apresentaram uma redução de 32 vezes na concentração do IMP, enquanto a cepa intermediária apresentou uma redução de 256 vezes. Este fato pode estar relacionado à classificação de susceptibilidade intermediária que inclui uma zona tampão especialmente para drogas com margens estreitas de farmacotoxicidade (CLSI, 2022). A cepa com perfil resistente apresentou redução de 16 vezes quando utilizada a associação entre AgNPs e IMP, considerando que o perfil desta cepa não favorece a inibição com doses terapêuticas, a redução é significativa.

Vários estudos propõem a combinação de antibióticos com AgNPs, incluindo o trabalho de Li e colaboradores (LI; *et al.*, 2005) que utilizaram AgNPs combinadas com Amoxicilina contra *Escherichia coli*. Deng e co-autores (DENG *et al.*, 2016) analisaram várias classes de antibióticos associados a AgNPs contra *Salmonella typhimurium* multirresistente (MDR) e Wan e investigadores (WAN *et al.*, 2016) combinaram AgNPs com Polimixina B, Rifampicina e Tigeciclina contra *Acinetobacter baumannii* MDR.

Tabela 3: Resultado dos ensaios da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima das nanopartículas de prata, Imipenem e sua associação em diferentes perfis de *K. pneumoniae* com ensaios realizados em triplicata. AgNPs (nanopartículas de prata):  $\times 10^{11}$  partículas/mL, Imipenem (IMP):  $\mu\text{g/mL}$  e AgNPs+IMP:  $2 \times 10^{11}$  partículas/mL + concentração do IMP em  $\mu\text{g/mL}$ .

Cepas	CIM			Fold Change	FICI	CBM			Fold Change	FBCI
	AgNPs	IMP	AgNPs+IMP			AgNPs	IMP	AgNPs+IMP		
ATCC	4	0.5	0.015	32	0.5	4	0.5	0.015	32	0.5
Kp-S	4	0.5	0.015	32	0.5	4	0.5	0.015	32	0.5
Kp-I	4	4.0	0.015	256	0.5	4	4.0	0.015	256	0.5
Kp-R	4	8.0	0.500	16	0.5	4	16.0	0.500	32	0.5

Fonte: A autora.

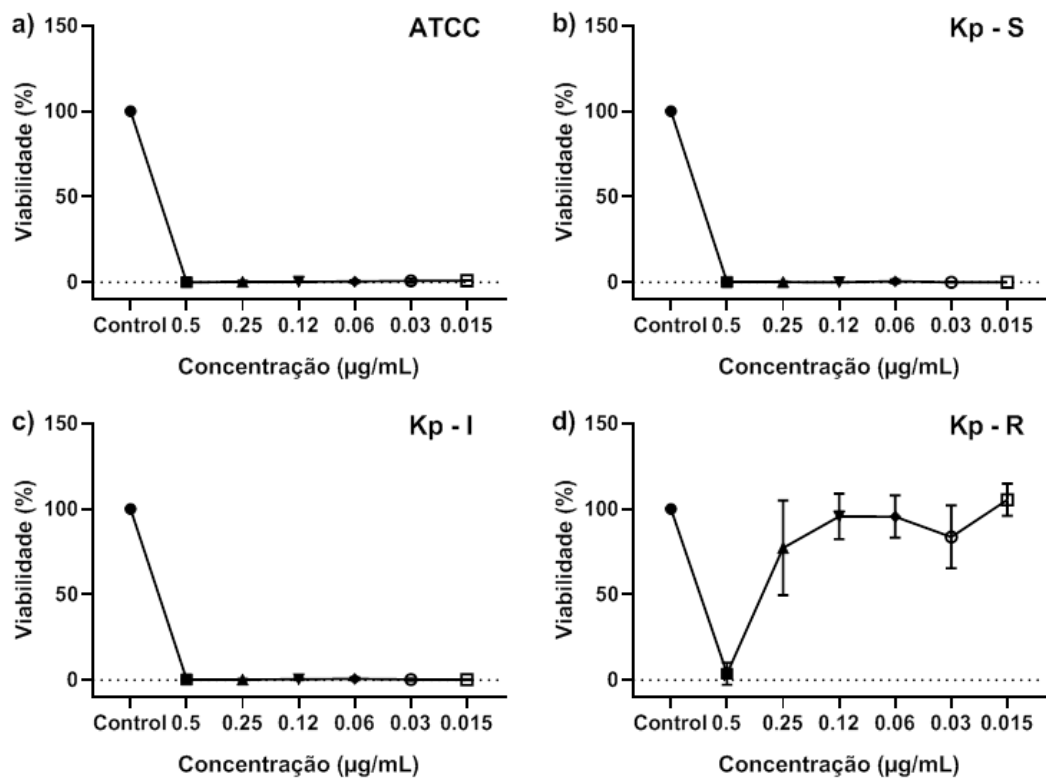
Lopes-Carrizales e co-autores (LOPEZ-CARRIZALES *et al.*, 2018) estudaram os efeitos das AgNPs associadas com Amicacina e Ampicilina em bactérias uropatogênicas Gram-positivas e Gram-negativas resistentes. Em bactérias Gram-negativas, o estudo mostrou reduções de 2 a 32 vezes na concentração da Amicacina e reduções de 4 a 32 vezes na Ampicilina. Malawong e pesquisadores (MALAWONG *et al.*, 2021) estudaram três isolados clínicos de *Burkholderia pseudomallei*, uma bactéria Gram-negativa que foi submetida a uma associação das AgNPs a diferentes antibióticos, incluindo Ceftazidima, IMP, Meropenem e Gentamicina. As associações entre as drogas mostraram redução dos antimicrobianos de 2 a 16 vezes e combinações sinérgicas.

A análise do sinergismo foi definida por meio da determinação do FICI e do FBCI em que o índice  $\leq 0,5$  é considerado sinérgico,  $0,5 \leq \text{FICI}$  ou  $\text{FBCI} < 1$  é interpretado como parcialmente sinérgico, aditivo sendo igual a 1, indiferente variando entre  $2 \leq \text{FICI}$  ou  $\text{FBCI} < 4$  e antagonismo foi definido como um índice  $> 4$  (LOPEZ-CARRIZALES *et al.*, 2018; MALAWONG *et al.*, 2021). Interações sinérgicas entre AgNPs associadas ao IMP foram encontradas em todos os perfis estudados com valores do FICI e FBCI  $\leq 0,5$  (Tabela 3).

Um ensaio de CIM é geralmente associado a investigações laboratoriais de perfis de susceptibilidade a antibióticos contra microrganismos. No entanto, as características das NPs, particularmente a opacidade e a insolubilidade no meio de cultura podem dificultar o ensaio da CIM e a aplicação em laboratórios clínicos que

dependem da observação visual da turbidez (CHAKANSIN *et al.*, 2022). Neste contexto, por se tratar de um método simples e de alto rendimento, foi utilizado o ensaio de resazurina para quantificar o desempenho do nanomaterial associado ao antibiótico permitindo a confirmação da determinação da CIM. A Figura 14 apresenta a porcentagem de viabilidade das células planctônicas submetidas à ação das AgNPs associadas ao IMP. As bactérias metabolicamente ativas convertem o corante redox resazurina fracamente fluorescente em produto fluorescente a resorufina (CHEN, Jian Lin; STEELE; STUCKEY, 2018). As cepas com perfil sensível e intermediário não apresentaram crescimento em nenhuma concentração da associação testada. Em contraste, a cepa com perfil resistente apresentou inibição do crescimento apenas na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  combinada com NPs, comprovando a redução da atividade metabólica bacteriana e correlacionando com os resultados do teste tradicional da CIM.

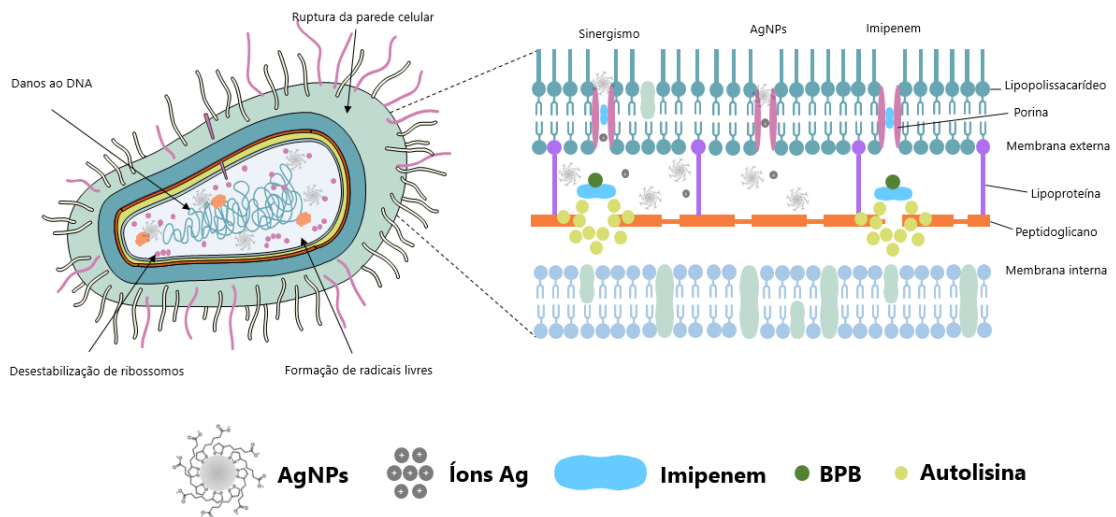
Figura 14: Atividade metabólica do ensaio de resazurina em células planctônicas de *K. pneumoniae*. (a) ATCC; (b) Kp-S; (c) Kp-I; e (d) Kp-R. Os dados são expressos como média  $\pm$  Desvio-Padrão (DP) de triplicatas.



Fonte: A autora.

AgNPs e IMP são agentes bactericidas e apresentam diferentes mecanismos de ação. No estudo a concentração encontrada de cada agente na associação não foi suficiente para conduzir o efeito bacteriostático ou bactericida individualmente. Porém na associação os resultados encontrados nos ensaios de CIM, CBM e resazurina demonstram o efeito sinérgico comprovado por FICI e FBCI entre as NPs e o antibiótico. Assim, o mecanismo de ação e o efeito sinérgico das AgNPs e IMP em bactérias são apresentados esquematicamente na Figura 15.

Figura 15: Representação esquemática descrevendo a interação e ação antimicrobiana das AgNPs, IMP e associação dos agentes sobre a bactéria Gram-negativa.



Fonte: A autora.

O efeito das AgNPs nas bactérias pode ser explicado inicialmente pela adesão à superfície da parede celular bacteriana, penetração na célula e rompimento de organelas e biomoléculas intracelulares. A síntese de proteínas é alterada, desestabilizando a composição da membrana celular externa com a indução da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando toxicidade celular, estresse oxidativo, formação de radicais livres e danos às mitocôndrias e ao DNA. Este efeito antimicrobiano também é potencializado com íons  $Ag^+$ . Íons e NPs menores que 2 nm penetram nas células através dos canais de porinas na membrana externa de bactérias Gram-negativas ligando-se a proteínas e ácidos nucleicos, causando uma confluência de mudanças estruturais bacterianas (DAKAL *et al.*,

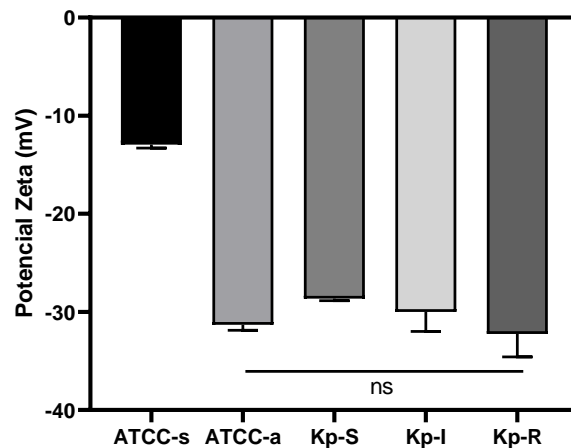
2016; FRANCI *et al.*, 2015; MIKHAILOVA, 2020). Em contraste, o IMP possui um anel beta-lactâmico em sua estrutura que lhes confere a capacidade de se ligar e inativar transpeptidases relevantes, conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBPs), responsáveis pelo alongamento e reticulação do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Em resposta à inativação das PBPs, as autolisinas são ativadas, interferindo na formação da parede celular. Os carbapenêmicos, como o IMP, podem se ligar a um PBP específico (PBP-1), resultando em lise mais rápida do que outros beta-lactâmicos e maior atividade bactericida (HELLINGER; BREWER, 1991; PAPICH, 2016; RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006). A associação destes eventos leva à morte celular independente do perfil de susceptibilidade do microrganismo.

A carga da superfície bacteriana tem sido uma área explorada no desenvolvimento de novos antimicrobianos, considerando a questão da resistência bacteriana. A parede celular se comporta como um compartimento químico, auxiliando na homeostase celular, desempenhando assim um papel significativo na manutenção de diversas funções fisiológicas. A parede celular tanto das bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, possuem grupos funcionais ácidos e básicos. Em bactérias Gram-negativas estes grupos estão associados aos lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídios. A presença de tais grupos funcionais influenciam no comportamento eletrostático das células, regulando assim a adesão bacteriana e contribuindo para a interação com vários agentes antimicrobianos (HALDER *et al.*, 2015).

A Figura 16 mostra a análise do potencial Zeta nas cepas ATCC e clínicas. Um estudo comparativo do potencial Zeta na cepa ATCC 700603 ressuspensa em solução salina 0,9% (ATCC-s) e água ultrapura (ATCC-a) a fim de determinar se há alguma influência do meio. Assim, observou-se que a cepa padrão de *K. pneumoniae* apresentou uma carga negativa nos dois diluentes, entretanto os valores do potencial Zeta para as células em solução salina 0,9% ( $-12,95 \pm 0,35$ ) foram menores em comparação aos valores obtidos em água ultrapura ( $-31,30 \pm 0,57$ ). Estes dados corroboram com os resultados encontrados por Al-Farsi e pesquisadores (2019), em que cepas de *K. pneumoniae* foram analisadas em água deionizada e PBS, demonstrando que o PBS suprime a carga da superfície das bactérias (AL-FARSI *et al.*, 2019). Baseado neste fato, nas cepas clínicas foram realizadas as análises do potencial utilizando água ultra-pura devido a provável

supressão da carga por solução salina. O resultado do potencial Zeta para as cepa clínica Kp-S foi de  $-28,65 \pm 0,21$  mV, enquanto para as cepas Kp-I e Kp-R foram de  $-30,00 \pm 1,98$  mV e  $-32,25 \pm 2,33$  mV, respectivamente. Embora a diluição em água ultrapura apresenta um discreto aumento de carga, a análise multivariada não apresentou significância estatística entre as cepas ( $p < 0,05$ ). A análise da despolarização ou hiperpolarização da membrana com base nos valores do potencial Zeta, auxilia na investigação do efeito da permeabilização do antimicrobiano fornecendo bases para interações droga-membrana (FERREYRA MAILLARD *et al.*, 2021; HALDER *et al.*, 2015).

Figura 16: Estudo comparativo do potencial Zeta em cepa ATCC e análises de cepas clínicas em água-ultrapura. Ensaio realizado em triplicata.



Fonte: A autora.

Além de interagir com a superfície bacteriana, a associação dos antimicrobianos pode alterar a carga bacteriana. Deste modo o potencial Zeta dos princípios ativos e de sua associação foram investigados e são apresentados na Tabela 4. A AgNPs associada ao Impenem, evidência que a carga relacionada as NPs propicia o aumento do valor do potencial Zeta quando comparado somente ao IMP, sugerindo um influxo de ânions na célula bacteriana. Este fato promove alterações bacterianas intracelulares que está associada ao efluxo intracelular de cátions (CHEN *et al.*, 2021). A contribuição aniônica das AgNPs na associação pode promover a interação com as membranas celulares facilitando a permeabilidade dos antibióticos (BHAUMIK *et al.*, 2022). Ong e colaboradores (2019), relataram que as

alterações no potencial Zeta das bactérias devido à ligação de NPs afetam a permeabilidade da superfície celular. Uma mudança no potencial Zeta modula a fisiologia celular bacteriana, levando assim à morte celular e/ou inibição do crescimento (ONG *et al.*, 2019).

Tabela 4: Estudo do potencial Zeta dos antimicrobianos IMP e AgNPs e suas associações.

Amostra	Concentração	Potencial Zeta (mV)
IMP	0,5 µg/mL	-12,4
AgNPs+IMP	2x10 <sup>11</sup> part./mL + 0,5 µg/mL	-37,6

Fonte: A autora.

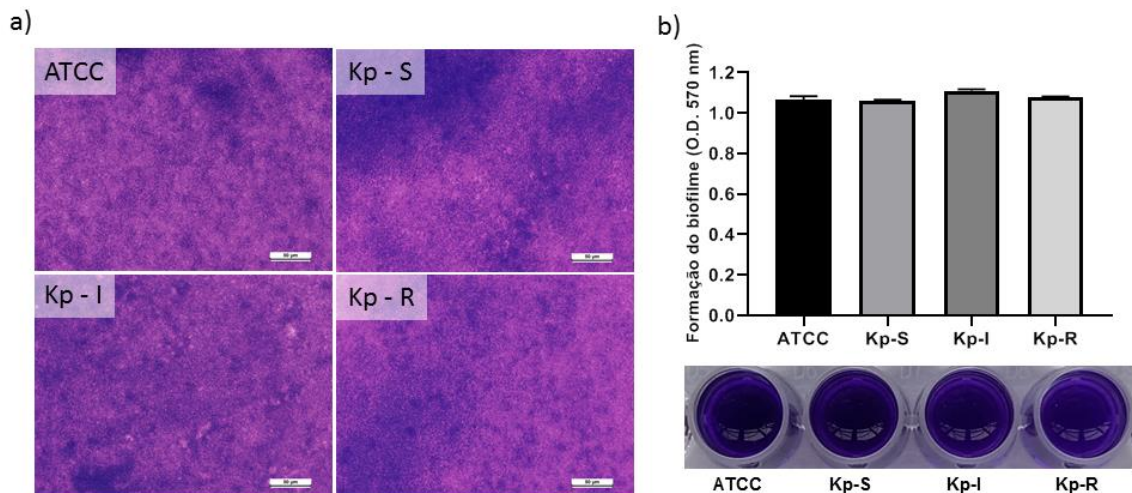
#### 4.3 EFEITO ANTIMICROBIANO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ASSOCIADO AO IMPENEM EM BIOFILMES DE *K. pneumoniae*

A importância dos estudos *in vitro* de biofilmes permite a investigação de fenótipos bacterianos não interpretados em um sistema *in vivo*, incluindo os mecanismos de adesão, inibição e resistência à erradicação que são relevantes no contexto de doenças infecciosas (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). O estudo da adesão e atividade metabólica dos biofilmes tratados das cepas ATCC e isolados clínicos com diferentes perfis de susceptibilidade *K. pneumoniae* podem ser promissores para ampliar a significância da associação dos antimicrobianos com materiais nanoparticulados.

O ensaio do cristal violeta foi realizado para classificar os biofilmes formados por *K. pneumoniae* (Figura 17). A densidade óptica (OD) define a capacidade de aderência do biofilme, entretanto o valor de corte (OD<sub>c</sub>) deve ser estabelecido a partir da média aritmética da absorvância dos controles negativos com adição de três vezes o desvio padrão (SD). Sendo os biofilmes formados classificados como: não produção de biofilme (OD ≤ OD<sub>c</sub>), produção de biofilme fraca (OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2OD<sub>c</sub>), produção de biofilme moderada (2OD<sub>c</sub> < OD ≤ 4OD<sub>c</sub>) e produção de biofilme forte (4OD<sub>c</sub> < OD) (STEPANOVIC *et al.*, 2007). A cepa ATCC apresentou um biofilme com adesão moderada com valores de 1,07 ± 0,02 u.a. após 48 h de incubação (Figura 17b). Ao analisar as cepas clínicas com diversos perfis de susceptibilidade, observou-se adesão moderada independente do perfil, com valores de 1,08 ± 0,01

para Kp-S,  $1,11 \pm 0,01$  para Kp-I e  $1,06 \pm 0,01$  para Kp-R (Figura 17b). As micrografias forneceram evidências que corroboraram com a semelhança de adesão na formação do biofilme (Figura 17a). A adesão moderada pode ser interpretada como produção positiva de biofilme conforme análise proposta por Stepanovic *et al.* (STEPANOVIC *et al.*, 2007). A quantificação da biomassa do biofilme em *K. pneumoniae* é apresentada no estudo de Oleksy-Wawrzyniak e co-autores (OLEKSY-WAWRZYNIAK *et al.*, 2022), onde analisaram a aderência de 118 isolados clínicos em placas de poliestireno através do ensaio do cristal violeta e 51% dos isolados apresentaram biofilmes com aderência moderada. Este estudo também demonstrou a adesão de *K. pneumoniae* ATCC 700603 com o valor obtido de OD de  $1,00 \text{ unidade} \pm 0,35$ , corroborando com os resultados apresentados na Figura 17b.

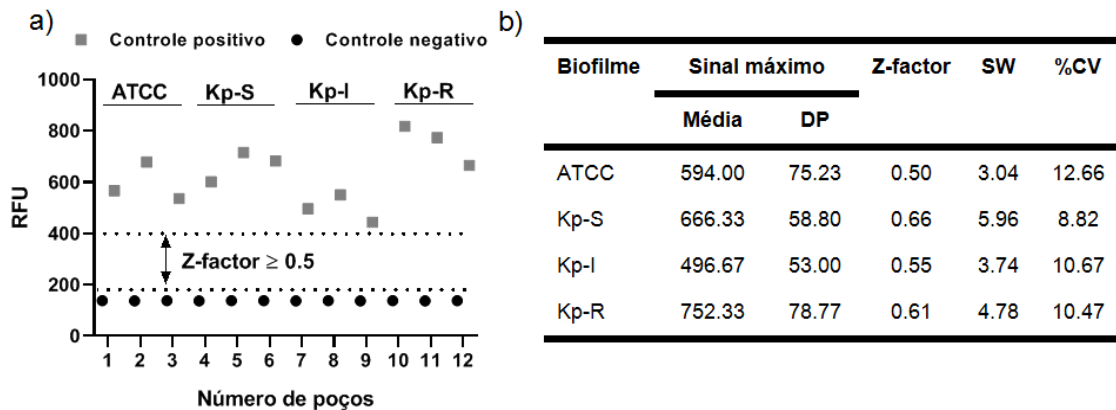
Figura 17: Formação dos biofilmes de *K. pneumoniae*. a) Micrografias dos biofilmes formados em placas de poliestireno e corado com cristal violeta. As barras da escala representam  $50 \mu\text{m}$  e a ampliação é  $\times 200$ ; b) Gráfico da leitura da densidade óptica (OD570) expressa em média  $\pm$  DP dos biofilmes em triplicata com a associação da fotografia dos respectivos poços antes da leitura da OD.



Fonte: A autora.

Os resultados da formação do biofilme pelo ensaio de resazurina atenderam aos critérios estabelecidos pelo teste Z-factor (Figura 18). Os biofilmes de *K. pneumoniae* indicam um ensaio de alta qualidade exibindo uma boa separação entre controle positivo e negativo e uma aceitável variabilidade de dados (Figura 18a). Os valores obtidos demonstram dados adequados para bioensaio (Figura 18b), onde o Z-factor é  $\geq 0,5$ , o *signal window*  $> 2$  e  $\%CV < 20\%$ . Assim é essencial precisão e sensibilidade no ensaio, considerando a variabilidade das medidas (ZHANG; OLDENBURG, 2009).

Figura 18: Indicador da qualidade do ensaio de formação dos biofilmes de *K. pneumoniae*. a) Gráfico de distribuição dos controles positivos e negativos dos biofilmes em triplicata e apresentação do Z-factor; b) Média e DP em RFU dos controles positivos dos biofilmes, com a determinação do Z-factor, signal window (SW) e porcentagem do coeficiente de variação (%CV).



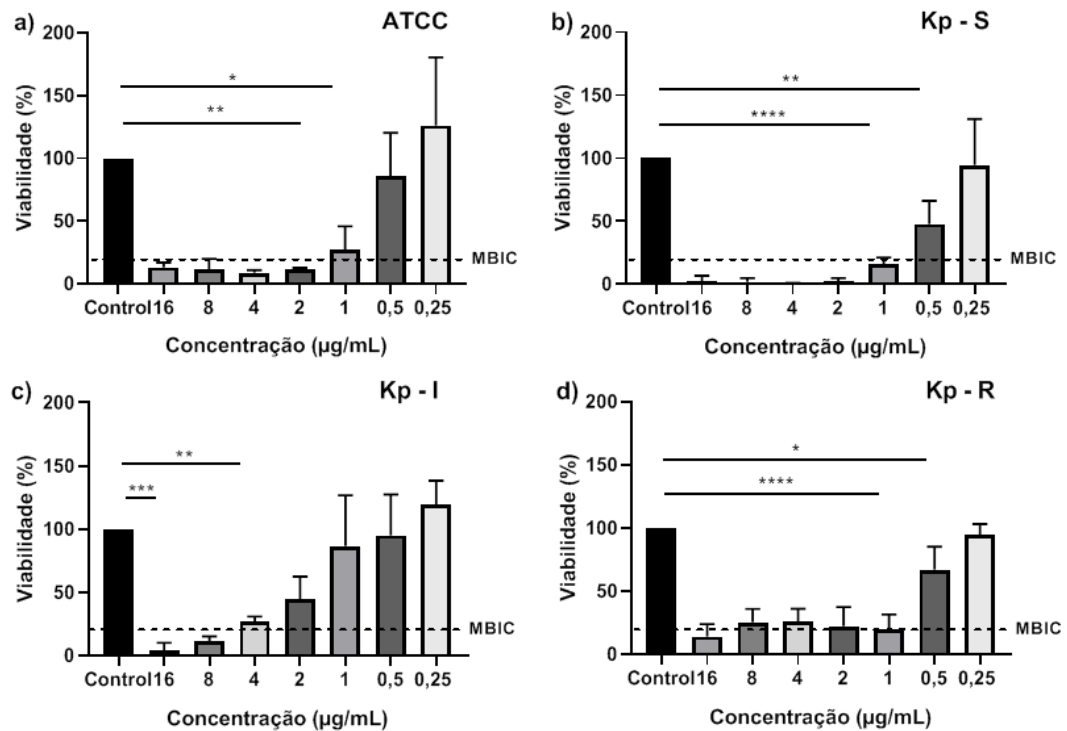
Fonte: A autora.

Os impactos da associação das AgNPs ( $2 \times 10^{11}$  partículas/mL) e IMP (16  $\mu\text{g/mL}$  a 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ) na inibição dos biofilmes formados são demonstrados através do ensaio de resazurina (Figura 19). A porcentagem de viabilidade do biofilme foi determinada, seguida da análise do teste de normalidade e lognormalidade dos dados com aprovação no teste de Shapiro-Wilk (alfa = 0,05), distribuição regular nos gráficos quantil-quantil (QQ plot) e determinando o teste de variância ANOVA one-way. Na Figura 19 são encontradas diferenças significativas entre as concentrações testadas nos diferentes perfis de susceptibilidade. Na concentração de 0,25  $\mu\text{g/mL}$  das AgNPs associadas ao antibiótico, houve aumento na atividade metabólica das bactérias presentes no biofilme em relação ao grupo controle, principalmente nos grupos sensíveis (ATCC e Kp-S) e intermediário (Kp-I). Concentrações sub-inibitórias de antibióticos têm sido relatadas como aumento em sua atividade metabólica. Existem evidências crescentes de que as bactérias respondem especificamente e defensivamente a tais concentrações. Em particular, bactérias Gram-negativas podem responder com inúmeras estratégias para combater antibióticos e mais recentemente a AgNPs (LINARES *et al.*, 2006; PANACEK *et al.*, 2018; PENESYAN *et al.*, 2019).

A redução da atividade metabólica foi constatada com o aumento da concentração do IMP associado as AgNPs nos diferentes biofilmes. O biofilme da cepa clínica sensível (Kp-S) apresentou atividade metabólica < 2% para concentrações de 2 µg/mL a 16 µg/mL. A cepa com perfil resistente (Kp-R) apresentou atividade metabólica de 25,4% quando utilizada apenas a CIM do antibiótico a 8 µg/mL.

A MBIC é definida como a concentração que inibe ≥ 80% da atividade metabólica do biofilme tratado em comparação com o controle positivo (CANABARRO *et al.*, 2022). Assim, pode-se definir que a MBIC para a cepa ATCC foi de 2 µg/mL e Kp-S em 1 µg/mL. No entanto, para Kp-I, concentrações crescentes de IMP associadas a AgNPs mostraram um aspecto dose-dependente de inibição do crescimento, com a MBIC definido como 8 µg/mL para inibir pelo menos 80% da atividade metabólica. Ao analisar o biofilme com perfil resistente (Kp-R) quanto ao efeito inibitório gerado pela associação, observou-se uma redução sutil da atividade metabólica entre 1 µg/mL a 16 µg/mL demonstrando o fenômeno de células persistentes em biofilmes (FRANCI *et al.*, 2015; GURUNATHAN *et al.*, 2014).

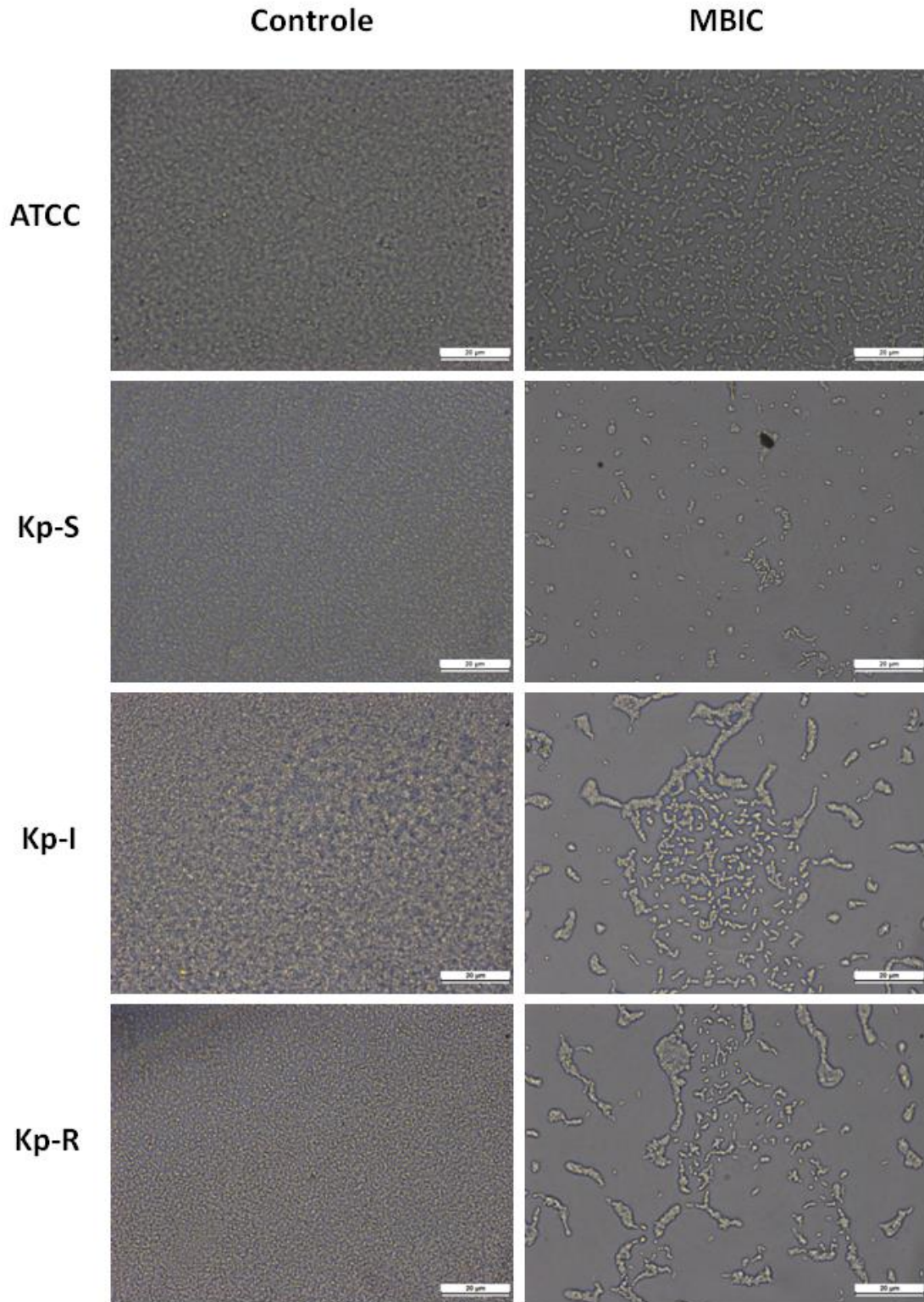
Figura 19: Determinação da atividade metabólica dos biofilmes pelo ensaio de resazurina após administração das nanopartículas de prata associadas ao Imipenem. (a) ATCC; (b) Kp-S; (c) Kp-I; e (d) Kp-R. Os dados são expressos como média ± DP de triplicata. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



Fonte: A autora.

Em busca da compreensão acerca do tratamento dos biofilmes e resultado da análise da atividade metabólica foram realizadas micrografias em campo claro nos grupos controles e nas concentrações inibitórias após a exposição de 24 horas das AgNPs associada ao IMP (Figura 20). A partir da análise visual observa-se uma morfologia densa nos grupos controles dos biofilmes corroborando com as micrografias do ensaio de cristal violeta e demonstrando a adesão em placas de poliestireno. Os grupos com a MBIC foram capazes de inibir os biofilmes quando comparado ao grupo controle com reduções significativas da biomassa e consequente redução de atividade metabólica, corroborando com os dados determinados pelo o ensaio de resazurina.

Figura 20: Micrografia das concentrações inibitórias dos biofilmes comparado ao grupo controle.



Fonte: A autora.

Em geral, este estudo demonstrou que a associação das AgNPs e IMP apresentam um efeito sinérgico em células planctônicas. A associação reduziu a concentração do IMP nos testes de CIM, que é um ensaio que orienta a escolha adequada do antibiótico para administração nos pacientes. Uma dose mais baixa de IMP associada a AgNPs pode reduzir os efeitos colaterais neurotóxicos e nefrotóxicos da droga. Além disso, observou-se que a associação exibiu um efeito inibitório sobre biofilmes com concentrações terapêuticas.

## 5 CONCLUSÃO

A associação das AgNPs e IMP se apresenta como uma terapia combinada promissora para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*, incluindo cepas resistentes ao antibiótico. As AgNPs sintetizadas por redução química apresentaram um bom índice de polidispersão e uma distribuição bimodal no diâmetro hidrodinâmico antes e após o recobrimento com ácido alfa-lipóico com diâmetros de aproximadamente 12 nm. O recobrimento foi confirmado por meio da caracterização e comprovado a efetividade da conjugação.

Na aplicação das AgNPs recobertas houve estabilidade e biocompatibilidade da solução coloidal, tanto em forma planctônica quanto biofilme. Nos ensaios de CIM e CBM a associação das AgNPs recobertas ao antibiótico carbapenêmico IMP apresentaram um efeito sinérgico com reduções significativas do antibiótico, enquanto a análise do potencial Zeta da associação entre as AgNPs e o IMP indicaram uma contribuição para o efeito antimicrobiano.

Em biofilmes a adesão moderada e concentrações inibitórias foram encontradas no ensaio de atividade metabólica e confirmadas por micrografias. A ação do IMP não foi inibida quando associadas a NPs em cepa clínica resistente (Kp-R), característica observada pela resposta bacteriana ao aumento da concentração do antibiótico em detrimento a concentração fixa das AgNPs. Desta forma, o presente estudo demonstra que os resultados *in vitro* da associação entre as AgNPs e o antibiótico carbapenêmico IMP apresentam uma boa efetividade contra cepas de *K. pneumoniae* com diferentes perfis de susceptibilidade tornando-se uma nova alternativa contra o problema de saúde mundial que são as bactérias resistentes.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, Jaime Antonio; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha. Utilização de Testes Fenotípicos Para a Pesquisa de Carbapenamases Em Enterobactérias: Uma Ferramenta Para Orientação Clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017.
- AFONSO, Lucas Silva Rocha; MILER-DA-SILVA, Leonardo Linhares; GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. Estratégias terapêuticas para infecções por klebsiella pneumoniae carbapeném resistente: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e46211730296-e46211730296, 2022..
- AHAMED, Maqsood; ALSALHI, Mohamad S.; SIDDIQUI, M. K.J. Silver Nanoparticle Applications and Human Health. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1841–1848, 2010.
- AL-FARSI, Hissa M. *et al.* Effects of the Antimicrobial Peptide LL-37 and Innate Effector Mechanisms in Colistin-Resistant Klebsiella Pneumoniae With MgrB Insertions. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2632, 2019.
- ALI, Sabeeha *et al.* Potential Therapeutic Targets of Klebsiella Pneumoniae : A Multi-Omics Review Perspective. **Briefings in Functional Genomics**, v. 21, n. 2, p. 63–77, Apr. 2022.
- ASHURST ; DAWSON, A. **Klebsiella Pneumonia**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- AURILIO, Caterina *et al.* Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 1–8, 2022.
- BARON, S. **Medical Microbiology**. 4<sup>th</sup> ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- BAYDA, Samer *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.
- BENGOECHEA, J. A.; PESSOA, J. Klebsiella Pneumoniae Infection Biology: Living to Counteract Host Defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 2019.
- BENTLEY, R.; BENNETT, J. W. What Is an Antibiotic? Revisited. **Advances in applied microbiology**, v. 52, p. 303-332, 2003.
- BHAUMIK, Kaushik Nath *et al.* Rationally Designed Foldameric Adjuvants Enhance Antibiotic Efficacy: Via Promoting Membrane Hyperpolarization. **Molecular Systems Design and Engineering**, v. 7, n. 1, p. 21–33, 2022.
- BI, Yufang *et al.* Therapeutic Strategies against Bacterial Biofilms. **Fundamental Research**, v. 1, n. 2, p. 193–212, 2021.

BLAIR, Jessica M.A. *et al.* Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

BRCAST; EUCAST. **Tabela Pontos de Corte Clínicos BrCAST**. Disponível em: <https://brcast.org.br/documentos/documentos-3/>. Acesso em: dez. 2022.

CALHOUN, C.; WEMUTH, H. R.; HALL, G. A. **Antibiotics**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

CAMARGO, Larissa de O. *et al.* Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Functionalized with Amikacin Applied against Multidrug-Resistant *Acinetobacter Baumannii*. **American Journal of Infection Control**, 26 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.12.009>

CANABARRO, Micaela do Canto *et al.* Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus* and *Bacillus* Species Isolated from Human Allogeneic Skin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 153–160, 2022.

CARROLL, K.C.; BUTEL, J.; MORSE, S. **Jawetz Melnick and Adelbergs: Medical Microbiology**. 27. ed. {S.I.}: McGraw-Hill Education, 2016.

CHAKANSIN, C. *et al.* Resazurin Rapid Screening for Antibacterial Activities of Organic and Inorganic Nanoparticles: Potential, Limitations and Precautions. **Analytical Biochemistry**, v. 637, 2022.

CHANG, De *et al.* Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella Pneumoniae* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–9, 2021.

CHARANI, Esmita; HOLMES, Alison. Antibiotic stewardship—twenty years in the making. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 7, 2019.

CHEN, Jian Lin; STEELE, Terry W.J.; STUCKEY, David C. Metabolic Reduction of Resazurin; Location within the Cell for Cytotoxicity Assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 351–358, 2018.

CHEN, Kun *et al.* Bacterial Hyperpolarization Modulated by Polyoxometalates for Solutions of Antibiotic Resistance. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 220, n. January, p. 111463, 2021.

CLAUDEL, Mickaël; SCHWARTE, Justine V.; FROMM, Katharina M. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. **Chemistry (Switzerland)**, v. 2, n. 4, p. 849–899, 2020.

CLISSOLD, S. P.; TODD, P. A.; CAMPOLI-RICHARDS, D. M. Imipenem/Cilastatin: A Reappraisal of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy. **Drugs**, v. 44, n. 3, p. 408–444, 1992.

CLSI. **M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Wayne, PA: Clinical and Laboratory, 2022.

CODJOE, Francis; DONKOR, Eric. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

COLLIGNON, Peter J.; MCEWEN, Scott A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, 2019.

COTTON, G. C. *et al.* Efficacy and Safety of Alpha Lipoic Acid-Capped Silver Nanoparticles for Oral Applications. **RSC Advances**, v. 9, n. 12, p. 6973–6985, 2019.

CUSACK, T. P. *et al.* Time to Switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian Perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 782–785, 2019.

DAKAL, Tikam Chand *et al.* Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–17, 2016.

DEL BONO, Valerio *et al.* Meropenem for Treating KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Bloodstream Infections: Should We Get to the PK/PD Root of the Paradox? **Virulence**, v. 8, n. 1, p. 66–73, 2017.

DENG, Hua *et al.* Mechanistic Study of the Synergistic Antibacterial Activity of Combined Silver Nanoparticles and Common Antibiotics. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 16, p. 8840–8848, 2016.

DEUSENBERRY, Carly; WANG, Yingying; SHUKLA, Anita. Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 695–720, 2021.

BRASIL. Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 240, Seção 1, p.59. 14 dez. 2018.

DINH, Thanh D. *et al.* Population-Based Pharmacokinetics and Dose Optimization of Imipenem in Vietnamese Critically-Ill Patients. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 4575–4583, 2022.

DOLININA, Ekaterina S.; AKIMSHEVA, Elizaveta Yu; PARFENYUK, Elena V. Development of Novel Silica-Based Formulation of  $\alpha$ -Lipoic Acid: Evaluation of Photo and Thermal Stability of the Encapsulated Drug. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2020.

DORSAM, Bastian; FAHRER, Jorg. The Disulfide Compound  $\alpha$ -Lipoic Acid and Its Derivatives: A Novel Class of Anticancer Agents Targeting Mitochondria. **Cancer Letters**, v. 371, n. 1, p. 12–19, 2016.

DORWARD, D. ***Klebsiella Pneumoniae***. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=18170>>. Acesso em: 22 dec. 2022.

DYAR, O. J. *et al.* What Is Antimicrobial Stewardship? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 11, p. 793–798, 2017.

EFFAH, Clement Yaw *et al.* Klebsiella Pneumoniae: An Increasing Threat to Public Health. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2020.

EL-SAYED, Amr; KAMEL, Mohamed. Advanced Applications of Nanotechnology in Veterinary Medicine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19073–19086, 2020.

EYLER, Rachel F.; SHVETS, Kristina. Clinical Pharmacology of Antibiotics. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 1080–1090, 2019.

FARHA, Maya A.; BROWN, Eric D. Drug Repurposing for Antimicrobial Discovery. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 565–577, 2019.

FDA. **FDA Approves Antibiotic to Treat Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-antibiotic-treat-hospital-acquired-bacterial-pneumonia-and-ventilator-associated>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

FERREYRA MAILLARD, Anike P.V. *et al.* Zeta Potential beyond Materials Science: Applications to Bacterial Systems and to the Development of Novel Antimicrobials. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1863, n. 6, p. 183597, 2021.

FISHMAN, Neil. Antimicrobial Stewardship. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5 SUPPL., p. 55–63, 2006.

FOLDBJERG, Rasmus; DANG, Duy Anh; AUTRUP, Herman. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in the Human Lung Cancer Cell Line, A549. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 743–750, 2011.

FRANCI, Gianluigi *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856–8874, 18 May 2015.

GURUNATHAN, Sangiliyandi *et al.* Enhanced Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Silver Nanoparticles against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2014.

GUZMÁN-SOTO, Irene *et al.* Lipoic Acid Capped Silver Nanoparticles: A Facile Route to Covalent Protein Capping and Oxidative Stability within Biological Systems. **RSC Advances**, v. 10, n. 54, p. 32953–32958, 2020.

HAJTUCH, Justyna *et al.* Lipoic Acid-Coated Silver Nanoparticles: Biosafety Potential on the Vascular Microenvironment and Antibacterial Properties. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1–13, 2022.

HALDER, Suman *et al.* Alteration of Zeta Potential and Membrane Permeability in Bacteria: A Study with Cationic Agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2015.

HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Evolving Concepts in Biofilm Infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, 2009.

HELLINGER, Walter C.; BREWER, Nelson S. Imipenem. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 66, n. 10, p. 1074–1081, 1991.

HENRY, R. Etymologia: Carbapenem. **Emerg Infect Dis.**, v. 25, n. 7, 2019.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and Future. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015.

HUTCHINGS, Matt; TRUMAN, Andrew; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: Past, Present and Future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019.

IMMING, P.; KLAR, B.; DIX, D. Hydrolytic Stability versus Ring Size in Lactams: Implications for the Development of Lactam Antibiotics and Other Serine Protease Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 22, p. 4328–4331, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) 20776-1. **Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices — Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the in Vitro Activity of Antimicrobial Agents against Rapidly Growing Aerobi.** 2. ed. Geneva, Switzerland: ISO, 2019. Disponível em: [www.iso.org](http://www.iso.org). Acesso em dez. 2022.

JAVED, Rabia *et al.* Role of Capping Agents in the Application of Nanoparticles in Biomedicine and Environmental Remediation: Recent Trends and Future Prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2020.

JENSEN, James O. Vibrational Frequencies and Structural Determination of Aluminum Tetrahydroborate. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 7, p. 1565–1578, 2003.

JESUS, V. P.S. *et al.* Nanoparticles of Methylene Blue Enhance Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, n. May, p. 212–217, 2018.

JONES, Ronald N. Important and Emerging  $\beta$ -Lactamase-Mediated Resistances in Hospital- Based Pathogens: The Amp C Enzymes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 31, n. 3, p. 461–466, 1998.

KARDOS, Nelson; DEMAIN, Arnold L. Penicillin: The Medicine with the Greatest Impact on Therapeutic Outcomes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 4, p. 677–687, 2011.

KING, Shirin R.; MASSICOT, Juliette; MCDONAGH, Andrew M. A Straightforward Route to Tetrachloroauric Acid from Gold Metal and Molecular Chlorine for Nanoparticle Synthesis. **Metals**, v. 5, n. 3, p. 1454–1461, 2015.

KNIGHT, Gwenan M. *et al.* Antimicrobial Resistance and COVID-19: Intersections

and Implications. **ELife**, v. 10, p. 1–27, 16 Feb. 2021.

KOBAYASHI, Renata K.T.; NAKAZATO, Gerson. Editorial: Nanotechnology for Antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 10–12, 2020.

KOLAR, Milan; URBANEK, Karel; LATAL, Tomas. Antibiotic Selective Pressure and Development of Bacterial Resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p. 357–363, 2001.

KONG, Qidi; YANG, Yushe. Recent Advances in Antibacterial Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 35, n. 19, p. 127799, 2021.

LAI, Chih Cheng *et al.* Increased Antimicrobial Resistance during the COVID-19 Pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 4, 2021.

LAPLANTE, K. L.; *et al.* **Antimicrobial Stewardship: Principles and Practice**. Boston, EUA: [s.n.], 2017.

LAZAR, Veronica. Quorum Sensing in Biofilms – How to Destroy the Bacterial Citadels or Their Cohesion/Power? **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 280–285, 1 Dec. 2011.

LE, Thi Thu *et al.* Efficient Synthesis of Alkali Borohydrides from Mechanochemical Reduction of Borates Using Magnesium-Aluminum-Based waste. **Metals**, v. 9, n. 10, 2019.

LI; *et al.* Synergistic Antibacterial Effects of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Combined with Silver Nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1912–1917, 2005.

LI, Bei *et al.* Molecular Pathogenesis of *Klebsiella Pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, 2014.

LIMA, Renata; DEL FIOL, Fernando Sá; BALCÃO, Victor M. Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–10, 2019.

LINARES, J. F. *et al.* Antibiotics as Intermicrobial Signaling Agents Instead of Weapons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19484–19489, 2006.

LIPS, Michal *et al.* Pharmacokinetics of Imipenem in Critically Ill Patients during Empirical Treatment of Nosocomial Pneumonia: A Comparison of 0.5-h and 3-h Infusions. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 4, p. 358–362, 2014.

LOPEZ-CARRIZALES, Montserrat *et al.* In Vitro Synergism of Silver Nanoparticles with Antibiotics as an Alternative Treatment in Multiresistant Uropathogens. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2018.

MACHADO, Aline Belem *et al.* Applications of Nanotechnology in Water Treatment. **Revista Conhecimento Online**, v. 1, p. 3–15, 2019.

MADDELA, N. R.; CHAKRABORTY, S; PRASAD, R. **Nanotechnology for Advances in Medical Microbiology**. [S. l.]: Springer, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-15-9916-3>. Acesso em: dez. 2022.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. v. 4.

MAIER, Berenike. How Physical Interactions Shape Bacterial Biofilms. **Annual Review of Biophysics**, v. 50, p. 401–417, 2021.

MALAWONG, Sathit *et al.* Silver Nanoparticles Enhance Antimicrobial Efficacy of Antibiotics and Restore That Efficacy against the Melioidosis Pathogen. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, 2021.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella Pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–15, 2018.

MCCONNELL, Michael J. Where Are We with Monoclonal Antibodies for Multidrug-Resistant Infections? **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 5, p. 1132–1138, 2019.

MELETIS, Georgios. Carbapenem Resistance: Overview of the Problem and Future Perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2016.

MIETHKE, Marcus *et al.* Towards the Sustainable Discovery and Development of New Antibiotics. **Nature Reviews Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 726–749, 2021.

MIKHAILOVA, Ekaterina O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 4, 2020.

MOHAMMED, Isra; ABASS, Elfadil. Phenotypic Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases (ESBL) among Gram Negative Uropathogens Reveals Highly Susceptibility to Imipenem. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 1104–1109, 2019.

MOHR, Kathrin I. What Is an Antibiotic? Revisited. **How to Overcome Antibiot. Cris.** [S.l: s.n.], 2016. p. 237–372.

MULFINGER, L.; *et al.* Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322–325, 2007.

MURRAY, Christopher JL *et al.* Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

MURUGAIYAN, Jayaseelan *et al.* Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 1–37, 2022.

NASROLLAHZADEH, Mahmoud *et al.* **An Introduction to Nanotechnology**. 1. ed.

[S.I.]: Elsevier, 2019. v. 28.

NAVARRO, Julien R.G.; WERTS, Martinus H.V. Resonant Light Scattering Spectroscopy of Gold, Silver and Gold-Silver Alloy Nanoparticles and Optical Detection in Microfluidic Channels. **Analyst**, v. 138, n. 2, p. 583–592, 2013.

NAVON-VENEZIA, Shiri; KONDRATYEVA, Kira; CARATTOLI, Alessandra. Klebsiella Pneumoniae: A Major Worldwide Source and Shuttle for Antibiotic Resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017.

NISKA, Karolina *et al.* Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An in Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 10, p. 772–782, 2016.

NORRBY, S. R. Carbapenems. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 745–759, 1995.

OKA, Yoshihiro *et al.* Preparation of Silver Nanocolloidal Solution by Cavitation Bubble Plasma. **Vacuum**, v. 167, p. 530–535, 2019.

OLEKSY-WAWRZYNIAK, Monika *et al.* The In Vitro Ability of Klebsiella Pneumoniae to Form Biofilm and the Potential of Various Compounds to Eradicate It from Urinary Catheters. **Pathogens**, v. 11, n. 1, 2022.

OLIVEIRA, David M.P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

ONG, Teik Hwa *et al.* Cationic Chitosan-Propolis Nanoparticles Alter the Zeta Potential of *S. Epidermidis*, Inhibit Biofilm Formation by Modulating Gene Expression and Exhibit Synergism with Antibiotics. **PloS one**, v. 14, n. 2, p. e0213079, 2019.

PANACEK, Ales *et al.* Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and How to Overcome It. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. 1, p. 65–71, 4 Jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>.

PAPICH, M. G. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**: small and large animal. 4.ed. [S.I.]: Elsevier, 2016. p. 393–394.

PARAMELLE, D. *et al.* A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. **Analyst**, v. 139, n. 19, p. 4855–4861, 2014.

PARVEKAR, Prashik *et al.* The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Silver Nanoparticles against Staphylococcus Aureus. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105–109, 2020.

PAVAN, Heggadadevanakote Kendaganna *et al.* Review of Known and Unknown

Facts of *Klebsiella Pneumoniae* and Its Relationship with Antibiotics. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 15, n. 2, p. 643–650, 2022.

PEIRANO, G.; *et al.* Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella Pneumoniae* Clones ST307 and ST147. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, 2020.

PENA, Rocio Trastoy *et al.* Relationship between Quorum Sensing and Secretion Systems. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1100, 2019.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>

PENESYAN, Anahit *et al.* Rapid Microevolution of Biofilm Cells in Response to Antibiotics. **Npj Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, 2019.

POURALI, Samaneh. Imipenem, Cilastatin, Relebactam (Recarbrio). **Infectious Disease Alert**, Atlanta, v. 39, Apr. 2020. Disponível em:  
<https://www.proquest.com/docview/2506724594/5B4D5A3631884ED7PQ/1>. Acesso em: 25 jun. 2022.

RAI, Akhilesh; PRABHUNE, Asmita; PERRY, Carole C. Antibiotic Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles with Potent Antimicrobial Activity and Their Application in Antimicrobial Coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 32, p. 6789–6798, 2010.

RAI, Mahendra *et al.* Broad-Spectrum Bioactivities of Silver Nanoparticles: The Emerging Trends and Future Prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1951–1961, 2014.

RIPABELLI, Giancarlo *et al.* Tracking Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* from an Italian Hospital: Molecular Epidemiology and Surveillance by PFGE, RAPD and PCR-Based Resistance Genes Prevalence. **Current Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 977–987, 2018.

ROBERTS, Jason A.; TACCONE, Fabio Silvio; LIPMAN, Jeffrey. Understanding PK/PD. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1797–1800, 2016.

RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J.C.; TORRES, A. Two Decades of Imipenem Therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 916–929, 2006.

ROSSI GONÇALVES, Iara *et al.* Carbapenem-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Association with Virulence Genes and Biofilm Formation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 211–217, 2017.

RUIZ-RAMOS, J.; RAMÍREZ, P. Antimicrobial Stewardship Programs in the Intensive Care Unit in Patients with Infections Caused by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Medicina Intensiva (English Edition)**, v. 47, p. 99–107, 2022.

SALUNKE, Gayatri R. *et al.* Rapid Efficient Synthesis and Characterization of Silver, Gold, and Bimetallic Nanoparticles from the Medicinal Plant *Plumbago Zeylanica* and Their Application in Biofilm Control. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n.

1, p. 2635–2653, 2014.

SANTOS, Ana Cláudia *et al.* Nanotechnology for the Development of New Cosmetic Formulations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 4, p. 313–330, 2019.

SAUER, Karin *et al.* The Biofilm Life Cycle: Expanding the Conceptual Model of Biofilm Formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

SAVOLAINEN, K *et al.* **Nanosafety in Europe 2015–2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations, Finnish Institute of Occupational Health.** [S.I.]: Finnish Institute of Occupational Health, 2013.

Disponível em:

<https://www.nanowerk.com/nanotechnology/reports/reportpdf/report159.pdf>. Acesso em: dez. 2022.

SEAL, Bruce S. *et al.* Microbial-Derived Products as Potential New Antimicrobials. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 1–12, 2018.

SHI, Chao *et al.* Antimicrobial Effect of Lipoic Acid against Cronobacter Sakazakii. **Food Control**, v. 59, p. 352–358, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.041>>.

SIGMA-ALDRICH. **Imipenem.** Disponível em:

<<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sial/phr1796>>. Acesso em: 29 dec. 2022.

SINDHWANI, Shrey; CHAN, Warren C.W. Nanotechnology for Modern Medicine: Next Step towards Clinical Translation. **Journal of Internal Medicine**, v. 290, n. 3, p. 486–498, 2021.

SINGH, Rajni; SMITHA, M. S.; SINGH, Surinder P. The Role of Nanotechnology in Combating Multi-Drug Resistant Bacteria. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 7, p. 4745–4756, 2014.

SMEKALOVA, Monika *et al.* Enhanced Antibacterial Effect of Antibiotics in Combination with Silver Nanoparticles against Animal Pathogens. **Veterinary Journal**, v. 209, p. 174–179, 2016.

SRINIVASAN, Supriya *et al.* Multifunctional Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Detectable Silver Nanoparticles for Combined Photodynamic Therapy and PH-Triggered Chemotherapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 12, p. 2202–2219, 2016.

STEPANOVIC, Srdjan *et al.* Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STUART, Barbara H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.** , [S.I.]: Wiley, 2005. v. 8.

TACCONELLI, E.; MAGRINI, N. **Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. . [Genebra: WHO], 2017.

TANG, Junqi *et al.* Calculation Extinction Cross Sections and Molar Attenuation Coefficient of Small Gold Nanoparticles and Experimental Observation of Their UV–Vis Spectral Properties. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 513–520, 2018.

TEEPARUKSAPUN, Kosin T; RASONGCHAN, Nicha P; HAWONSUWAN, Auttachai T. Alpha-Lipoic Acid Functionalized Silver Nanoparticles for Colorimetric Detection of Copper Ion. **Analytical Sciences**, v. 35, n. 4, p. 371-377, 2019.

THOMAS, S. **Antimicrob. Resist.** Singapore: Springer, 2020.

TOHAMY, Hossam G. *et al.* Biochemical, Molecular and Cytological Impacts of Alpha-Lipoic Acid and Ginkgo Biloba in Ameliorating Testicular Dysfunctions Induced by Silver Nanoparticles in Rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 25, p. 38198–38211, 24 May 2022.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.;; CASE, C. L. **Tortora Funke**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ULLAH, Hamid; ALI, Saqib. Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions. **Antibacterial Agents**, v. 10, p. 1-16, 2017.

USMAN, Muhammad *et al.* Nanotechnology in Agriculture: Current Status, Challenges and Future Opportunities. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137778, 2020.

VALERO, Ana *et al.* Pseudomonas Aeruginosa Susceptibility in Spain: Antimicrobial Activity and Resistance Suppression Evaluation by Pk/Pd Analysis. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1–18, 2021.

VELGOSOVA, Oksana *et al.* Influence of Reagents on the Synthesis Process and Shape of Silver Nanoparticles. **Materials**, v. 15, n. 19, 2022.

WAN, Guoqing *et al.* Effects of Silver Nanoparticles in Combination with Antibiotics on the Resistant Bacteria Acinetobacter Baumannii. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3789–3800, 2016.

WANG, Guoying *et al.* The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella Pneumoniae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 1–17, 2020.

WARRIER, Anjali; SATYAMOORTHY, Kapaettu; MURALI, Thokur Sreepathy. Quorum-Sensing Regulation of Virulence Factors in Bacterial Biofilm. Future Microbiology. **Future microbiology**, v. 16, n. 13, p. 1003-1021, 2021.

WHO. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: WHO, 2015.

Disponível em:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763\\_eng.pdf;jsessionid=0ECC74DD9DDB74AAD1865B9E6348EC3F?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/193736/9789241509763_eng.pdf;jsessionid=0ECC74DD9DDB74AAD1865B9E6348EC3F?sequence=1).

WILKINS, Matthew *et al.* New Approaches to the Treatment of Biofilm-Related Infections. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S47–S52, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.014>.

WILSON, J. W. *et al.* Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, p. 216–224, 2002.

WRIGHT, Jenny; PAAUW, Douglas S. Complications of antibiotic therapy. **Medical Clinics**, v. 97, n. 4, p. 667-679, 2013.

WRIGHT, Patricia P.; RAMACHANDRA, Srinivas Sulugodu. Quorum Sensing and Quorum Quenching with a Focus on Cariogenic and Periodontopathic Oral Biofilms. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, 2022.

WU, Zhengguo *et al.* Antibacterial and Hemostatic Thiol-Modified Chitosan-Immobilized AgNPs Composite Sponges. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 18, p. 20307–20320, 2020.

WYRES, Kelly L.; LAM, Margaret M.C.; HOLT, Kathryn E. Population Genomics of *Klebsiella Pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 2020.

YEKANI, Mina *et al.* Carbapenem Resistance in *Bacteroides Fragilis*: A Review of Molecular Mechanisms. **Anaerobe**, v. 76, 2022.

ZACHARY, James F. Mechanisms of Microbial Infections. *In*: ZACHARY, James F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 6. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 132–241. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3..

ZAHRAN, Moustafa *et al.* Spectral Studies of Silver Nanoparticles Biosynthesized by *Origanum Majorana*. **Green Processing and Synthesis**, v. 7, n. 2, p. 100–105, 2018.

ZASOWSKI, Evan J. *et al.* A Systematic Review of the Effect of Delayed Appropriate Antibiotic Treatment on the Outcomes of Patients With Severe Bacterial Infections. **Chest**, v. 158, n. 3, p. 929–938, 2020.

ZHANG, Dan *et al.* Evaluation of Imipenem Pharmacokinetic. Pharmacodynamic Parameters and the Impact on Antimicrobial Outcomes in Critically Ill Patients. **Authorea Preprints**, 2020. DOI: 10.22541/au.159164097.76398923.

ZHANG, Ji-Hu; OLDENBURG, Kevin R. Z-Factor. *In*: SCHWAB, Manfred (ed.). **Encyclopedia of Cancer**. Heidelberg: Springer Berlin, 2009. p. 3227–3228.

ZHAO, Wei Hua; HU, Zhi Qing. Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Genetic Association with Class 1 Integrons and ISCR Elements in Gram-Negative Bacteria.

**Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 873–887, 2015.

ZHOU, Panghu *et al.* Construction of Chitosan/Ag Nanocomposite Sponges and Their Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 272–277, 2021.

ZHOU, Nan *et al.* Global Antimicrobial Resistance: A System-Wide Comprehensive Investigation Using the Global One Health Index. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2022.

ZHU, Jie *et al.* Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–14, 2021.