

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

THAÍS DA SILVA VERIATO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS AO COMPLEXO  
VANCOMICINA-CISTEAMINA PARA TRATAMENTO DE *Staphylococcus aureus*  
E *Enterococcus faecalis***

São José dos Campos, SP  
2022

THAÍS DA SILVA VERIATO

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS AO COMPLEXO  
VANCOMICINA-CISTEAMINA PARA TRATAMENTO DE *Staphylococcus aureus*  
E *Enterococcus faecalis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

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

São José dos Campos, SP  
2022

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Veriato, Thaís da Silva

Nanopartículas de prata funcionalizadas ao complexo vancomicina-cisteamina para tratamento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* / Thaís da Silva Veriato; orientadora, Profa. Dra. Maiara Lima Castilho; co-orientador Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 69 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. vancomicina. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Nanopartículas Metálicas. 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, Thaís da Silva Veriato, 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, 28 de Abril de 2022.

*Thaís da Silva Veriato*

Autor(a) da Obra

**THAÍS DA SILVA VERIATO**

**“NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS AO COMPLEXO  
VANCOMICINA-CISTEAMINA PARA TRATAMENTO DE *Staphylococcus aureus* E  
*Enterococcus faecalis*.”**

> >

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

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MAIARA LIMA CASTILHO

PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> DAYANE BATISTA TADA - Unifesp

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

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 08 de março 2022.

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais **Maria e Paulo**, pessoas estas que não tiveram a oportunidade de conhecer a imensidão da Universidade, mas que se propuseram a renegar seus próprios sonhos para me ver conquistar a Graduação e a Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Os meus pais lidaram com a minha ausência e não mediram esforços para me apoiar em todas as etapas, mesmo não entendendo o mundo da pesquisa, eles estiveram apoiando e torcendo para que este sonho fosse possível.

À minha irmã **Érika**, minha companheira de vida, por ser meu apoio, por ter me ajudado e cuidado tanto de mim, desde aguentar minhas ansiedades até me buscar muitas vezes cansada para termos as finais de semanas juntas.

Aos meus padrinhos **Maria Rita e George**, por me apoiarem tanto, por sonharem junto comigo em cada etapa e por principalmente cuidar do meu espiritual.

À **vovó Tereza** (*in memoriam*) por ter colocado a Educação na minha vida, desde o amor aos livros até todo apoio para a minha formação.

Ao **Tio Berto** (Gilberto Veriato, *in memoriam*) por ter me acompanhado todos esses anos, me ensinado a levar a vida de uma forma leve, feliz e divertida. Entre todos os esforços, ele me ensinou a ser feliz acima do profissional e pessoal.

Dedico a **minha família** por serem a minha maior base de amor, força, fé e sabedoria. São seis anos longe do convívio deles para a realização do meu maior sonho, a minha carreira acadêmica. Todo trabalho, conquista e dedicação é por vocês!

## Agradecimentos

Primeiramente a **Deus**, por ser meu mentor espiritual e físico, por ter me orientado e direcionado para os melhores caminhos, mesmo aqueles que foram difíceis, mas cheio de aprendizados e amadurecimentos. Assim, aceito e entendo que para a nossa evolução espiritual precisamos passar por situações boas e ruins.

A minha mãe **Maria**, por ser o meu motivo de ser Engenheira Biomédica e pelos caminhos que trilhei nessa área. Foi por ela que direcionei a minha carreira, pela força, por sua história, pela dedicação, afeto, amparo e amor incondicional. Uma mulher nordestina com uma força absurda que tendo todos os motivos para desistir, se fez resistência e tornou os meus sonhos possíveis.

Ao meu pai **Paulo**, por ser a minha estrutura e meu patrocinador, por ter acreditado e investido em todos os meus sonhos. Foi ele que abdicou dos próprios sonhos para me dar a melhor criação e educação. Até hoje ele talvez não entenda o que realmente é a minha formação, mas ele apoia e investe para me ver feliz e realizada, sem os seus esforços e amor incondicional, eu não teria me tornado quem eu queria.

A minha irmã **Érika**, por estar comigo mesmo que distante em todos os momentos me amparando e cuidando, e principalmente me dando força para não desistir. A sua força e energia me tornou uma rocha para que nada me abalasse e quando tentasse, era só chegar que ela cuidava disso, por mais nova que seja sempre foi gigante para mim. Obrigada por tudo que me fez, eu não seria nada sem você!

Aos meus padrinhos **Maria Rita** e **George**, por exercerem a missão de cuidar do meu espiritual e emocional. Eles me deram amor, força, estrutura, proteção e apoio para que todos os meus sonhos fossem realizados da melhor maneira e que não desistisse nos primeiros obstáculos. Como minha madrinha sempre me dizia “eu lhe proíbo de desistir”.

A minha namorada **Amanda**, pelo amor que tornou meu coração leve e feliz, pelo cuidado nos dias que o Mestrado foi pesado, pelo apoio em todas as mudanças e por sonhar comigo com o futuro próximo. A sua presença me deixou mais calma, em paz e feliz, assim eu consegui terminar esse Mestrado dando todo o meu melhor. Você me tornou melhor! Obrigada por ser o meu amor, minha companheira e paz!

A minha melhor amiga **Viviane Jesus**, eu não tenho palavras para dizer o quanto sou grata pela nossa amizade e conexão. Só posso dizer uma coisa “Deus”! Ele nos colocou nesta vida para ser amigas e apoio nesta caminhada de Pós-Graduação que não foi fácil. Obrigada por ter me apoiado, não ter me deixado desistir, por todos os momentos que passamos juntas, desde viagens e até os momentos tristes. A nossa conexão distância nenhuma vai separar!!! Obrigada por tudo, você foi essencial nesta minha caminhada.

A minha amiga **Marcela Cândido**, pelos 6 anos de amizade e parceria, desde a Graduação até a Pós me aguentando, brincadeiras a parte. Obrigada por toda paciência, ensinamentos, companheirismo, amizade e carinho. Obrigada por ter sido a pessoa que me colocava no chão, me acalmava e me fazia pensar, quando eu passava por momentos de estresse com o Mestrado, sem você eu já teria gastado o meu réu primário com alguém.

A minha amiga **Nathanne Rost**, pelos 6 anos de amizade entre brincadeiras até me deixar sozinha no ponto de ônibus (eu não conhecendo direito a cidade) e prender meu dedo no carro. Os momentos que você mesmo longe foi essencial na minha vida, do carinho, do acolhimento, da amizade e do amor. Além do apoio em todas as minhas etapas, você sempre entrava na onda e me fazia ser “criança”, me ensinando levar esse Mestrado de uma forma leve e com Deus no coração. Obrigada por tudo!

A minha amiga **Bruna Marques**, pela amizade, carinho, amor, por me ouvir e me direcionar nos momentos que o Mestrado foi pesado, além de todas as análises que realizou para os meus experimentos.

A minha amiga **Paula Vieira**, pela amizade, carinho, apoio e ajuda com o inglês, além dos cafés que sempre fazia quando o “Sonic” estava triste.

A minha amiga **Larissa Oliveira**, pelo acolhimento, apoio, amizade e pela ajuda aos finais de semana e feriados nos experimentos.

As minhas amigas **Aline**, **Rafaela** e **Flávia**, além do carinho, amizade, ajuda nos experimentos, do companheirismo nos momentos bons e ruins nesta etapa.

Ao meu amigo **Alessandro Mendes**, pela amizade, pelas direções, e principalmente por acreditar em mim e me apoiar tanto, além de ter sido a pessoa que plantou o amor

pela Instrumentação Biomédica no meu coração. Quando eu escutava coisas negativas, você sempre me falava o contrário e mostrava o aprendizado que estava ali. Você teve uma importância muito grande para que eu terminasse esse Mestrado mais madura e sendo grata por todos os momentos, até mesmo os difíceis.

A minha colega **Inglid Fontoura**, pela ajuda e auxílio nos experimentos, além das conversas sobre Deus e direções, além do carinho e amizade, e por torcer por mim.

A aluna **Lara**, pela ajuda e auxílio nos experimentos, além do carinho e amizade que tivemos nesta reta final.

A minha orientadora **Maiara Castilho**, pela escrita do projeto, o qual me direcionou e me proporcionou a realização da minha Dissertação. Além de todos os momentos bons e ruins, que também contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

Ao meu Co-orientador **Leandro Raniero**, por ter me dado à primeira oportunidade no mundo da Pesquisa ao ser sua aluna de Iniciação Científica, a qual me proporcionou os conhecimentos técnicos e científicos para continuar a caminhada na Pós-Graduação. Além de todos os momentos de carinho, cafés até os puxões de orelha (prometo não bater mais portas), colaboração e contribuição para minha formação pessoal e profissional.

A todos os **Professores da Graduação e Pós-Graduação**, pelo apoio e pelos conhecimentos técnicos e científicos para complementar a minha formação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida, a qual proporcionou a realização deste trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente estiveram comigo nesta etapa e contribuíram para minha formação.

*“Toute réussite déguise une abdication”.*  
*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.*

Simone de Beauvoir

# NANOPARTÍCULAS DE PRATA FUNCIONALIZADAS AO COMPLEXO VANCOMICINA-CISTEAMINA PARA TRATAMENTO DE *Staphylococcus aureus* E *Enterococcus faecalis*

## RESUMO

Atualmente, a resistência bacteriana é um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI. As bactérias como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) destacam-se a nível internacional quanto aos isolados, sendo que cerca de 30% são de *S. aureus* e 19,5% de *E. faecalis* comumente relacionadas às infecções nosocomiais. Esses microrganismos apresentam outro aspecto em comum, a resistência à vancomicina, um antimicrobiano inibidor da produção de peptidoglicano da parede celular. Nos últimos anos, em virtude desta resistência houve um aumento na demanda de novos fármacos para cessar este problema. Neste âmbito, as nanopartículas de prata (AgNPs) destacam-se pela ação antibacteriana, baixa toxicidade em sistemas biológicos e a possibilidade de associação com antibióticos a fim de aumentar o efeito no combate destes microrganismos. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo a funcionalização da vancomicina na superfície das AgNPs com intuito de aumentar o efeito antibacteriano no tratamento da cepas planctônicas de *S. aureus* e *E. faecalis*. Neste estudo foi possível a modificação química da vancomicina por meio da química carbodiimida. As AgNPs sintetizadas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico de 43,82 nm e uma banda de ressonância plasmônica centrada em 392 nm, enquanto o nanofármaco Ag@vancomicina demonstrou um diâmetro de 47,28 nm e uma banda centrada em 391 nm. Nos ensaios microbiológicos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) com a Ag@vancomicina foi possível obter uma CIM de 0,25 µg/mL para *S. aureus* ATCC (29213), o que representou uma redução 8 vezes da concentração. Entretanto, para as clínicas SA-1 e SA-2, a CIM manteve-se a mesma do fármaco sozinho. Porém, a SA-3 a CIM foi reduzida em 2 vezes quando comparada ao antibiótico. A cepa de *E. faecalis* ATCC (29212) determinou a CIM em 0,12 µg/mL, correspondendo aproximadamente uma redução de 16 vezes da CIM do fármaco. Enquanto, para as cepas clínicas EF-1, EF-2 e EF-3 a redução observada da CIM correspondeu a 4, 2 e 2 vezes, respectivamente. A CBM foi de 1 µg/mL de Ag@vancomicina para ambas as espécies ATCC. Entretanto nas clínicas o efeito bactericida em concentrações baixas só foi observado para SA-1 e SA-2, para as demais CBM é maior que 4 µg/mL. Os resultados destes ensaios exibiram um excelente desempenho do nanofármaco sintetizado, o que indica que a funcionalização potencializa a ação bacteriostática tanto das AgNPs quanto da vancomicina. Porém, para exercer a ação bactericida a concentração deve ser aumentada para determinadas cepas clínicas. Portanto, sugere-se que a Ag@vancomicina tem grande potencial para as aplicações em cepas resistentes a este antibiótico.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, vancomicina, Nanopartículas de prata.

# SILVER NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED TO VANCOMYCIN-CYSTEAMINE COMPLEX FOR TREATMENT OF *Staphylococcus aureus* AND *Enterococcus faecalis*

## ABSTRACT

Currently, bacterial resistance is one of the biggest public health challenges of the 21st century. Bacteria such as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) stand out internationally in terms of isolates, with about 30% being from *S. aureus* and 19.5% from *E. faecalis* commonly related to nosocomial infections. These microorganisms present another aspect in common, the resistance to vancomycin, an antimicrobial inhibitor of cell wall peptidoglycan production. In recent years, due to this resistance, there was an increase in demand for new drugs to pause this problem. In this context, silver nanoparticles (AgNPs) stand out for their antibacterial action, low toxicity in biological systems, and the possibility of association with antibiotics to increase their effect on fighting these microorganisms. In this background, this project aimed at the functionalization of vancomycin on AgNPs surface to increase the antibacterial effect in planktonic strains the *S. aureus* and *E. faecalis* treatment. In this study, it was possible to chemically modify vancomycin through carbodiimide chemistry. The synthesized AgNPs revealed a hydrodynamic diameter of 43, 82 nm and a plasmonic resonance band centered at 392 nm, while the nanodrug Ag@vancomycin demonstrates a diameter of 47, 28 nm and a band centered at 391 nm. In the microbiological assays of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) with Ag@vancomycin, it was possible to obtain a MIC of 0.25 µg/mL for *S. aureus* ATCC (29213), which represented an 8-fold reduction of concentration. However, for clinics SA-1 and SA-2, the MIC remained the same as for the drug alone. However, SA-3 and MIC were reduced by 2-fold when compared to the antibiotic acting alone. For *E. faecalis* ATCC (29212) the MIC found was 0.12 µg/mL, corresponding approximately to a 16-fold reduction in the MIC of the drug. While for EF-1, EF-2 and EF-3, the observed reduction in MIC corresponded to 4, 2 and 2 times, respectively. MBC was 1 µg/mL Ag@vancomycin for both ATCC strains. For clinics, the bactericidal effect at low concentrations was only observed for SA-1 and SA-2, for the other MBC it is greater than 4 µg/mL. The results of these assays showed excellent performance of synthesized nanodrug, which indicates that the functionalization enhances the bacteriostatic action of both AgNPs and vancomycin. However, to exert the bactericidal action, the concentration must be increased for certain strains. Therefore, it is suggested that Ag@vancomycin has great potential for applications in strains resistant to this antibiotic.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, vancomycin, silver nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de conjugação bacteriana. ....	20
Figura 2: Processo de transformação bacteriana.....	21
Figura 3: Processo de transdução bacteriana.....	22
Figura 4: Mecanismo de resistência à vancomicina. ....	25
Figura 5: a) Ligação da vancomicina com o terminal D-Ala-D-Ala. b) Interação repulsiva da vancomicina com o terminal D-Ala-D-Lac. ....	27
Figura 6: Representação ilustrativa do mecanismo de ação das AgNPs na bactéria. ....	29
Figura 7: Modificação química da vancomicina.....	30
Figura 8: Síntese de nanopartículas de prata por redução química. ....	32
Figura 9: Desenho em modelo 3D da molécula de vancomicina.....	32
Figura 10: Síntese do nanoantibiótico Ag@vancomicina. ....	33
Figura 11: Espectro de absorção da vancomicina.....	38
Figura 12: a) Espectro UV-Vísivel da diluição seriada da vancomicina. b) Equação da regressão linear do fármaco e o fator de ajuste R <sup>2</sup> .....	39
Figura 13: Espectro de absorção do complexo vancomicina-cisteamina. a) Complexo vancomicina-cisteamina. b) Complexo vancomicina-cisteamina purificado. ....	39
Figura 14: Teste de estabilidade da AgNPs na adição do complexo. a) AgNPs e complexo vancomicina-cisteamina (pré diálise). b) AgNPs e complexo vancomicina-cisteamina purificado (pós diálise).....	40
Figura 15: Espectro de FT-IR. a) vancomicina. b) Complexo vancomicina-cisteamina. ....	41
Figura 16: Caracterização das AgNPs. a) Espectro UV-Vísivel. b) DLS. ....	42
Figura 17: Caracterização da Ag@vancomicina. a) Espectro UV-Vísivel. b) DLS. ....	43
Figura 18: Espectro de FT-IR da Ag@vancomicina. ....	44
Figura 19: Teste de estabilidade das AgNPs e Ag@vancomicina no meio de cultura Mueller Hinton. ....	45
Figura 20: Citotoxicidade das AgNPs na linhagem L929. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>S. aureus</i> . .....	36
Tabela 2: Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>E. faecalis</i> . .....	36
Tabela 3: Determinação da CIM das AgNPs em <i>S. aureus</i> . .....	47
Tabela 4: Determinação da CIM do complexo vancomicina-cisteamina e Ag@vancomicina em <i>S. aureus</i> . .....	48
Tabela 5: Determinação da CIM das AgNPs em <i>E. faecalis</i> . .....	50
Tabela 6: Determinação da CIM do complexo vancomicina-cisteamina e Ag@vancomicina em <i>E. faecalis</i> . .....	51
Tabela 7: Determinação da CBM das AgNPs em <i>S. aureus</i> . .....	52
Tabela 8: Determinação da CBM do complexo vancomicina-cisteamina e da Ag@vancomicina em <i>S.aureus</i> . .....	52
Tabela 9: Determinação da CBM das AgNPs em <i>E. faecalis</i> . .....	53
Tabela 10: Determinação da CBM do complexo vancomicina-cisteamina e da Ag@vancomicina em <i>E. faecalis</i> . .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MRSA	Meticillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
D-Ala-D-Ala	D-Alanil-D-Alanina
VRE	vancomycin resistant <i>Enterococcus</i>
VRSA	vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
AgNPs	Nanopartículas de prata
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
Transposons	Elementos transponíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
UTIs	Unidades de terapia intensiva
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
PBP	Penicilin Binding Protein
FDA	Food and Drug Administration
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Phosphate Buffered Saline
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HCl	Ácido clorídrico
DLS	Dynamic Light Scattering
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
ZnSe	Seleneto de zinco
BHI	Brain Heart Infusion
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica
SPR	Surface Plasmon Resonance
PdI	Índice de polidispersão
PVP	Polivinilpirrolidona
ZOI	Zona de inibição
OMS	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	19
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	22
2.3	<i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> .....	24
2.4	GLICOPEPTÍDEOS.....	25
2.4.1	<i>Vancomicina</i> .....	26
2.5	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1	DILUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA VANCOMICINA.....	<b>30</b>
3.2	FORMAÇÃO DO COMPLEXO VANCOMICINA-CISTEAMINA.....	30
3.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	31
3.4	PRODUÇÃO DO NANOANTIBIÓTICO AG@VANCOMICINA.....	32
3.5	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
3.5.1	<i>Espectroscopia UV-Vísivel</i> .....	34
3.5.2	<i>Espalhamento Dinâmico da Luz</i> .....	34
3.5.3	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier</i> .....	34
3.6	CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	35
3.7	AQUISIÇÃO DOS MICRORGANISMOS E ACONDICIONAMENTO DAS CEPAS.....	35
3.7.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima</i> .....	37
3.7.2	<i>Determinação da Concentração Bactericida Mínima</i> .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA VANCOMICINA.....	38
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO VANCOMICINA-CISTEAMINA.....	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS E DA AG@VANCOMICINA.....	42
4.4	TESTE DE CITOTOXICIDADE DAS AGNPS.....	45
4.5	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE.....	47
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
	ANEXO A: COMPOSITIONS OF CALCIUM ALUMINATE CEMENT CONTAINING GOLD AND SILVER NANOPARTICLES FOR BIOMATERIAL APPLICATIONS.....	63

ANEXO B: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLE ON MONOTYPIC BIOFILMS OF <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	64
ANEXO C: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOCONTRAST FOR DIAGNOSTIC IMAGING.....	64
ANEXO D: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOPHARMACEUTICAL IN ANTIMICROBIAL THERAPY.....	65
ANEXO E: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO DE AMPLO ESPECTRO.....	65
ANEXO F: IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM DIFERENTES FLUIDOS DE CORTE SOLÚVEIS INDUSTRIAIS. ....	66
ANEXO G: NANO-ANTIBIOTIC BASED ON SILVER NANOPARTICLES COMBINED WITH A GLYCOPEPTIDE ANTIBIOTIC FOR ALTERNATIVE TREATMENT OF MULTIDRUG RESISTANCE BACTERIA. ....	66
ANEXO H: STUDY OF ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES IN <i>Staphylococcus Aureus</i> . ....	67
ANEXO I: DEVELOPMENT A NANO-ANTIBIOTIC FOR ANTIMICROBIAL THERAPY AGAINST MULTIDRUG RESISTANT MICROORGANISMS. ....	67
ANEXO J: EVALUATION OF THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES IN <i>Staphylococcus aureus</i> STRAIN.....	68
ANEXO K: ESTUDO <i>in vitro</i> DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM A TERAPIA FOTODINÂMICA EM CEPA GRAM-POSITIVA.....	68
ANEXO L: ESTUDO DA AÇÃO ANTI-BIOFILME DA ANTIBIOTICOTERAPIA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

No atual cenário pandêmico um grande problema de saúde pública foi esquecido e fortalecido, a resistência bacteriana, que é definida pela sobrevivência de bactérias quando expostas a antimicrobianos, que são fármacos cuja principal função é inibir ou matar os microrganismos. (ARMITAGE; NELLUMSUM, 2021; BOOLCHANDANI, 2019). Recentemente, a doença Coronavírus 2019 (COVID-19) proporcionou consequências desastrosas a nível econômico, social e bem-estar em todos os países. (SUBRAMANYA, 2021). Inicialmente, em virtude do aumento de casos e da rápida piora do quadro clínico dos indivíduos infectados, à população começou a recorrer para medicamentos que trouxessem uma resposta terapêutica significativa, como no caso dos antibióticos, que foram usados de forma indiscriminada e inconsequente, o que contribuiu para o aumento da resistência bacteriana (RAWSON, 2021; TIAN; XIAO, 2020).

Dentre as bactérias resistentes a antibióticos, as Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) destacam-se a nível internacional quanto aos isolados, sendo que cerca de 30% são de *S. aureus*, comumente relacionadas às infecções nosocomiais. Enquanto, 19,5% são de *E. faecalis* relacionadas com as infecções do trato urinário e entre outras manifestações clínicas (HUANG, 2019; UÇKAY, 2017).

A bactéria *S. aureus* é um importante patógeno oportunista que tem como habitat a microbiota nasal, pele e trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, e quando adentram na corrente sanguínea ou nos tecidos podem causar infecções graves, como bacteremia, endocardite e entre outras. A contaminação por este microrganismo ocorre principalmente em hospitais, e seu tratamento ainda é dificultoso em razão do aparecimento de cepas multirresistentes, tem-se exemplo da MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) (TAYLOR; UNAKAL, 2021; RASIGADE, VANDENESCH, 2014).

*E. faecalis* é uma bactéria pertencente a microbiota de humanos e animais, também é encontrada em alimentos e em locais de pouca higiene. Entre os isolados de *Enterococcus*, a prevalência desse gênero é de 80 a 90% das amostras. Nos últimos anos, tornou-se responsável por várias infecções, como bacteremia, endocardites, sepse neonatal e infecções de feridas cirúrgicas. Este microrganismo apresenta resistência intrínseca e adquirida a várias classes de antibióticos, como os

beta-lactâmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos e dentre outros. Em decorrência da resposta inata a antibióticos, o seu tratamento é muitas vezes limitado, devido aos inúmeros clones multirresistentes que aparecem e dificultam o trabalho dos antimicrobianos (BARROS, 2014; MERLO, 2013).

Esses microrganismos além de serem causadores de infecções graves, apresentam outro aspecto em comum, como o uso em seu tratamento dos antibióticos da classe dos glicopeptídeos, que engloba fármacos como a vancomicina, teicoplanina e ramoplanina. A vancomicina é a mais recomendada para estas bactérias, devido à alergia de alguns pacientes a classe dos beta-lactâmicos e da resistência a oxilicina por *S. aureus*. O mecanismo de ação deste antibiótico é dado pela ligação na porção terminal D-Alanil-D-Alanina (D-Ala-D-Ala) de um pentapeptídeo encontrado na produção do peptidoglicano da parede celular, quando ocorre essa ligação, a etapa de transpeptidação é impedida de acontecer e conseqüentemente ocorre à morte do microrganismo (BANLA, 2018; SILVEIRA, 2006).

Na corrida pelo descobrimento de novos antimicrobianos, a nanotecnologia vem ganhando notoriedade nas aplicações biomédicas com as nanopartículas, em especial as de prata (AgNPs) que se destacam pela ação antibacteriana, na qual atuam na membrana da bactéria causando danos por meio do aumento da permeabilidade, extravasamento de conteúdo celular e por fim morte do microrganismo. As AgNPs também interagem com estruturas presente na parede celular da bactéria, induzindo o rompimento da parede e morte. Elas também podem alterar a cadeia respiratória e produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), proporcionando danos e apoptose. Além de apresentarem baixa toxicidade em sistemas biológicos e a possibilidade de associação com antibióticos a fim de aumentar o efeito no combate destes microrganismos (BRUNA, 2021; FRANCI, 2015).

Esta propriedade de modificação da área superficial das AgNPs é de grande interesse científico visto que a possibilidade de funcionalizar moléculas como os antibióticos, espera-se aumentar o efeito bactericida e bacteriostático com potencial duplo efeito, já que as AgNPs apresentam mecanismo de ação em diferentes vias e o antibiótico sintetizado atua em um mecanismo de ação específico. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo a funcionalização de AgNPs ao complexo vancomicina-cisteamina com intuito de aumentar o efeito antibacteriano no tratamento da *S. aureus* e *E. faecalis*.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolvimento de um nanofármaco a base de nanopartículas de prata funcionalizadas ao complexo vancomicina-cisteamina para tratamento de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese de nanopartículas de prata e sua caracterização pela Espectroscopia UV-Visível e Espalhamento Dinâmico de Luz.
- Modificação química da vancomicina e sua caracterização pela Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.
- Funcionalização das nanopartículas de prata ao complexo vancomicina-cisteamina e sua caracterização.
- Avaliação *in vitro* da ação das AgNPs funcionalizadas à vancomicina-cisteamina no tratamento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima.
- Avaliação da atividade microbicida das AgNPs funcionalizadas à vancomicina-cisteamina sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* por meio da Concentração Microbicida Mínima.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção será abordada a revisão de literatura dos tópicos mais relevantes deste estudo.

### 2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

No ramo da Infectologia, o progresso do tratamento de infecções bacterianas deu-se com a introdução dos antibióticos, os quais proporcionaram um avanço significativo, reduziram as taxas de morbidade e mortalidade. Contudo, nos últimos anos o uso indiscriminado destes fármacos também contribuiu para o surgimento de microrganismos resistentes, retratando um perigo para a sociedade. Além de limitar as opções terapêuticas, agravar quadros clínicos e prorrogar o tempo de internação, também houve aumento de custos e atualmente, a resistência bacteriana é um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; LOUREIRO, 2016).

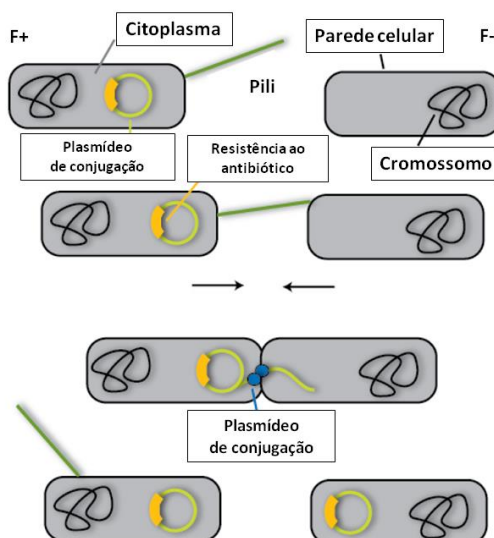
Essas infecções além de causar danos no organismo dos indivíduos infectados, geram também uma grave interferência no âmbito econômico. Nos EUA, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Center for Disease Control and Prevention*) estimou que aproximadamente 23.000 indivíduos morrem no ano por este tipo de infecção. Recentemente, um relatório reportou que até 2050 aproximadamente 300 milhões de mortes ocorreram e isso significará uma perda de até 100 trilhões de dólares para a economia mundial. Este cenário é agravado principalmente pela limitação de medicamentos frente ao combate dos microrganismos multirresistentes (MUNITA; ARIAS, 2016).

A resistência bacteriana pode ser dada de forma intrínseca, adquirida pela passagem de mutações genéticas em genes cromossômicos ou por transferência horizontal de gene de um microrganismo para o outro (MUNITA; ARIAS, 2016). A forma intrínseca é definida pela capacidade de uma espécie resistir à ação de um fármaco, devido à presença de estruturas ou funções na própria constituição da espécie. Este tipo de resistência é conhecido como resistência natural, visto que para determinado antibiótico a própria espécie já apresenta em seu código genético os genes de resistência, um exemplo, é o caso do gênero *Klebsiella* que apresentam resistência natural à ampicilina pela produção das beta-lactamases. Ou seja, quando

esse antibiótico é aplicado não há efeito porque a bactéria já apresenta em sua constituição os genes de resistência, impedindo a ação do fármaco (SILVEIRA, 1999; BASTOS, 2005).

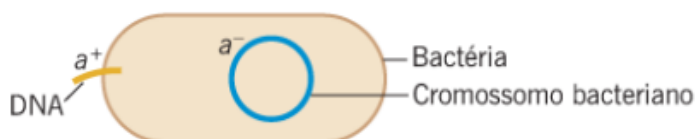
A forma adquirida ocorre em função das mutações, que podem acontecer quando as bactérias estão se replicando, pela presença de agentes mutagênicos, tem-se exemplo, as EROS ou pela obtenção de genes exógenos resistentes presentes em outros microrganismos, advindos da transferência horizontal por meio dos mecanismos de conjugação bacteriana, transformação ou transdução. A transferência horizontal do material genético tem em seu processo a presença de materiais genéticos moveis como os plasmídeos, fagos transdutores e elementos transponíveis (transpos). Essa transferência ocorre para uma célula não descendente, porém um microrganismo descendente de uma célula modificada vai apresentar os genes de resistência. Esta forma de resistência também pode acontecer por mutação no ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês deoxyribonucleic acid) da bactéria (BAPTISTA, 2013; MARTINEZ; BAQUERO, 2000).

A conjugação é uma forma de transferência do material genético resistente por meio do contato direto de duas células de mesma ou diferente espécie, sendo uma doadora (F+) e uma receptora (F-). Este tipo de transferência foi descoberto em 1946 por Joshua Lederberg e Edward Tatum, que observaram a transferência dos genes cromossômicos entre dois isolados de *Escherichia coli*. O plasmídeo é composto por DNA extracromossômico, o qual possibilita sua replicação e transmissão para outras células. O processo de conjugação ocorre por intermédio do pili, durante a clivagem de uma sequência específica de DNA plasmídico realizada pelas enzimas de restrição da célula F+. Em seguida da transferência, a célula F+ produz a cadeia complementar do DNA plasmídico e a F- produz a cadeia complementar, na Figura 1 é ilustrado esse tipo de transferência. Quanto à resistência a antibióticos, o plasmídeo é designado como R plasmídeo, por apresentar os genes de resistência. Esse tipo de transferência ocorre em bactérias Gram-positivas, como *E. faecalis*, sendo a conjugação realizada por plasmídeos e genes cromossômicos (SNUSTAD; SIMMONS, 2008; BAPTISTA, 2013).

**Figura 1:** Processo de conjugação bacteriana.

**Fonte:** Adaptado de iGEM, 2013.

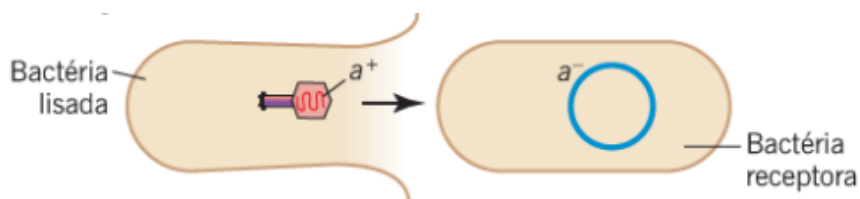
No processo de transformação, um determinado microrganismo libera no meio seu material genético, outra bactéria adquire o DNA extracelular e engloba em seu genoma. A origem deste DNA pode advir de cromossomos, plasmídeos ou de bacteriófagos. O processo só ocorre se a bactéria receptora estiver em condições favoráveis para receber o DNA, que é no estado de competência, a qual produz proteínas de superfície aptas para se ligar a este DNA (FIO; MATOS FILHO; GROPPPO, 2000). Na Figura 2, é demonstrado este mecanismo.

**Figura 2:** Processo de transformação bacteriana.

**Fonte:** Snustad e Simmons, 2008.

A transdução engloba os bacteriófagos (também conhecido como fagos), que neste processo possuem a função de vetores do DNA, levando do doador para o receptor. Os bacteriófagos transportam um pedaço pequeno do DNA da bactéria lisada, que ao contaminar a nova bactéria integra este DNA ao seu genoma. Este tipo de processo é muito observado em *S. aureus* devido ao aumento das beta-lactamases que provocam a resistência neste microrganismo (SNUSTAD; SIMMONS, 2008; BAPTISTA, 2013). Na Figura 3, é elucidada a transferência por transdução.

**Figura 3:** Processo de transdução bacteriana.



**Fonte:** Snustad e SIMMONS, 2008.

## 2.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família *Micrococcaceae* e ao gênero *Staphylococcus* que engloba 52 espécies e 28 subespécies. Em virtude da sua capacidade patogênica é o microrganismo de maior importância clínica deste gênero. É comum encontrá-la na microbiota humana, como mucosa nasal, cabelo e entre outros lugares. Quanto a colonização, é estimado que metade dos indivíduos sejam colonizados por este microrganismo e aproximadamente 15% da população conduzem *S. aureus* nas narinas. Em profissionais de saúde, diabéticos, usuários de drogas, pacientes hospitalizados e imunocomprometidos a taxa de contaminação é de até 80% (LEE, 2018; TAYLOR, UNAKAL, 2021).

Nos últimos anos tornou-se relevante por conta das infecções hospitalares, advindas da penetração dessa bactéria em tecidos como feridas. A sua estrutura é revestida por uma cápsula de polissacarídeo, cuja função é impedir a fagocitose bacteriana, contribuindo para seu acesso na corrente sanguínea ou locais estéreis do organismo. Além dessa função, esta cápsula também possibilita a conversão de fibrinogênio em fibrina, tornando-se uma característica para identificação desta bactéria (LEE, 2018; LIMA, 2015).

As infecções causadas por *S. aureus* apresentam elevado risco aos indivíduos hospitalizados em virtude da resistência aos antibióticos convencionais. Essa

resistência está relacionada aos fatores de virulência que possibilitam a colonização e disseminação rápida pelo organismo do hospedeiro. A sua variabilidade de genes é o principal fator de adaptação desta bactéria em diferentes ambientes, o que contribui para sua sobrevivência e multiplicação. A resistência conferida a esses genes depende do tipo de transferência, expressão e localização (FARIA, 2008; KONEMAN, 2001). Outro fator de virulência é a secreção de enzimas e citotoxinas por este microrganismo que contribuem para a transformação dos tecidos do hospedeiro em nutrientes essenciais para o seu crescimento. A progressão da infecção também está relacionada com a resistência a fagocitose, que ocorre por meio da expressão de proteínas anti-opsônicas que interferem na produção de anticorpos quando associadas à superfície e a cápsula de polissacarídeo (DINGES; ORWIN; SCHLIEVER, 2000; FOSTER, 2005).

Do ponto de vista clínico, é nas décadas de 50 e 60 que ela começa a se destacar quanto à resistência, com o aparecimento de cepas resistentes a penicilina. Entretanto, em 1961 com o advento da meticilina também é relatado cepas resistente a este fármaco. Até o final da década de 80 as cepas resistentes a meticilina ganham notoriedade em virtude dos graves surtos de infecções hospitalares, principalmente nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Com a ascensão de cepas MRSA, as opções terapêuticas se restringiram ao uso dos antibióticos da classe do glicopeptídeos, como a vancomicina e teicoplanina (MORENO, 2006; SANTOS, 2007).

Em 1997 no Japão é descrito a primeira cepa MRSA resistente à vancomicina, em seguida em 2000 foi identificado no Brasil outro isolado e em 2002 no EUA é identificado o primeiro isolado clínico de VRSA. A resistência aos antibióticos pelo microrganismo *S. aureus* está relacionada com as mutações genéticas ou pela obtenção de genes resistentes. Quando a resistência é por mutações genéticas, geralmente a mutação altera o sítio de ligação do antibiótico e impede de agir na bactéria. Em contrapartida, quando é pela aquisição de genes, estes inativam ou destroem o fármaco, normalmente os plasmídeos e os transposons realizam esta função (BERNARD, 2004; DE LIMA, 2005).

Atualmente, as opções terapêuticas para as infecções causadas por *S. aureus* são limitadas, ocorrendo na prática clínica até mesmo a associação de mais de um fármaco para o tratamento (TIAGO, 2017). Esta problemática impulsiona a comunidade científica para o desenvolvimento de novos medicamentos eficientes para o tratamento das infecções causadas por este patógeno.

### 2.3 ENTEROCOCCUS FAECALIS

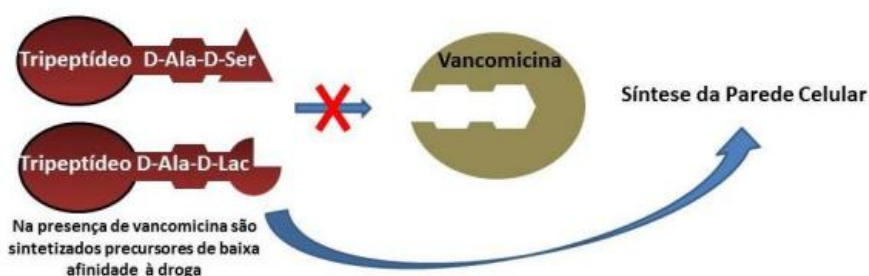
*E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva, pertence a família *Enterococcaceae*, ao gênero *Enterococcus* e engloba diversas espécies, como *E. faecium*, *E. caseliflavus*, *E. hirae*, *E. gallinaroum*, *E. avium* e entre outras. Esta bactéria pertence ao grupo de bactérias do ácido láctico, de anaerobiose facultativa e catalase negativa com capacidade de sobrevivência em ambientes desfavoráveis com temperaturas entre 5 a 65°C, pH entre 4.6 a 9 e altas concentrações de sais (KRAWCZYK, 2021; FISHER, 2009). É encontrada na microflora de animais e humanos, principalmente no trato gastrointestinal e urinário, porém quando encontrada em outras áreas do organismo, é apontada como um patógeno oportunista. Além disso, também é encontrada em alimentos, principalmente de origem animal e a contaminação em alimentos é dada pela resistência desta bactéria a altas temperaturas (CAUWERTS, 2007; SEGLEY, 2004).

As infecções causadas pela *E. faecalis* podem ser advindas da flora microbiana do paciente, no qual a contaminação ocorre por meio da transferência desse microrganismo de indivíduo para indivíduo ou também pela ingestão de alimentos ou água contaminada. *E. faecalis* também é considerado um problema de saúde pública, em virtude da resistência aos antimicrobianos consumidos de forma excessiva e sem necessidade, que contribuem para a evolução e falta de controle das infecções (WERNER, 2008; VIGNAROLI, 2011).

Quanto à resistência aos antibióticos, apresenta a forma intrínseca e adquirida para vários fármacos, o que tem contribuído para o aumento das infecções. A resistência da forma intrínseca é dada para a classe dos beta-lactâmicos e cefalosporinas. Enquanto, para a forma adquirida apresentam resistência aos aminoglicosídeos e glicopeptídeos. Em virtude da resistência a maioria dos antibióticos disponíveis e sobrevivência nas superfícies de objetos, é comum encontrar esse microrganismo disseminado em âmbito hospitalar (HOLLENBECK, 2012; ARIAS; MURRAY, 2012). A aquisição de resistência por transferência horizontal permitiu que esse microrganismo adquirisse características que elevasse a sua virulência, sendo estas a toxina citolisina, gelatinase, proteína de superfície e entre outras. A disseminação destas características para outras espécies ocorre por meio da troca de plasmídeo conduzida por feromônio, plasmídeo dependente de contato e troca de transposon (MCBRIDE, 2007).

*E. faecalis* apresenta resistência a penicilina, na qual a Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* é cerca de 10 a 100 vezes maior que na maioria dos *Streptococcus*, em virtude da proteína ligadora de penicilina (PBP, do inglês *penicilin binding protein*) apresentar baixa afinidade a esse antibiótico. O uso de vancomicina em combate aos microrganismos Gram-positivos contribui para o surgimento de cepas VRE. O glicopeptídeo avoparcina utilizado na pecuária também contribui para essa resistência. Quando a vancomicina é empregada no tratamento, as bactérias por mecanismo de reprogramação e modificação da estrutura desenvolvem a resistência a este fármaco. As estirpes VRE modificam os precursores de peptidoglicano da parede celular, essa modificação acontece pela substituição do dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala, por D-Alanina para D-Lactato, denominado alto nível de resistência, ou pela D-Serina, definido como baixo nível de resistência. Na Figura 4, é demonstrado este mecanismo de resistência (MERLO, 2013; FIGUEIREDO, 2017).

**Figura 4:** Mecanismo de resistência à vancomicina.



**Fonte:** Adaptado Merlo (2013).

Como este microrganismo é resistente a vários antibióticos e sua contaminação engloba animais e humanos, novas estratégias para o desenvolvimento de medicamentos capazes de tratar as infecções ocasionadas por *E. faecalis* tornam-se necessárias, frente ao amplo mecanismo de resistência que ela possui e pelo perigo eminente que causa.

## 2.4 GLICOPEPTÍDEOS

Os glicopeptídeos são uma classe de antibióticos de peptídeos glicosilados ou policíclicos não ribossômicos, que integra os antimicrobianos como a vancomicina, teicoplanina e os derivados lipoglicopeptídeos semissintéticos como a telavancina, dalbavancina e oritavancina. Na estrutura destes fármacos há um núcleo de aglicona,

composto por sete aminoácidos formando uma estrutura trimacrocíclica ou tetramacrocíclica, que é sintetizada pelos peptídeos não ribossômicos. Também a presença de açúcar ligada ao núcleo do heptapeptídeo, que para cada antibiótico varia número, posição e estrutura. A função destes fármacos é inibir a síntese da parede celular bacteriana, ao ligarem-se como substrato (precursores da parede celular) em sentido contrário as enzimas do sítio alvo. Essa ligação ocorre no terminal D-Ala-D-Ala no monômero de lipídio II. O espectro antibacteriano destes fármacos é limitado apenas para as bactérias Gram-positivas em virtude das propriedades físico-químicas da estrutura destes antimicrobianos impedem que eles transitem pela membrana externa das Gram-negativas, o que bloqueia o acesso ao lipídio II (MUNCH, 2015; ZENG, 2016).

#### 2.4.1 Vancomicina

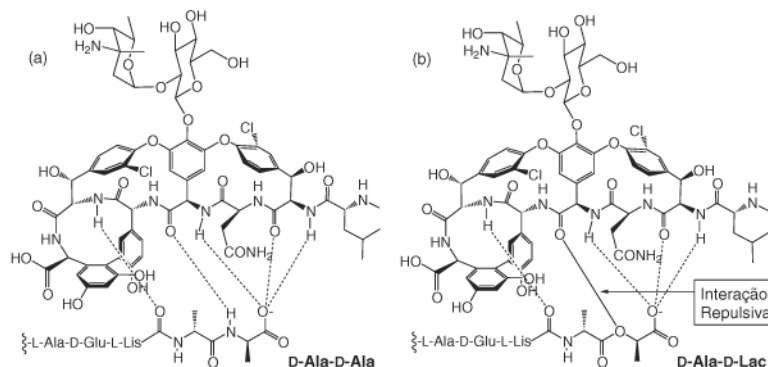
Em 1956, o grupo Eli Lilly isolou do fungo *Amycolatopsis orientalis* (anteriormente conhecida como *Streptomyces orientalis*) o antibiótico vancomicina. Em virtude do bom desempenho frente às estirpes de MRSA a vancomicina logo ganhou destaque entre os antimicrobianos testados na época. O efeito bactericida ocorre na maioria das bactérias Gram-positivas, porém o tamanho molecular deste antibiótico o torna incapaz de interagir com bactérias Gram-negativas, portanto não apresenta atividade antimicrobiana para esses microrganismos (SILVEIRA, 2006; GOODMAN; GILMAN, 2006).

Em 1958, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou sua aplicação em humanos, como uma alternativa no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus* resistentes à penicilina. Após o conhecimento de sua toxicidade, seu uso caiu e foi substituída por fármacos menos tóxicos e de mesma eficiência. No entanto, sua aplicação foi direcionada apenas para casos de pacientes alérgicos a  $\beta$ -lactâmicos ou a bactérias resistentes aos outros medicamentos (SILVEIRA, 2006; MACEDO, 2017; RYBAK, 2006).

O mecanismo de ação é dado no metabolismo das bactérias enquanto constroem a parede celular. Neste caso, a vancomicina liga-se no terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo e bloqueia a etapa de transpeptidação. Na Figura 5a) é ilustrada esta ligação com o terminal D-Ala-D-Ala A resistência à vancomicina é ocasionada pela modificação genética nos microrganismos em que estes passam a

sintetizar o depsipetídeo D-Alanil-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) que induz uma interação repulsiva na ligação de hidrogênio, como mostrado na Figura 5b). Como consequência, a interação da vancomicina com o peptidoglicano decresce a um valor superior a 1000 vezes (CHIOSIS, BONECA, 2001; GOODMAN; GILMAN, 2006).

**Figura 5:** a) Ligação da vancomicina com o terminal D-Ala-D-Ala. b) Interação repulsiva da vancomicina com o terminal D-Ala-D-Lac.



Fonte: Silveira, (2006).

Embora, na década de 80 à vancomicina tenha apresentado um bom desempenho quanto ao tratamento desses microrganismos. No ano de 1988, na Inglaterra surgiu o primeiro isolado de *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE, do inglês vancomycin resistant *Enterococcus*) e no Brasil, em 1998 na cidade de São Paulo. Em contrapartida, isolados de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA, do inglês vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) apareceu nos Estados Unidos da América (EUA) em 2002 (ZANELLA, 2003; MIMICA, BEREZIN; 2006).

Estudos descreveram fenótipos de resistência à vancomicina para o gênero *Enterococcus*, sendo o fenótipo *VanA* resistente a teicoplanina e vancomicina. Enquanto, o fenótipo *VanB* produz o baixo nível de resistência, mas são resistentes à vancomicina e sensíveis a teicoplanina. O fenótipo *VanC* é diferente dos outros fenótipos quanto à modificação do terminal, visto que este tipo possui o terminal D-Alanil-D-Serina (D-Ala-D-Ser) (SILVEIRA, 2006; GOODMAN; GILMAN, 2006). Assim, com a ascensão das infecções causadas pelas VRE e VRSA, cresceu-se a demanda da comunidade científica pelo desenvolvimento de novos antimicrobianos eficientes para o tratamento dessas doenças.

## 2.5 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem ganhado notoriedade no tratamento de doenças por proporcionar o desenvolvimento de nanomateriais com propriedades excepcionais e características distintas, os quais possibilitam o aprimoramento de fármacos. Os nanomateriais, por definição, são materiais com dimensão entre 1 a 100 nm, que em virtude de seu tamanho, morfologia e composição, proporcionam propriedades particulares quando comparado ao material em tamanho macrométrico (OLIVEIRA, 2016; MARTINS, 2017).

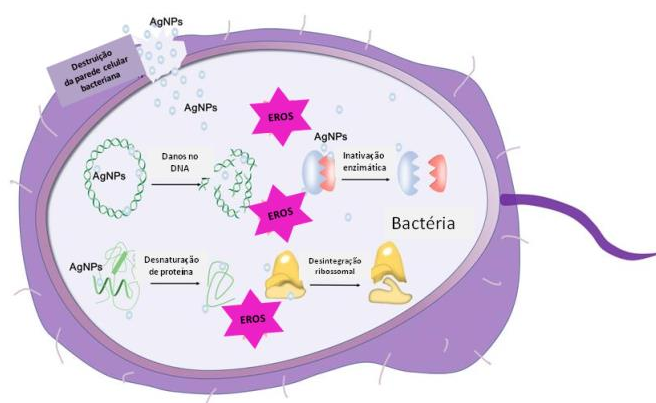
Os métodos de síntese mais empregados para produzir estes nanomateriais são o bottom-up (de baixo para cima) e o top-down (de cima para baixo). A abordagem bottom-up engloba processos químicos e biológicos, quanto aos métodos químicos estão à eletroquímica, sol-gel e redução química, que produzem nanopartículas de formato esférico e são procedimentos de baixo custo. Neste método, é necessário um precursor metálico, um agente redutor e um agente estabilizante. Em contrapartida, os métodos biológicos englobam compostos de origem biológica como fungos e bactérias ou extratos naturais, produzem alto rendimento, solubilidade e estabilidade e atualmente, é um dos métodos mais promissores (SILVA, 2017; XU *et al.*, 2020).

Enquanto a top-down sintetiza por processos físicos, como ablação a laser, pulverização catódica, ultrasonicação e entre outros, do estado sólido ou aerossol para a escala nanométrica. Nestes métodos físicos, a produção é em grande escala e dependendo da técnica empregada as nanopartículas são de alta pureza. Esses procedimentos necessitam de grande quantidade de energia, equipamentos caros e condições de pressão e temperatura elevadas. Assim, o método abordado de síntese é de extrema importância para as aplicações biológicas, uma vez que as propriedades como tamanho e estabilidade afetaram diretamente no resultado da atividade biológica e toxicidade (YAGOOB, 2020; ZHANG, 2016).

Dentre as aplicações no âmbito microbiológico, as nanopartículas metálicas que mais se destacam são as nanopartículas de prata (AgNPs), que apresentam propriedades bactericidas, que possibilitam a interação com a superfície das bactérias. Porém, a eficácia desta propriedade está relacionada ao tamanho, forma e ao que está ancorado na superfície, o que contribui para a necessidade de controlar as características físico-químicas durante a síntese desses nanomateriais (WEI, 2015; FRANCI, 2015).

As AgNPs são citotóxicas aos microrganismos quando interagem com a superfície da membrana celular, destruindo a parede, desestabilizando os ribossomos, induzindo a formação das ERO, para no fim provocar a morte, como mostrado na Figura 6. A interação das AgNPs com as bactérias ocorre por atração eletrostática, visto que AgNPs com carga positiva atraem bactérias com carga negativa, o que facilita a penetração de íons de prata na membrana bacteriana. Quando isto ocorre, os radicais livres são formados e a respiração celular é prejudicada, o que possibilita a atividade bactericida deste nanomaterial (DÚRAN, 2015; FRANCI, 2015).

**Figura 6:** Representação ilustrativa do mecanismo de ação das AgNPs na bactéria.



**Fonte:** Adaptado de Xu *et al.* (2020).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bionanotecnologia, Laboratório de Nanossensores e Central Analítica Multiusuários do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento 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.

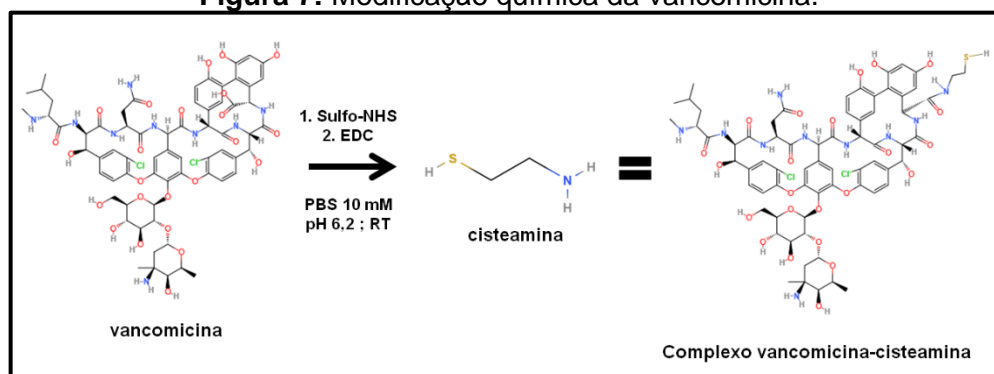
#### 3.1 DILUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA VANCOMICINA

Primeiramente, 2 mg do antibiótico vancomicina (Sigma Aldrich, PHR1732) foi pesada em uma balança analítica e diluída em água ultrapura para uma concentração final de 8 mg/mL, seguindo a normativa especificada pela *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Em seguida, a solução solubilizada do fármaco foi caracterizada pela Espectroscopia UV-Vísivel a fim de verificar a integridade do antibiótico e suas respectivas bandas características.

Uma diluição seriada da vancomicina foi realizada a partir da concentração inicial de 500 µg/mL e as amostras foram caracterizadas pela Espectroscopia UV-Vísivel, a qual por meio da relação entre absorção e concentração foi possível obter a equação da regressão linear do fármaco.

#### 3.2 FORMAÇÃO DO COMPLEXO VANCOMICINA-CISTEAMINA

A formação do complexo vancomicina-cisteamina é dada pelo mecanismo de reação da química carbodiimida, na qual é realizada a modificação da vancomicina, ativando um grupo de ácido carboxílico do antibiótico por meio da adição de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Quando o ácido carboxílico da vancomicina é ativado pelo precursor de reação, é favorecida a ligação entre o terminal carboxílico do fármaco com o grupo terminal amino da cisteamina, proporciona a formação de uma ligação amida entre o fármaco e o ligante, assim caracterizando a formação do complexo, como ilustrado na Figura 7.

**Figura 7: Modificação química da vancomicina.**

Fonte: A autora.

A razão molar de 1 vancomicina (27,60 mM) : 25 Sulfo-NHS : 10 EDC : 2 cisteamina (8,04 mM) foi utilizada para a formação do complexo vancomicina-cisteamina. Primeiramente, para o mecanismo de reação ocorrer, um volume de 260  $\mu\text{L}$  de vancomicina foi adicionado em um frasco âmbar, em seguida da adição de 990  $\mu\text{L}$  de Sulfo-NHS e 900  $\mu\text{L}$  de EDC diluídos em solução tampão PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) a 10 mM. O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 6,2 e a solução permaneceu por 30 min sob agitação constante.

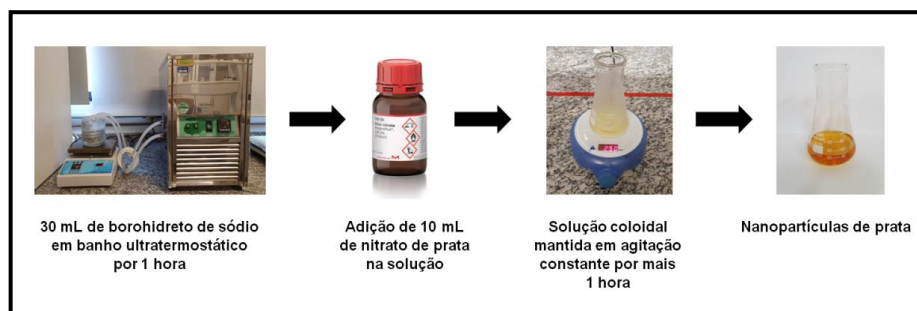
Decorrido o período de incubação, um volume de 1785  $\mu\text{L}$  de cisteamina foi adicionado, seguida do aumento do pH para 7,0 com a adição de uma solução de NaOH (Hidróxido de sódio) a 0,5 M e novamente a solução permaneceu sob agitação por mais 2 h. Após a formação do complexo, a amostra foi colocada em diálise em uma membrana de porosidade 0,5 kDa (Repligen 131090T) para a purificação da solução, devido a produção de subprodutos de reação. Após a diálise, o complexo vancomicina-cisteamina foi quantificado e caracterizado pela Espectroscopia UV-Visível e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

### 3.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata foram sintetizadas com base na metodologia descrita por Mulfinger *et. al.* (2007), seguida de pequenas modificações. Primeiramente, as vidrarias utilizadas para a síntese foram lavadas previamente com água régia, na proporção volumétrica de 1:3 de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e ácido clorídrico (HCl) para remoção de íons contaminantes. Posteriormente, uma solução de 30 mL de borohidreto de sódio foi resfriada por 1 h em um banho ultratermostático. Em seguida, um volume de 10 mL de nitrato de prata foi adicionado na solução em agitação

constante. Decorrido o tempo de formação das nanopartículas, a solução coloidal foi colocada em temperatura ambiente, a qual permaneceu por mais 1 h de agitação constante (MULFINGER, 2007). Na Figura 8, é mostrado o processo de síntese. As nanopartículas de prata sintetizadas foram caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia UV-Visível e Espalhamento Dinâmico da Luz.

**Figura 8:** Síntese de nanopartículas de prata por redução química.



**Fonte:** A autora.

### 3.4 PRODUÇÃO DO NANOANTIBIÓTICO AG@VANCOMICINA

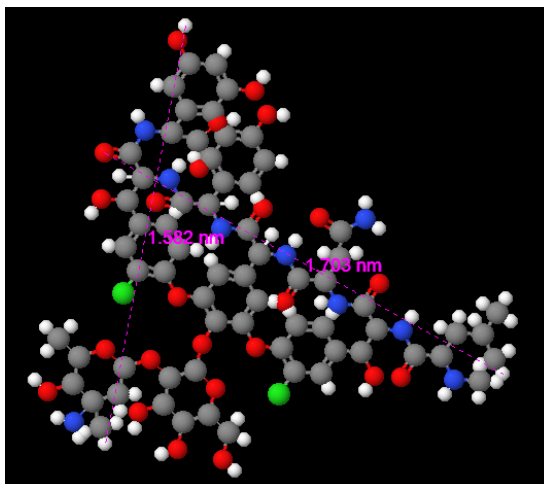
A formação do complexo vancomicina-cisteamina, permite que na estrutura do antibiótico possua uma molécula de enxofre, a qual favorece a ligação do fármaco a superfície da nanopartícula de prata. Assim, para a produção do nanoantibiótico, primeiramente foi desenhada em modelo 3D a molécula de vancomicina e estimado o valor da área por meio do site MolView.org. Na Figura 9, é mostrado o desenho da molécula e as distâncias utilizadas no cálculo teórico de área.

Visto que a vancomicina apresentou uma distribuição geométrica planar, o cálculo teórico de área foi mensurado como lado versus lado, obtendo a área de 2,69 nm<sup>2</sup>. Em seguida, foi utilizada a Equação 1 para determinar a quantidade de vancomicina necessária para funcionalizar a superfície do nanomaterial.

$$\text{Quantidade de vancomicina por AgNPs} = \frac{\pi d^2}{\text{Área do fármaco}} \quad [1]$$

Sendo  $d$  o diâmetro hidrodinâmico das AgNPs e *área do fármaco* corresponde ao valor obtido de 2,69 nm<sup>2</sup>.

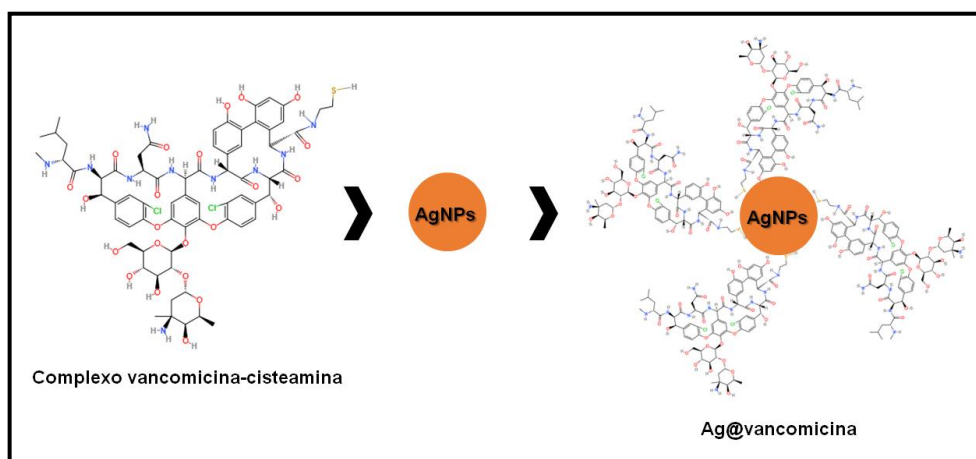
**Figura 9:** Desenho em modelo 3D da molécula de vancomicina.



**Fonte:** A autora.

Após a determinação da quantidade de vancomicina para o recobrimento total da superfície da AgNPs, um volume de 28  $\mu\text{L}$  do complexo vancomicina-cisteamina foi adicionado a um volume de 1 mL das AgNPs na concentração de  $1,9 \times 10^{11}$  partículas/mL e a solução foi incubada em agitação constante por 24 h para a formação do nanoantibiótico, como ilustrado na Figura 10. Após a incubação, o nanoantibiótico Ag@vancomicina foi caracterizado pelas técnicas de Espectroscopia UV-Vísivel, Espalhamento Dinâmico da Luz e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.

**Figura 10:** Síntese do nanoantibiótico Ag@vancomicina.



**Fonte:** A autora.

### 3.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 3.5.1 *Espectroscopia UV-Visível*

A análise de Espectroscopia UV-Visível foi realizada em um Espectrofotômetro DeNovixDS – 11, utilizando um volume de 2  $\mu\text{L}$  depositado no pedestal do equipamento e os espectros detectados na região de 190-840 nm foram coletados e plotados no software OriginPro versão 8.5.1.

#### 3.5.2 *Espalhamento Dinâmico da Luz*

A análise de Espalhamento Dinâmico da Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering* – DLS) possibilita caracterizar o diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão e o Potencial Zeta das partículas. Nesta ocasião, o equipamento ZetaSizer nano – SZ90 da Malvern foi utilizado primeiramente no modo “Size”, em que um volume de 200  $\mu\text{L}$  da amostra foi adicionado em uma cubeta de poliestireno (modelo ZEN0118) para análise de tamanho e polidispersão. Em seguida, no modo “Zeta” um volume de 1 mL da amostra foi adicionado em uma cubeta capilar com os eletrodos da Malvern (modelo DTS1070) para análise da estabilidade das partículas. Os resultados em ambas as caracterizações foram adquiridos a partir de uma média de três análises e plotados no software OriginPro versão 8.5.1.

#### 3.5.3 *Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier*

A análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier foi realizada utilizando o Espectrofotômetro FT-IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) localizado na Central Analítica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap. As amostras foram depositadas na superfície do cristal de seleneto de zinco (ZnSe) com diamante do acessório UATR para a aquisição dos espectros utilizando os parâmetros no modo absorbância, com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras no intervalo de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 900  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.6 CITOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O teste de citotoxicidade das AgNPs foi realizado em triplicata na linhagem celular L929 (Fibroblastos de Camundongo) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) pelo método de exclusão do Azul de Tripán (Sigma Aldrich, T8154). Primeiramente, as células do tipo Fibroblastos L929 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (16000-044, Life Technologies) sob as condições de 95% de umidade, 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Decorrida da adesão celular por 24 h, o meio foi substituído pelas AgNPs diluídas em meio de cultura nas seguintes concentrações 2,4x10<sup>10</sup>; 4,8x10<sup>10</sup>; 9,5x10<sup>10</sup>; 1,9x10<sup>11</sup> e 3,8x10<sup>11</sup> partículas/mL. Após a incubação por 18 h, as AgNPs foram removidas dos poços e foi adicionado 50 µL de Azul de Tripán, sendo incubado por 5 min. Posteriormente, o Azul de Tripán foi removido e os poços da placa foram lavadas duas vezes utilizando 150 µL de PBS. O microscópio invertido NIB-100 (Bel Equipamentos Analíticos) com o auxílio do Programa Future WinJoe versão 1.0.7.9 foi utilizado para a coleta de 5 imagens de cada poço tratado com as AgNPs e a contagem das células foi realizada utilizando o programa ImageJ versão 1.48 e a viabilidade celular foi calculada pela Equação 2.

$$Viabilidade\ celular(\%) = \frac{Número\ de\ células\ translúcidas}{Número\ total\ de\ células} \times 100 \quad [2]$$

### 3.7 AQUISIÇÃO DOS MICRORGANISMOS E ACONDICIONAMENTO DAS CEPAS

As cepas de *S. aureus* ATCC 29213 e as clínicas (SA-1; SA-2; SA-3) foram doadas pelo Laboratório Oswaldo Cruz e as cepas de *E. faecalis* ATCC 29212 e as clínicas (EF-1; EF-2; EF-3) foram doadas pelo Hospital de Clínicas Sul, ambos de São José dos Campos. O perfil de susceptibilidade das cepas foi cedido pelos Laboratórios, como mostrado na Tabela 1 e 2, o qual corrobora com as normas definidas pelo Comitê Brasileiro de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (*BrCast - Brazilian Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Na Tabela 1, é apresentado o teste de susceptibilidade das cepas de *S.aureus*, na qual se observa para todas as cepas apresenta um perfil de sensibilidade à vancomicina.

**Tabela 1:** Perfil de susceptibilidade das cepas de *S. aureus*.

Antibiótico	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>							
	ATCC 29213		SA-1		SA-2		SA-3	
	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR
Ciprofloxacina	$\leq 0,5$	I	$\leq 0,5$	I	$>2$	R	$\leq 0,5$	I
Cloranfenicol	8	S	$>16$	R	$>16$	R	8	S
Daptomicina	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S
Eritromicina	$\leq 0,25$	S	$>4$	R	$>4$	R	$>4$	R
Linezolid	2	S	$\leq 1$	S	2	S	2	S
Oxacilina	$\leq 0,25$	S	$>2$	R	$>2$	R	$\leq 0,25$	S
Teicoplanina	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S	$\leq 1$	S	4	R
Tigeciclina	$\leq 0,12$	S	0,25	S	$\leq 0,12$	S	0,25	S
Trimetoprim-Sulfametoxazol	$\leq 0,5/9,5$	S	$\leq 0,5/9,5$	S	$\leq 0,5/9,5$	S	$\leq 0,5/9,5$	S
Vancomicina	2	S	1	S	1	S	2	S

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

**Fonte:** A autora.

Na Tabela 2, é demonstrado também o teste de susceptibilidade das cepas de *E. faecalis*, a qual apresenta um perfil sensível a vancomicina (TABELA-PONTOSDE-CORTE-CLINICOS-BRCAS-T-V1-MAR-2021).

O cultivo e reativação das cepas foram realizados em caldo BHI (Brain Heart Infusion, KASVI®) por 24 h a 35°C. Em seguida, um repique em meio seletivo foi realizado para o cultivo e condicionamento da cepa. Decorrido a formação do inóculo, os microrganismos foram suspensos em caldo BHI com 20% de glicerol (LGC Biotecnologia) e armazenados no -80°C.

**Tabela 2:** Perfil de susceptibilidade das cepas de *E. faecalis*.

Antibiótico	Cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>							
	ATCC 29212		EF-1		EF-2		EF-3	
	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR	CIM ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	SIR
Ampicilina	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S	$\leq 2$	S
Eritromicina	2	I	4	I	2	I	$>4$	R
Linezolid	2	S	2	S	2	S	$\leq 1$	S
Teicoplanina	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 0,5$	S	$\leq 1$	S
Tigeciclina	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S	$\leq 0,12$	S
Nitrofurantoína	$\leq 16$	S	$\leq 16$	S	$\leq 16$	S	32	S
Vancomicina	2	S	2	S	2	S	1	S

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

**Fonte:** A autora.

### 3.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como uma técnica que determina a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano. Assim, para este teste de susceptibilidade foi utilizado o método de microdiluição em caldo seguindo a norma M7-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Inicialmente, as cepas planctônicas de *S. aureus* e *E. faecalis* foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 35°C por 24 h. Em seguida, um inóculo de cada cepa foi preparado utilizando as colônias bacterianas e solução fisiológica estéril (0,9% de NaCl), e padronizado pela escala 0,5 Mac Farland utilizando o turbidímetro calibrado *Densichek* (Biomérieux®). Na microplaca de 96 poços foi adicionado em todos os poços um volume de 100 µL de meio de cultura Mueller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia). Nos grupos tratados foram adicionados 100 µL do nanofármaco na concentração final de 2 µg/mL e uma diluição seriada foi realizada até a última linha da placa de 96 poços. O grupo controle negativo e outro grupo branco foram realizados para o controle de contaminação. Após adição do nanofármaco na microplaca, 100 µL do inóculo padronizado foi adicionado e a placa foi incubada por 18 h a 35°C. Decorrido este período de tratamento foi realizada a análise visual de turbidez e análise de densidade óptica (OD<sub>600</sub>) no Espectrofotômetro *Synergy HTX Multi-Detection Microplate Reader* (BioTek Instruments, USA), do Laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap.

### 3.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como uma técnica em que se determina a menor concentração de fármaco capaz de extinguir por completo o microrganismo. Dessa maneira, após a determinação da CIM, a diluição que não demonstrou turvação do meio foi semeada em ágar BHI pelo método da gota utilizando um volume de 10 µL da diluição da microplaca sendo incubada por 24 h a 35°C para o crescimento microbiano. A CBM foi determinada avaliando visualmente o crescimento bacteriano em placa, sendo realizado em duplicata.

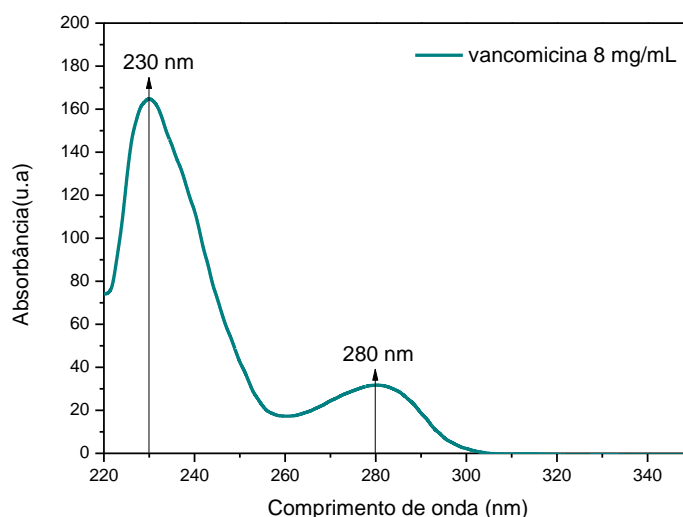
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão abordados os resultados deste estudo, como a caracterização do antibiótico, sua modificação química, a síntese de AgNPs e do nanoantibiótico Ag@vancomicina, bem como a Concentração Inibitória Mínima e Concentrações Bactericida Mínima em cepas de *S. aureus* e *E. faecalis*.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA VANCOMICINA

A vancomicina na concentração de 8 mg/mL foi caracterizada pela Espectroscopia UV-Vísivel, na qual foi possível observar a integridade do fármaco pela presença das bandas características em 230 e 280 nm, como mostrado na Figura 11. A banda de 280 nm é relatada como a banda de absorção mais importante do fármaco em solução aquosa, a qual apresenta caráter ácido quando diluído em água, corroborando com o espectro encontrado (Figura 11). Entretanto, quando há mudança no pH para um caráter básico, ocorre um deslocamento para 305 nm, indicando a degradação do antibiótico (O'NEIL, 2006; TARIQ, 2015).

**Figura 11:** Espectro de absorção da vancomicina.

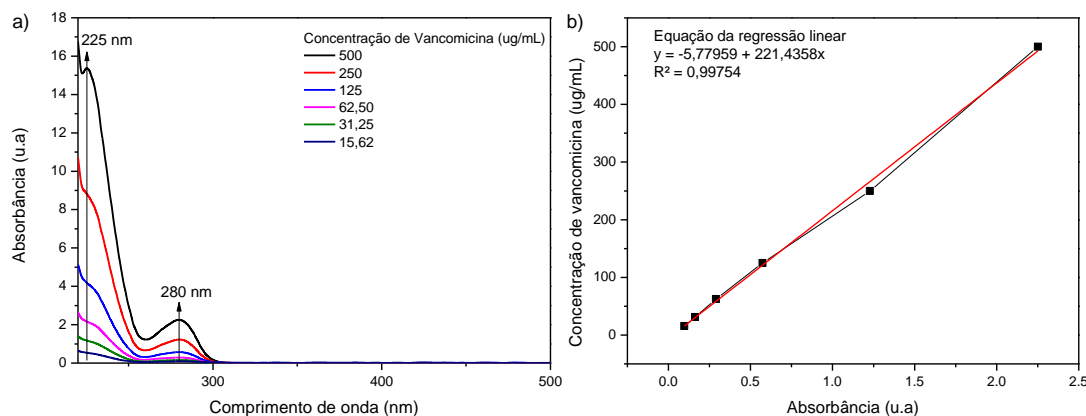


**Fonte:** A autora.

A diluição seriada do fármaco a partir da concentração de 500  $\mu\text{L/mL}$  (Figura 12a) possibilitou a obtenção da equação da regressão linear (Figura 12b), a qual foi

utilizada para determinar a concentração do complexo vancomicina-cisteamina para as aplicações nos testes de susceptibilidade.

**Figura 12:** Diluição do fármaco vancomicina; a) Espectro UV-Visível da diluição seriada. b) Equação da regressão linear do fármaco e o fator de ajuste  $R^2$ .

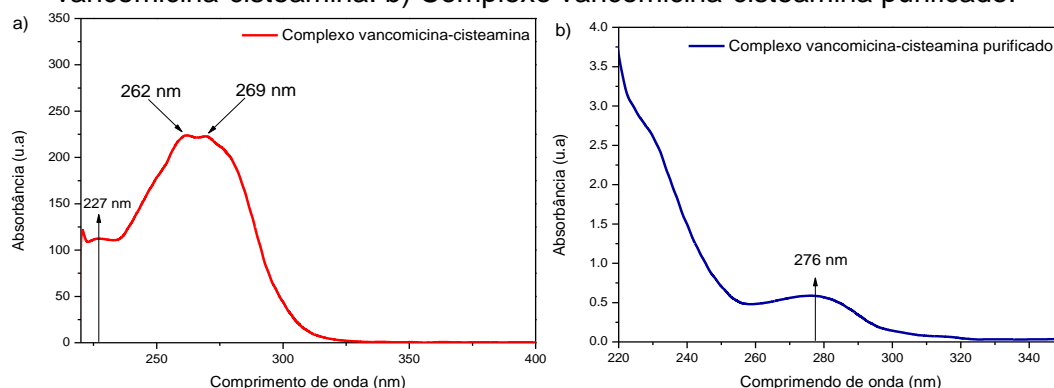


**Fonte:** A autora.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO VANCOMICINA-CISTEAMINA

O complexo vancomicina-cisteamina foi formado pela modificação da vancomicina via química carbodiimida. Neste processo houve a presença de subprodutos de reação, fazendo-se necessária a purificação da solução pelo método de diálise, o qual durou nove dias havendo troca da água do reservatório a cada 24 horas. Na Figura 13a, é observado o espectro UV-Vísível do complexo vancomicina-cisteamina após sua formação, em que se observam as bandas de 227 nm, 262 nm e 269 nm, indicando respectivamente a presença da vancomicina, Sulfo-NHS e EDC em sua composição. Em contrapartida, na Figura 13b, é apresentado o espectro UV-Vísível do complexo após a diálise, nota-se o aparecimento da banda 276 nm, sugerindo um deslocamento 3 nm da banda característica de 280 nm devido a modificação do antibiótico.

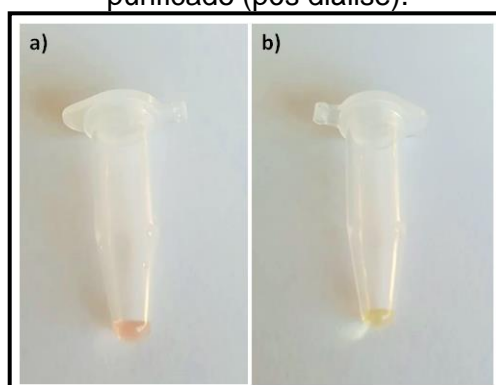
**Figura 13:** Espectro de absorção do complexo vancomicina-cisteamina. a) Complexo vancomicina-cisteamina. b) Complexo vancomicina-cisteamina purificado.



**Fonte:** A autora.

Em virtude da presença dos subprodutos a purificação do complexo vancomicina-cisteamina é essencial principalmente para a funcionalização com as AgNPs, visto que estes reagentes quando em contato aglomeram as nanopartículas. Na Figura 14 é mostrado um teste de estabilidade das AgNPs, em que ao ter contato com a solução não purificada, há mudança de cor, do amarelo para o rosa indicando a desestabilização e aglomeração das AgNPs (Figura 14a). Na Figura 14b é apresentado teste das AgNPs com o complexo após a purificação por diálise, na qual a cor amarela das AgNPs é mantida, indicando que o complexo vancomicina-cisteamina foi purificado.

**Figura 14:** Teste de estabilidade da AgNPs na adição do complexo. a) AgNPs e complexo vancomicina-cisteamina (pré diálise). b) AgNPs e complexo vancomicina-cisteamina purificado (pós diálise).



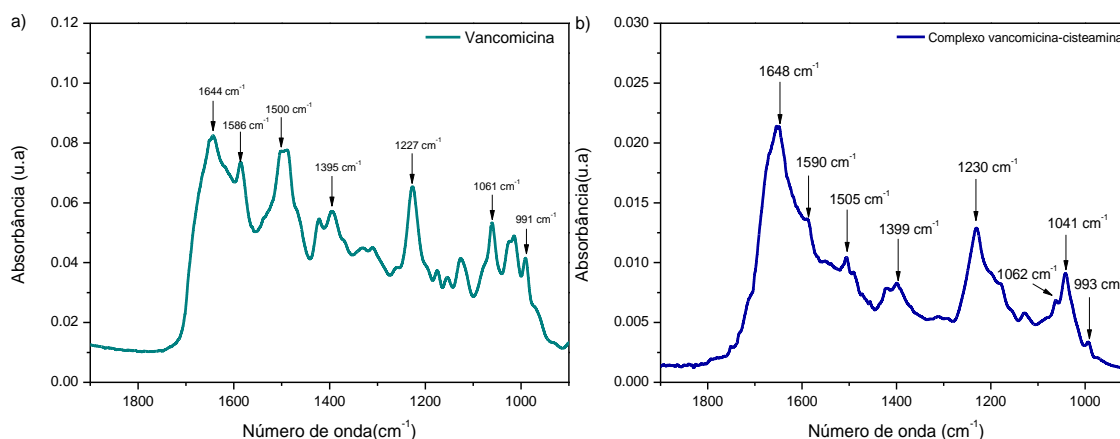
**Fonte:** A autora.

Na Figura 15a, é apresentado o espectro de FT-IR da vancomicina, na qual se observa as bandas vibracionais características do fármaco, sendo elas:  $1644\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular na ligação C=O),  $1586\text{ cm}^{-1}$  (estiramento da ligação C-N),  $1500$

$\text{cm}^{-1}$  (vibrações de flexão do grupo N-H de amidas e aminas),  $1395 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento simétrico do grupo  $-\text{COO}$ ),  $1227 \text{ cm}^{-1}$  (deformação axial na ligação C-N),  $1061 \text{ cm}^{-1}$  (deformação  $-\text{CN}$  em grupo de aminas e amidas) e  $991 \text{ cm}^{-1}$  (vibrações de flexão do grupo  $-\text{COOH}$ ) (COATES, 2006; KAUR, GOYAL, KUMAR, 2018; WAN, 2018; CASTILHO, HEWITT; RANIERO, 2017). As bandas vibracionais encontradas nesta análise apresentaram-se análogas as descritas por Kaur e coautores (2018), indicando a integridade do antibiótico (KAUR; GOYAL; KUMAR, 2018).

O complexo vancomicina-cisteamina apresentou bandas de absorção semelhantes ao do antibiótico puro, em que há a presença das bandas vibracionais de  $1648 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1590 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1505 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1399 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1230 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1062 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1041 \text{ cm}^{-1}$  e  $993 \text{ cm}^{-1}$ . Nota-se que as bandas vibracionais características do fármaco deslocaram para esquerda com a modificação, como mostrado na Figura 15b. No espectro houve o aparecimento da banda de  $1041 \text{ cm}^{-1}$ . Segundo Castilho e coautores (2017), a região de  $1020$  a  $1250 \text{ cm}^{-1}$  está relacionada à formação da ligação amida, apresentando a deformação axial na ligação C-N (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). Além das bandas de  $993 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1505 \text{ cm}^{-1}$  e  $1399 \text{ cm}^{-1}$  referentes à ligação de ácido carboxílico terem perdido intensidade, visto que é nesta ligação que a química carbodiimida reage. Assim, estas mudanças observadas no espectro do complexo confirmam a modificação da vancomicina e a formação da ligação C-N (amida) em sua estrutura.

**Figura 15:** Espectro de FT-IR. a) vancomicina. b) Complexo vancomicina-cisteamina.



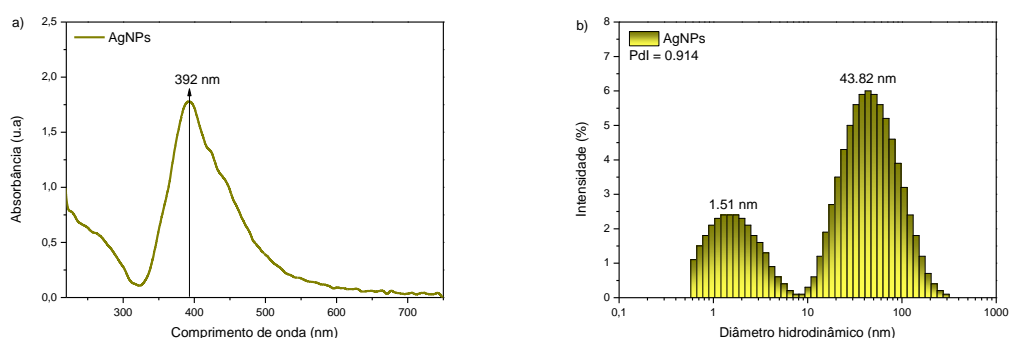
Fonte: A autora.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPS E DA AG@VANCOMICINA

A metodologia de síntese de AgNPs pela redução química utilizando o borohidreto de sódio produz nanopartículas de diâmetro menores e espectro de absorção entre 380 a 400 nm. Neste procedimento, a relação do borohidreto de sódio ao nitrato de prata é de 2:1, visto que é necessário este excesso do agente redutor, para que além de reduzir os íons de prata, ele também estabilize as nanopartículas formadas. Esta redução e estabilização acontecem durante a síntese, em que os íons do borohidreto de sódio são adsorvidos na superfície das nanopartículas, as cargas presentes no borohidreto de sódio formam uma repulsão eletrostática entre as AgNPs, a qual evita o processo de agregação das nanopartículas (GARCIA, 2011; MELO JÚNIOR, 2012).

Na Figura 16a, é apresentado o espectro de absorção das AgNPs após a síntese, a qual apresenta uma banda de ressonância plasmônica (do inglês, *surface plasmon resonance* – SPR) centrada em 392 nm, corroborando com faixa de espectro de absorção descrita por Garcia (2011) para a síntese com o borohidreto de sódio (GARCIA, 2011). Na Figura 16b, é observado o diâmetro das nanopartículas caracterizadas pelo DLS, nota-se que as AgNPs exibiram uma distribuição bimodal em que há uma população de tamanho de 1,51 nm e uma de 43,82 nm, as AgNPs também apresentaram um índice de polidispersão (Pdl) de 0.914. Em função do processo de amadurecimento de Ostwald, durante o processo de nucleação das partículas alguns núcleos estão se formando enquanto outros já estão formados, assim como consequência após a síntese as AgNPs exibem estas duas populações de tamanho (JESUS *et al.*, 2018).

**Figura 16:** Caracterização das AgNPs. a) Espectro UV-Vísivel. b) DLS.

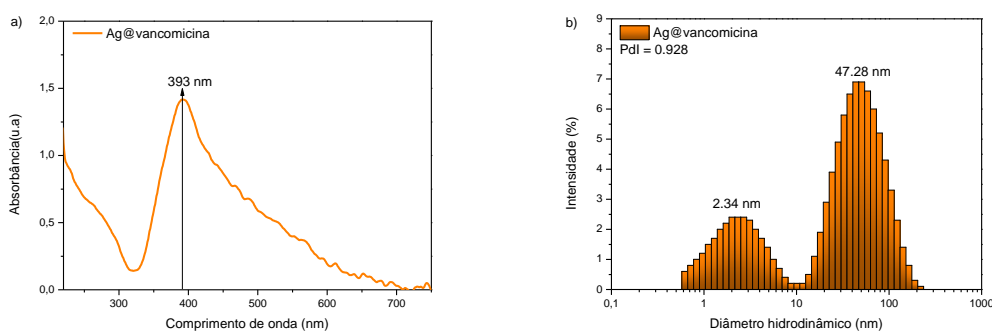


**Fonte:** A autora.

Após a funcionalização entre as AgNPs e o complexo vancomicina-cisteamina formando o nanofármaco, foi realizada a caracterização para observar as mudanças espectrais e diâmetro médio da partícula. Na Figura 17a, é observado um deslocamento de 1 nm na banda de SPR do nanofármaco, o qual pode estar relacionado à resolução do espectro do equipamento de 1,5 nm. Na Figura 17b, é mostrada a caracterização do diâmetro da Ag@vancomicina que apresentou também uma distribuição bimodal com populações de 2,34 nm e 47,28 nm, e um aumento Pdl para 0,928. O aumento observado na população de maior intensidade confirma a efetividade de funcionalização visto que o aumento de aproximadamente 3,46 nm sugere a presença do antibiótico modificado na área superficial das AgNPs, o qual apresentou um diâmetro teórico de aproximadamente 2,85 nm. O valor de deslocamento do diâmetro não é exatamente o mesmo do tamanho do antibiótico, pois o antibiótico pode se ligar na superfície das AgNPs com diferentes conformações.

Kaur e Kumar (2019) reportaram a funcionalização da vancomicina em nanopartículas de prata. As AgNPs sintetizadas neste estudo também foram produzidas pelo método de redução química com o borohidreto de sódio, porém nesta síntese foi adicionado o Polivinilpirrolidona (PVP) para a estabilização dos coloides. O diâmetro hidrodinâmico destas AgNPs eram de aproximadamente 51 nm com um Pdl de 0,779 e apresentavam uma banda de SPR centrada em 431 nm. Em contrapartida, quando foram funcionalizadas com a vancomicina passaram a apresentar um diâmetro de 62 nm, Pdl de 0.650 e houve um deslocamento da banda de SPR para 429 nm. Tanto o aumento de diâmetro e o deslocamento da banda de SPR para a região inferior do espectro de absorção máxima foram observados neste trabalho e corroboraram com os resultados de Kaur e Kumar (2019) (KAUR, KUMAR, 2019).

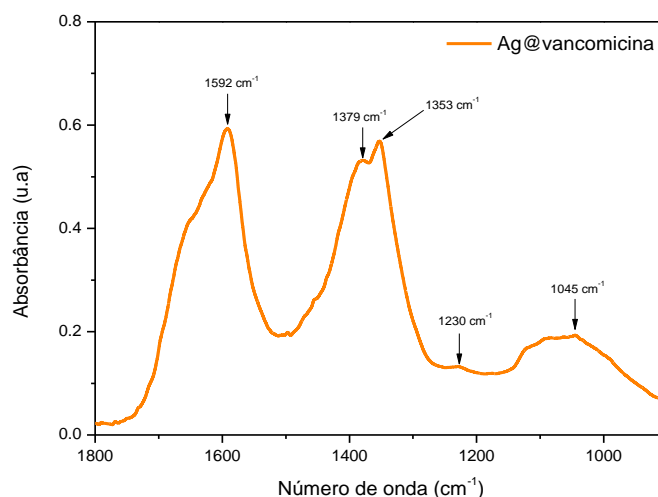
**Figura 17:** Caracterização da Ag@vancomicina. a) Espectro UV-Vísivel. b) DLS.



**Fonte:** A autora.

Na Figura 18, é apresentado o espectro de FT-IR do nanofármaco. Nota-se a presença dos modos vibracionais de  $1592\text{ cm}^{-1}$ ,  $1379\text{ cm}^{-1}$ ,  $1353\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$ . Os modos vibracionais de  $1592\text{ cm}^{-1}$ ,  $1230\text{ cm}^{-1}$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$  apresentam-se deslocados, mas são advindos do complexo vancomicina-cisteamina (Figura 15b). Enquanto, os modos de  $1379\text{ cm}^{-1}$  e  $1353\text{ cm}^{-1}$  apareceram com maior intensidade em virtude das vibrações de ligação O-H e estiramento da ligação C-O, deformação na ligação C-H e deformação na ligação N-H (KAUR, GOYAL, KUMAR, 2018; ASHTARINEZHAD, 2015). Assim, os modos vibracionais observados por esta técnica confirmam a presença do antibiótico na superfície das AgNPs.

**Figura 18:** Espectro de FT-IR da Ag@vancomicina.

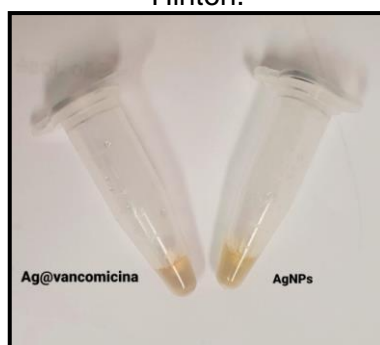


**Fonte:** A autora.

A estabilidade das AgNPs e do nanofármaco foi avaliada pela análise de Potencial Zeta. As AgNPs apresentaram um Potencial Zeta de  $-32,7\text{ mV}$  e uma condutividade de  $0,0220\text{ mS/cm}$ , o valor encontrado na análise indica colóides estáveis, uma vez que o Potencial Zeta das nanopartículas se encontram fora da região de instabilidade situada de  $-30\text{ mV}$  a  $+30\text{ mV}$  (VIEIRA, 2015). A carga negativa também está relacionada com o processo de síntese que utilizou o borohidreto de sódio como agente redutor e estabilizante. O nanofármaco Ag@vancomicina apresentou um Potencial Zeta de  $-26,9\text{ mV}$  e uma condutividade de  $0,0255\text{ mS/cm}$ . Embora, este valor encontra-se na região considerada eletrostática, o nanofármaco manteve-se estável quando exposto ao meio de cultura Mueller Hinton. Na Figura 19, é possível observar que não houve aglomeração das AgNPs e nem da Ag@vancomicina, uma vez que o meio de cultura é rico em sais e sabe-se que ao

adicionar uma solução salina nas AgNPs a carga superficial é desestabilizada induzindo a união das partículas e conseqüentemente o aumento de tamanho e a mudança de coloração, indicando a aglomeração. Neste caso observa-se que não houve a agregação das partículas, pois as colorações das soluções permaneceram a mesma. Dessa forma, o nanofármaco pode ser utilizado nos ensaios microbiológicos.

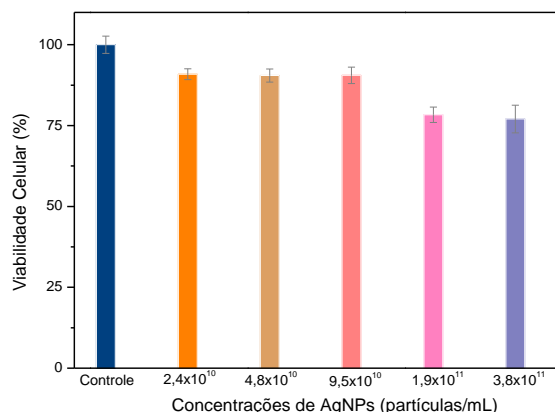
**Figura 19:** Teste de estabilidade das AgNPs e Ag@vancomicina no meio de cultura Mueller Hinton.



**Fonte:** A autora.

#### 4.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE DAS AGNPS

O método de exclusão do Azul de Tripán baseia-se na análise da integridade da membrana celular. As células viáveis, cuja membrana está íntegra, não cora na adição do corante. Enquanto as células inviáveis, as quais a membrana celular é rompida pela ação da droga, incorporam o Azul de Tripán e permanecem coradas após essa exposição. A Figura 20 apresenta a viabilidade celular da linhagem celular L929 após o tratamento com AgNPs. Pode ser observado que, para as concentrações de  $2,4 \times 10^{10}$ ;  $4,8 \times 10^{10}$ ;  $9,5 \times 10^{10}$  partículas/mL apresentam uma viabilidade acima de 90%, enquanto as concentrações de  $1,9 \times 10^{11}$  e  $3,8 \times 10^{11}$  partículas/mL estão acima de 77%.

**Figura 20:** Citotoxicidade das AgNPs na linhagem L929.

**Fonte:** A autora.

Dessa forma, é possível observar que para as três menores concentrações as AgNPs não apresentaram uma toxicidade significativa, ou seja, para estas concentrações, a morte celular foi abaixo de 10%. Entretanto, para as duas maiores concentrações a morte celular encontra-se na faixa dos 20% de variação de não toxicidade considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) nos testes com cultura celular. Uma vez que o desvio padrão das amostras ( $\pm 3,0$ ) encontra-se dentro da variação aceita pela OMS, conclui-se que estas concentrações de nanopartículas também não foram citotóxicas (CHALONER-LARSSON, 1999).

As AgNPs podem provocar alterações na morfologia, reduzir a viabilidade e ocasionar apoptose e necrose, a nível celular. Estes efeitos são consequências do estresse oxidativo causado pelas AgNPs e pela liberação dos íons  $\text{Ag}^+$  no compartimento celular (ZHANG, 2014). Dessa forma, a ação citotóxica pode ser relacionada com o tamanho e concentração das nanopartículas, em que partículas menores interagem mais com os compartimentos celulares devido a grande área superficial e maior conteúdo de prata atribuída a sua composição, permitindo a penetração e absorção das AgNPs nas células, consequentemente provocando os danos celulares (DURÁN, 2019; NEL, 2006).

Liu e coautores (2010) avaliaram nanopartículas de 5, 20 e 50 nm nas células humanas A549, SGC-7901, HepG2 e MCF-7. O maior efeito citotóxico foi observado nas partículas de 5 nm quando comparado com as de 20 e 50 nm, além disso as nanopartículas menores também internalizaram mais nas células do que as maiores, o que contribuiu para uma maior toxicidade na interação com a célula (LIU, 2010). Park

e colaboradores (2011) utilizaram também AgNPs de 5, 20 e 50 nm em um estudo com células de Fibroblastos L929. A citotoxicidade foi observada nas AgNPs de 5 nm, enquanto as de 20 e 50 nm não apresentaram toxicidade significativa (PARK, 2011). Outro estudo de Park et.al com camundongos utilizando AgNPs com tamanho médio de 42 nm em diferentes concentrações, reportaram que os efeitos tóxicos como a concentração das AgNPs no fígado e rins só foi observado na maior concentração aplicada (PARK, 2014). Portanto, os resultados de citotoxicidade corroboram com os estudos mencionados, em que se utilizou nanopartículas com tamanho médio de aproximadamente 47 nm não apresentam efeito tóxico nas células nas concentrações estudadas.

#### 4.5 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

Primeiramente, cabe salientar que os estudos com AgNPs funcionalizadas à vancomicina ainda são recentes, além das técnicas microbiológicas empregadas para avaliação da ação antibactericida serem diversas, o mecanismo de ação é pouco elucidado. Assim, para realizar os testes de CIM com o nanofármaco foi necessário realizar o teste com as AgNPs. Assim, na Tabela 3 é possível observar a concentração de AgNPs capaz de inibir o crescimento da *S. aureus*, a qual foi determinada para uma concentração de  $9,5 \times 10^{10}$  partículas/mL.

**Tabela 3:** Determinação da CIM das AgNPs em *S. aureus*.

Microrganismo	Concentrações de AgNPs (partículas/mL)				
	$2,4 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{11}$
<b><i>S. aureus</i> (ATCC 29213)</b>			•		

**Fonte:** A autora.

O teste de CIM com o complexo vancomicina-cisteamina e com a Ag@vancomicina também foi realizado seguindo os critérios descritos na normativa do *CLSI*. Na Tabela 4, são demonstrados os dados referentes à determinação da CIM para o complexo vancomicina-cisteamina, a qual obteve um perfil de susceptibilidade de 2 µg/mL para *S. aureus* ATCC (29213), a qual corrobora com a CIM determinada pela *BrCast* quando se utiliza o antibiótico vancomicina, indicando também que a modificação química realizada no fármaco não alterou seu efeito antibacteriano.

Em contrapartida, para Ag@vancomicina na cepa ATCC (29213) de *S. aureus* a CIM encontrada foi de 0,25 µg/mL, demonstrando um efeito de redução da CIM em 8 vezes, indicando que a funcionalização das AgNPs com o antibiótico proporcionou um duplo efeito inibitório no microrganismo. Visto que para a Ag@vancomicina de 0,25 µg/mL, o número de partículas das AgNPs era menor ( $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL), concentração esta que não possui efeito de inibição em cepas de *S. aureus*. O resultado observado demonstra que a redução da CIM é consequência do sinergismo ocorrido entre as AgNPs e o antibiótico.

Na Tabela 4, também são apresentados os resultados da Ag@vancomicina na aplicação em cepas clínicas (SA-1; SA-2; SA-3) de *S. aureus*. Para as cepas SA-1 e SA-2, a CIM foi de 1 µg/mL de Ag@vancomicina, quando comparado ao perfil de susceptibilidade definido pelo *BrCast*, observa-se que não houve uma redução na CIM, visto que manteve-se a mesma. Entretanto, para a cepa SA-3 a CIM foi 1 µg/mL e ao comparar a concentração encontrada pelo *BrCast*, é observado uma redução de 2 vezes da CIM.

**Tabela 4:** Determinação da CIM do complexo vancomicina-cisteamina e Ag@vancomicina em *S. aureus*.

Microrganismo	Concentrações de Complexo vancomicina-cisteamina (µg/mL)						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	Concentrações de Ag@vancomicina (µg/mL)						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
SA-1				•			
SA-2				•			
SA-3				•			

Fonte: A autora.

Hur e Park (2016) funcionalizaram a vancomicina em AgNPs (Van-AgNPs) e aplicaram em cepas ATCC (29213) e clínicas de *S. aureus*. Os autores reportaram que a CIM para a ATCC (29213) de *S. aureus* que foi utilizada como o padrão de controle, foi de 45,3 µg/mL. Entretanto, para as cepas clínicas principalmente as resistentes a oxacilina, a CIM foi de 90,6 µg/mL. Embora, as Van-AgNPs utilizadas possuam diâmetro de aproximadamente 12 nm, a CIM foi alta quando comparada a do fármaco sozinho (HUR, PARK, 2016).

O efeito de uma maior concentração para as cepas clínicas principalmente com perfil de resistência a um fármaco pode ser relacionado com os mecanismos de resistência que o microrganismo pode adquirir e/ou desenvolver no meio inserido, que no caso pode variar de indivíduo para indivíduo. Embora, para a vancomicina todas as cepas tenham perfil de susceptibilidade sensível, a resistência a outros fármacos pode interferir na ação do nanofármaco com a cepa. Assim, como no estudo de Hur e Park (2016) para a cepa ATCC (29213) que possui um perfil de sensibilidade a oxacilina (metecilina) a concentração foi menor do que as clínicas (SA-1 e SA-2) que segundo o *BrCast* apresentaram-se resistentes a este fármaco. Este fator pode ser considerado uma hipótese da não redução da CIM quando aplicado a Ag@vancomicina para as cepas SA-1 e SA-2, e do decréscimo da concentração observada na cepa SA-3, que também é sensível a oxacilina assim como a ATCC (29213).

Jiang e coautores (2021) conjugaram a vancomicina com um dendrímero poli-(amido-amina) (PAMAM) e AgNPs, produzindo o Van-PAMAM-AgNPs e aplicaram na cepa de *S. aureus* ATCC (12600) sensível a vancomicina e na cepa Xen36 resistente a vancomicina. No estudo a CIM para a vancomicina foi de 2 µg/mL para a cepa sensível e de 8 µg/mL para a resistente. Porém, quando foi aplicado o Van-PAMAM-AgNPs a CIM tanto para a cepa sensível quanto para a resistente foi de 1 µg/mL, equivalendo uma redução de 2 vezes para a sensível e 8 vezes para a resistente. O decréscimo observado da CIM é resultado da conjugação entre a vancomicina e as AgNPs, visto que o PAMAM sozinho não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas. Além disso, como as AgNPs causam danos na parede, a união pode proporcionar a entrada da vancomicina no microrganismo (JIANG, 2021).

Kaur e colaboradores (2019) reportam a síntese de Van@citrato-AgNPs e sua aplicação em *S. aureus*. O teste microbiológico utilizado foi o método de difusão em ágar, o qual avalia a zona de inibição (ZOI) de crescimento. Neste estudo os autores relatam que a ZOI para as AgNPs (60 µg/mL) foi de zero, para a vancomicina foi de 16 mm na concentração 0,3 mM (434,77 µg/mL) e para a Van@citrato-AgNPs a ZOI foi de 26,5 mm para a mesma concentração. O aumento da ZOI no resultado da Van@citrato-AgNPs quando comparado as AgNPs e ao fármaco é explicado pelo efeito sinérgico relatado com a funcionalização das AgNPs com o antibiótico. Sabe-se que quanto menor as nanopartículas melhor é o seu efeito antibacteriano, porém o diâmetro das Van@citrato-AgNPs era de aproximadamente 91 nm, o que também

interferiu o aumento da ZOI ser só significativo na presença de uma concentração alta de fármaco (KAUR, 2019).

A concentração de fármaco é um fator determinante e de extrema importância para a aplicabilidade biológica do nanofármaco, uma vez que a funcionalização é realizada para que tenha a ação dos dois elementos, tanto das AgNPs quanto da vancomicina. Assim, quando comparado aos estudos citados, os dados obtidos mostraram-se eficientes para a cepa ATCC (29213) e para SA-3 uma vez que foi possível o sinergismo entre as AgNPs e o antibiótico, sem que o efeito de um sobressaísse o outro, além de ter reduzido a CIM do antibiótico. Porém, para as cepas clínicas SA-1 e SA-2, a não redução da CIM pode ser relacionada à resistência a oxacilina, o que sugere que para essas cepas o nanofármaco precisa ser sintetizado para também agir no mecanismo de ação das enzimas beta-lactamases, a qual proporciona resistência ao fármaco nas cepas de *S.aureus*.

A cepa ATCC (29212) e clínicas (EF-1; EF-2; EF-3) de *E. faecalis* seguiu a mesma metodologia para os testes de susceptibilidade utilizando as AgNPs, o complexo e o nanofármaco. Na Tabela 5, são mostrados os dados de CIM utilizando as mesmas concentrações de AgNPs testadas nas cepas de *S. aureus*. O intuito é o desenvolvimento de um nanofármaco que possa atuar de forma similar em diferentes microrganismos Gram-positivos. A concentração de AgNPs capaz de inibir o crescimento da *E. faecalis* foi de  $9,5 \times 10^{10}$  partículas/mL, correspondendo ao mesmo perfil que o encontrado para a *S. aureus*.

**Tabela 5:** Determinação da CIM das AgNPs em *E. faecalis*.

Microrganismo	Concentrações de AgNPs (partículas/mL)				
	$2,4 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{11}$
<b><i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)</b>			•		

Fonte: A autora.

Na Tabela 6, nota-se que para o complexo vancomicina-cisteamina, a CIM na *E. faecalis* ATCC (29212) foi de 2 µg/mL corroborando com a concentração determinada pelo *BrCast*. Enquanto para Ag@vancomicina a CIM determinada foi de 0.12 µg/mL na ATCC (29212), apresentando um decréscimo de aproximadamente 16 vezes na CIM quando comparado à concentração do fármaco agindo sozinho. Nas cepas clínicas EF-1, EF-2 e EF-3 a redução observada da CIM correspondeu a 4, 2 e 2 vezes

a concentração de fármaco, respectivamente. Dessa forma, os resultados obtidos nas cepas de *E. faecalis* constata o efeito sinérgico do nanofármaco também para outra bactéria Gram-positiva.

**Tabela 6:** Determinação da CIM do complexo vancomicina-cisteamina e Ag@vancomicina em *E. faecalis*.

Microrganismo	Concentrações de Complexo vancomicina-cisteamina (µg/mL)						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)					•		
EF-1			•				
EF-2				•			
EF-3			•				

Fonte: A autora.

Esmaeillou e coautores (2017) aplicaram Van-AgNPs em *E. faecalis* resistentes (VRE) e encontraram uma CIM de 0,1 µg/mL. Os autores relatam que as AgNPs utilizadas na funcionalização com vancomicina apresentavam um diâmetro médio de 16-25 nm (ESMAEILLOU, 2017). O diâmetro menor das AgNPs contribui para uma melhor ação com as bactérias, porém o resultado obtido de CIM de 0,12 µg/mL na ATCC (29212), 0,50 µg/mL para EF-1 e EF-3, e 1 µg/mL para EF-2 de Ag@vancomicina com diâmetro de 47 nm no teste com as cepas de *E. faecalis*, demonstra que este tamanho de partícula também possibilita a inibição do crescimento do microrganismo. Além disso, a diferença de redução de CIM também observada entre as cepas clínicas de *E. faecalis* sugerem que as estirpes podem se diferenciar quanto a resposta terapêutica, em virtude das características e mecanismos de resistência que podem adquirir e/ou desenvolver.

Patel e Kumar (2020) aplicaram nanopartículas híbridas (vancomicina-pDA@AgNPs) de diâmetro médio de aproximadamente 33 nm em *E. faecalis* resistentes a vancomicina. No estudo o método de avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas foi à análise de ZOI, em que a vancomicina-pDA@AgNPs apresentou uma redução da ZOI significativa nas concentrações de 1-5 µM, enquanto para a vancomicina apresentar eficácia na morte bacteriana foi necessária altas concentrações do fármaco (13-54 mM). O diâmetro pequeno da

vancomicina-pDA@AgNPs contribuiu para uma melhor interação do nanofármaco com a bactéria e a resistência da estirpe ao fármaco justifica o uso de uma concentração mais alta. No entanto, a redução da ZOI baixas concentrações do nanofármaco reforça que o sinergismo entre o antibiótico e as AgNPs proporcionam um melhor efeito na morte do microrganismo (PATEL, KUMAR, 2020).

A CBM pode ser definida em até duas concentrações acima da encontrada na CIM. Assim, para as AgNPs em *S. aureus* a CBM foi a mesma determinada no CIM, sendo de  $9,5 \times 10^{10}$  partículas/mL, como observado na Tabela 7.

**Tabela 7:** Determinação da CBM das AgNPs em *S. aureus*.

Microrganismo	Concentrações de AgNPs (partículas/mL)				
	$2,4 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{11}$
<b><i>S. aureus</i> (ATCC 29213)</b>			○		

**Fonte:** A autora.

Para o complexo vancomicina-cisteamina testadas na cepa ATCC a CBM foi definida na concentração de  $4 \mu\text{g/mL}$  e quando testadas o nanofármaco Ag@vancomicina foi maior que  $1 \mu\text{g/mL}$ , como mostrado na Tabela 8. Nas cepas clínicas SA-1 e SA-2 foi determinado a CBM quando utilizado uma concentração de  $2 \mu\text{g/mL}$  do nanofármaco, sendo uma acima da CIM determinado o efeito bactericida. Na cepa clínica SA-3 houve crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas, sendo então definido o CBM como maior que  $4 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 8:** Determinação da CBM do complexo vancomicina-cisteamina e da Ag@vancomicina em *S.aureus*.

Microrganismo	Concentrações de Complexo vancomicina-cisteamina ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	Concentrações de Ag@vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
						○	
							>○
SA-1						○	
SA-2						○	
SA-3							>○

Fonte: A autora.

A CBM determinada para *E. faecalis* utilizando as AgNPs se comportou diferente a encontrada na CIM. Na Tabela 9, nota-se que a CBM foi à concentração de  $3,8 \times 10^{11}$  partículas/mL, em que apresentou a comportamento esperado da técnica, tendo um efeito bactericida acima de até duas concentrações da CIM.

**Tabela 9:** Determinação da CBM das AgNPs em *E. faecalis*.

Microrganismo	Concentrações de AgNPs (partículas/mL)				
	$2,4 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^{10}$	$9,5 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{11}$
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)					○

Fonte: A autora.

Na Tabela 10 é apresentada a CBM para o complexo vancomicina-cisteamina na ATCC (29212) e da Ag@vancomicina em *E. faecalis*. Para o complexo vancomicina-cisteamina a CBM foi de  $8 \mu\text{g/mL}$  e para a Ag@vancomicina foi maior que  $1 \mu\text{g/mL}$ . Nota-se que para as cepas ATCC a CBM de Ag@vancomicina tanto na *S. aureus* quanto na *E. faecalis* foi a mesma. No entanto, para todas as cepas clínicas de *E. faecalis* houve crescimento bacteriano em todas as concentração testadas, assim a CBM foi identificada como maior que  $4 \mu\text{g/mL}$ , em que a Ag@vancomicina não proporcionou ação bactericida no microrganismo para esta concentração aplicada.

**Tabela 10:** Determinação da CBM do complexo vancomicina-cisteamina e da Ag@vancomicina em *E. faecalis*.

Microrganismo	Concentrações de						
	Complexo vancomicina-cisteamina ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)							o
	Concentrações de Ag@vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	0,12	0,25	0,50	1	2	4	8
				>o			
EF-1						>o	
EF-2						>o	
EF-3						>o	

Fonte: A autora

A vancomicina afeta especificamente a síntese da construção da parede celular das bactérias Gram-positivas quando se liga no terminal D-Ala-D-Ala de um precursor de peptidoglicano (SILVEIRA, 2006). Enquanto, as AgNPs possuem amplo mecanismo de ação nas bactérias, como a desestabilização da membrana pelo aumento de permeabilidade ao se depositar na membrana interna bacteriana e induzir o extravasamento de conteúdo celular, consequentemente gerando a morte. A capacidade de interagir com proteínas constituídas por enxofre na parede celular, produzem danos à estrutura e rompem a parede. Além disso, as interações com enxofre ou fósforo possibilita as AgNPs alterar a estrutura e funções de DNA e proteínas. As AgNPs também são capazes de interferir na cadeia respiratória ao interagir com o grupo tiol das enzimas produzindo as ERO, danificando o mecanismo intracelular e ocasionando morte por apoptose (BRUNA, 2021). Uma vez que o antibiótico possui um alvo específico e as AgNPs trabalham em várias vias para levar a morte do microrganismo, é sugerido que o sinergismo aconteça quando esses efeitos são somados ao funcionalizar o antibiótico na superfície das AgNPs. Portanto, esse sinergismo é uma possível justificativa para os resultados obtidos que foram apresentados acima.

## 5 CONCLUSÃO

As AgNPs produzidas apresentaram uma distribuição bimodal do diâmetro hidrodinâmico das partículas, sendo estáveis e biocompatíveis com o sistema biológico indicando seu uso farmacológico. O nanofármaco sintetizado também se apresentou uma distribuição bimodal do diâmetro hidrodinâmico, sendo estável e demonstrou ação bacteriostática para a cepa de *S. aureus* e *E. faecalis*, sendo determinada pela redução da CIM com a concentração de  $\leq 1\mu\text{g/mL}$ . No entanto é importante ressaltar que para as cepas clínicas SA-1 e SA-2 a CIM manteve-se a mesma do antibiótico, sugerindo que o perfil clínico da cepa influencia diretamente no mecanismo de ação do nanofármaco. A ação bactericida foi observada apenas para as cepas clínicas SA-1 e SA-2, o que sugere que no caso das outras cepas testadas o nanofármaco pode exercer a ação bactericida se a concentração for aumentada. Desta forma, os resultados obtidos demonstraram que a presença do antibiótico na superfície da AgNPs potencializa o efeito bactericida e bacteriostático, propondo esta estratégia como uma excelente alternativa para as aplicações futuras em cepas resistentes a este fármaco.

## REFERÊNCIAS

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

ARMITAGE, Richard; NELLUMS, Laura B. Antibiotic prescribing in general practice during COVID-19. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. e144, 2021.

ASHTARINEZHAD, Azadeh et al. FTIR microspectroscopy reveals chemical changes in mice fetus following phenobarbital administration. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 14, n. Suppl, p. 121, 2015.

BANLA, Ismael L. *et al.* Modulators of Enterococcus faecalis cell envelope integrity and antimicrobial resistance influence stable colonization of the mammalian gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v. 86, n. 1, 2018.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. Dissertação (mestrado em Ciências Farmaceuticas) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa, 2013.

BARROS, Mariana Vilhena. **Infeções nosocomiais por enterococcus faecalis**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BASTOS, João. Intervenção farmacêutica na infeção urinária. **Farmácia Portuguesa**, n. 156, 2005.

BERNARD, Louis *et al.* Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Journal of microbiological methods**, v. 57, n. 2, p. 231-239, 2004.

BOOLCHANDANI, Manish; D'SOUZA, Alaric W.; DANTAS, Gautam. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356-370, 2019.

BRUNA, Tamara *et al.* Silver nanoparticles and their antibacterial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.

CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 903-908, 2017.

CAUWERTS, Katty *et al.* High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm (B) gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007.

CHALONER-LARSSON, Gillian *et al.* **A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements**. Geneva: World Health Organization. 1999.  
Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/64465>

chemotherapy, v. 61, n. 5, p. 1182-1183, 2008.

CHIOSIS, Gabriela; BONECA, Ivo G. Selective cleavage of D-Ala-D-Lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. **Science**, v. 293, n. 5534, p. 1484-1487, 2001.

COATES, J. Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DE LIMA, Deivy Clementino *et al.* Snake venom: any clue for antibiotics and CAM?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2005.

DEL FIO, Fernando de Sá; MATTOS FILHO, T. R.; GROppo, Francisco Carlos. Resistência bacteriana. **Rev. Bras. Med.**, v. 57, n. 10, p. 1129-1140, 2000.

DINGES, Martin M.; ORWIN, Paul M.; SCHLIEVERT, Patrick M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

Doi: 10.1093/jac/dkn065.

DURÁN, Nelson *et al.* Nanotoxicology of silver nanoparticles: toxicity in animals and humans. **Química Nova**, v. 42, p. 206-213, 2019.

DURÁN, Nelson *et al.* Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini- review. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2015.

ESMAEILLOU, Mahsa *et al.* Vancomycin capped with silver nanoparticles as an antibacterial agent against multi-drug resistance bacteria. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 7, n. 3, p. 479, 2017.

FARIA, Rafael César Bolleli. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus***. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

FIGUEREDO, Regina Aparecida Miranda *et al.* Enterococcus resistente à vancomicina: uma preocupação em expansão no ambiente hospitalar. **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 11-15, 2017.

FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FOSTER, Timothy J. Immune evasion by staphylococci. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948-958, 2005.

FRANCI, G. *et al.* Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Molecules**, v. 20, p. 8856-8874, 2015.

GARCIA, Marcus Vinicius Dias. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 77 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000802684&opt=1>.

GOODMAN, Louis Sanford; GILMAN, Alfred. **As Bases Farmacológicas da. la Terapêutica**. Mexico: McGrawhell, 2006.

HOLLENBECK, Brian L.; RICE, Louis B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HUANG, Lin *et al.* Epidemiology and risk factors of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci infections in Zhejiang China from 2015 to 2017. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2019.

HUR, Ye Eun; PARK, Youmie. Vancomycin-functionalized gold and silver nanoparticles as an antibacterial nanoplatform against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, n. 6, p. 6393-6399, 2016.

iGEM 2008. **Synthetic Biology**. 2021. Disponível em: [http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General\\_information](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General_information). Acesso em: 28 nov. 2021.

JESUS, V. P. S. *et al.* Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 23, p. 212-217, 2018.

JIANG, Guimei *et al.* PAMAM dendrimers with dual-conjugated vancomycin and Ag-nanoparticles do not induce bacterial resistance and kill vancomycin-resistant Staphylococci. **Acta Biomaterialia**, v. 123, p. 230-243, 2021.

KAUR, Amritpal *et al.* Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 176, p. 62-69, 2019.

KAUR, Amritpal; GOYAL, Divya; KUMAR, Rajesh. Surfactant mediated interaction of vancomycin with silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 449, p. 23-30, 2018.

KONEMAN, Elmer W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2012.

KRAWCZYK, Beata *et al.* The many faces of Enterococcus spp.—Commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1900, 2021.

LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Nature Reviews**, v. 4, p. 1 – 23, 2018.

LIMA, M. F. P. et al. Staphylococcus aureus e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 32 – 39, 2015.

LIU, Wei *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-330, 2010.

LOUREIRO, Rui João *et al.* O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MACEDO, Vedilaine Aparecida Bueno da Silva. **Abordagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) da vancomicina no controle da sepse por patógenos gram-positivos em pacientes queimados críticos pediátricos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2017. doi:10.11606/D.9.2017.tde-06122017-111756.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1771-1777, 2000.

MARTINS, Raquel Costa. **Nanotecnologia no diagnóstico e tratamento do cancro oral**. 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2017.

MCBRIDE, Shonna M. *et al.* Genetic diversity among Enterococcus faecalis. **PLoS one**, v. 2, n. 7, p. e582, 2007.

MELO JR, M. A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MERLO, Thaís Panhan. **Comparação genotípica e fenotípica de Enterococcus faecalis resistentes à vancomicina isolados nos anos de 2009 e 2011 em um hospital de Minas Gerais**. 2013. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2013. doi:10.11606/D.76.2013.tde-19122013-171502.

MIMICA, Marcelo Jenné; BEREZIN, Eitan Naaman. Staphylococcus aureus resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivos médicos dos hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 52-56, 2006.

MORENO, Carlos Alvarez *et al.* Device-associated infection rate and mortality in intensive care units of 9 Colombian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 27, n. 4, p. 349-356, 2006.

MULFINGER, Lorraine *et al.* Synthesis and study of silver nanoparticles. **Journal of chemical education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

MÜNCH, Daniela *et al.* Structural variations of the cell wall precursor lipid II and their influence on binding and activity of the lipoglycopeptide antibiotic oritavancin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 772-781, 2015.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2.15, 2016. Doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015

NEL, Andre *et al.* Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

OLIVEIRA, J. **Estudo da síntese de nanopartículas de ouro e bioconjugação com proteínas para desenvolvimento de nanosensores**. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.

O'NEIL, M.J. (ed.). **The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Whitehouse Station, NJ: Merck, 2006.

PARK, June-Woo *et al.* Toxicity of citrate-coated silver nanoparticles differs according to method of suspension preparation. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 93, n. 1, p. 53-59, 2014.

PARK, Margriet VDZ *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9810-9817, 2011.

PATEL, Khushbu; KUMAR, Rajender. Vancomycin Grafted Polydopamine Coated Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Action Against Vancomycin-Resistant Bacteria *E. Faecalis*. **Chemistry Select**, v. 5, n. 15, p. 4701-4707, 2020.

RASIGADE, Jean-Philippe; VANDENESCH, François. Staphylococcus aureus: a pathogen with still unresolved issues. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 510-514, 2014.

RAWSON, Timothy M. *et al.* Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. 2459-2468, 2020.

RYBAK, Michael J. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of vancomycin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, Supp.1, p. S35-S39, 2006.

SANTOS, André Luis dos *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; CLEWELL, D. B. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral microbiology and immunology**, v. 19, n. 2, p. 95-101, 2004.

SILVA, Luciano P. *et al.* Silver nanoparticles as antimicrobial agents: Past, present, and future. In: FICAI, Anton; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. (eds.).

**Nanostructures for Antimicrobial Therapy.** Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. p. 577-596.

SILVEIRA, Gustavo Pozza *et al.* Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SILVEIRA, J. Resistência Bacteriana Aos Antibióticos. **Revista Da Ordem Dos Farmacêuticos**, n. 30, 1999.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos da Genética.** 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SUBRAMANYA, Supram Hosuru *et al.* The potential impact of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance and antibiotic stewardship. **Virusdisease**, v. 32, n. 2, p. 330-337, 2021.

TARIQ, M. H. *et al.* Development and validation of a simple, accurate and economical method for the analysis of vancomycin in human serum using ultracentrifuge protein precipitation and UV spectrophotometer. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 6, n. 2, p. 239, 2015.

TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekhar G. **Staphylococcus aureus.** Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>

TIAGO, Vasco Antunes de Oliveira. **Resistência total à vancomicina em Staphylococcus aureus e Staphylococcus aureus tipo-VanA: Uma revisão de 2016.** 2017. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

TIAN, Sufang; XIAO, Shu-Yuan. Pathology of 2019 novel coronavirus pneumonia: a dynamic disease process. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 5, p. e67-e68, 2020.

UÇKAY, Ilker *et al.* Enterococci in orthopaedic infections: Who is at risk getting infected?. **Journal of Infection**, v. 75, n. 4, p. 309-314, 2017.

VIEIRA, L.S. **Síntese e caracterização de fotossensibilizadores nanoestruturados de terceira geração para terapia fotodinâmica.** 2015. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP. 2015.

VIGNAROLI, Carla *et al.* Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1438-1447, 2011.

WAN, Fuxian *et al.* Binuclear gadolinium (III) complex based on DTPA and 1, 3-bis (4-aminophenyl) adamantane as a high-relaxivity MRI contrast agent. **Polyhedron**, v. 145, p. 141-146, 2018.

WEI, L. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595 - 601, 2015.

WERNER, Guido *et al.* Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1182-1183, 2008.

XU, Li *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. **Theranostics**, v. 10, n. 20, p. 8996, 2020.

YAQOOB, Asim Ali *et al.* Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 341, 2020.

ZANELLA, Rosemeire C. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 3, p. 283-291, 2003.

ZENG, Daina *et al.* Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 12, p. a026989, 2016.

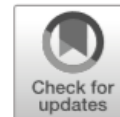
ZHANG, Tianlu *et al.* Cytotoxic potential of silver nanoparticles. **Yonsei medical journal**, v. 55, n. 2, p. 283-291, 2014.

ZHANG, Xi-Feng *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.

# ANEXO A: COMPOSITIONS OF CALCIUM ALUMINATE CEMENT CONTAINING GOLD AND SILVER NANOPARTICLES FOR BIOMATERIAL APPLICATIONS.

Research on Biomedical Engineering  
<https://doi.org/10.1007/s42600-020-00045-z>

ORIGINAL ARTICLE



## Compositions of calcium aluminate cement containing gold and silver nanoparticles for biomaterial applications

A. F. L. Santos<sup>1</sup> · M. L. Castilho<sup>2</sup> · T. S. Veriato<sup>1,2</sup> · I. R. Oliveira<sup>3</sup> · L. Raniero<sup>1</sup> 

Received: 11 October 2019 / Accepted: 26 January 2020  
© Sociedade Brasileira de Engenharia Biomedica 2020

### Abstract

**Introduction** Research has been developed in the biomedical engineering field to seek biomaterials that favor bone repair. Studies on orthopedics point out the advantages of using calcium aluminate cement (CAC) to repair bone defects. This is due to its similarity in chemical composition and thermal expansion coefficient of the bones, besides its high viscosity, low heat release, and biocompatibility. The aim of the present study was to investigate the influence of gold (AuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles on the properties of CAC since nanotechnology allows improving the properties and biomaterials, as well as enhancing bone modeling.

**Methods** The samples were prepared from suspensions of homogeneous calcium aluminate cement (CACH) with AuNPs or AgNPs and were evaluated for theoretical density, uniaxial cold crushing strength, flexural stress, microhardness, apparent porosity, pore size distribution, and bioactivity in simulated body fluid (SBF). The suspensions were also evaluated to check their viscosity, injectability, and setting time as functions of solid content.

**Results** The addition of AuNPs increased the flexural stress, decreased porosity and pore diameter, and increased bioactivity. Injectable pastes were prepared with solid content of 76 wt%, indicating their application potential to bone defects as they are associated with many advantages, for instance, perfect adjustment to the geometry of the bone defect, lesser trauma to the patient, and lower risk of infections.

**Conclusion** The AuNPs and AgNPs showed influence on the mechanical properties of CACH. The combination of CACH + AuNPs improved its properties, resulting in higher flexural resistance and lower porosity and pore diameter, but AgNP addition showed the worst results in terms of mechanical properties.

**Keywords** Nanoparticles · Calcium aluminate cement · Properties · Bone repair

ANEXO B: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLE ON MONOTYPIC BIOFILMS OF *Klebsiella pneumoniae*.



ANEXO C: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOCONTRAST FOR DIAGNOSTIC IMAGING.



## ANEXO D: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NANOPHARMACEUTICAL IN ANTIMICROBIAL THERAPY.



## ANEXO E: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO DE AMPLO ESPECTRO.



## ANEXO F: IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM DIFERENTES FLUIDOS DE CORTE SOLÚVEIS INDUSTRIAIS.



## ANEXO G: NANO-ANTIBIOTIC BASED ON SILVER NANOPARTICLES COMBINED WITH A GLYCOPEPTIDE ANTIBIOTIC FOR ALTERNATIVE TREATMENT OF MULTIDRUG RESISTANCE BACTERIA.



ANEXO H: STUDY OF ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES IN  
Staphylococcus Aureus.



ANEXO I: DEVELOPMENT A NANO-ANTIBIOTIC FOR ANTIMICROBIAL THERAPY  
AGAINST MULTIDRUG RESISTANT MICROORGANISMS.



## ANEXO J: EVALUATION OF THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES IN Staphylococcus aureus STRAIN.



## ANEXO K: ESTUDO in vitro DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM A TERAPIA FOTODINÂMICA EM CEPA GRAM-POSITIVA.



Realização:  **Univap**  
 Universidade do Vale do Paraíba

 **FAPESP**  
 FUNDAÇÃO DE Amparo à RESEARCH DE ENSINO

Apoio:  **CNPq**  
 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

 **FAPESP**

 **CAPES**

 **Univap**  
 Univap

## ANEXO L: ESTUDO DA AÇÃO ANTI-BIOFILME DA ANTIBIOTICOTERAPIA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Staphylococcus aureus*.

XXV INIC  
Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica

XXI EPG  
Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação

XV INIC Jr  
Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica Júnior

XI INID  
Encontro Latino-Americano de Iniciação & Docência

IV CONPAT  
Congresso de Pesquisa Aplicada e Tecnologia

I ENEXUN  
Encontro Nacional de Ensino de Universidade



### CERTIFICADO

*Certificamos que o trabalho intitulado "ESTUDO DA AÇÃO ANTI-BIOFILME DA ANTIBIOTICOTERAPIA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Staphylococcus aureus*" de autoria de Flávia Sant Anna Dela Rosa, Thais da Silva Veriato, Leandro Raniero e Maiara Lima Castilho, foi apresentado no XXV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXV INIC), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 20, 21 e 22 de outubro de 2021.*




São José dos Campos, 22 de outubro de 2021.



Prof. Dr. Leandro José Raniero  
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

**CIÊNCIA, SAÚDE E TECNOLOGIA:**  
 AGENTES DE TRANSFORMAÇÃO E  
 CONSCIENTIZAÇÃO DA SOCIEDADE

20 A 22 DE OUTUBRO

| [inicepg.univap.br](http://inicepg.univap.br)

Realização:  

Apoio:    