

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Andréa de Souza Andrioli

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas contendo meropenem e
avaliação da atividade frente à *Klebsiella pneumoniae* resistente aos
carbapenêmicos**

Juiz de Fora
2024

Andréa de Souza Andrioli

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas contendo meropenem e
avaliação da atividade frente à *Klebsiella pneumoniae* resistente aos
carbapenêmicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Silvana Alves

Prof^a. Dr^a. Patrícia Guedes Garcia

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Andrioli, Andréa de Souza.

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas contendo meropenem e avaliação da atividade frente à *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos / Andréa de Souza Andrioli. -- 2024. 150 f. : il.

Orientador: Guilherme Diniz Tavares

Coorientadoras: Maria Silvana Alves, Patrícia Guedes Garcia

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. resistência antimicrobiana. 2. carbapenemase. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. meropenem. 5. nanotecnologia. I. Tavares, Guilherme Diniz, orient. II. Alves, Maria Silvana, coorient. III. Garcia, Patrícia Guedes, coorient. IV. Título.

Andréa de Souza Andrioli

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas contendo meropenem e avaliação da atividade frente à *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 29 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Guilherme Diniz Tavares - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Maria Silvana Alves - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Patrícia Guedes Garcia - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Ângela Faustino Jozala

Universidade de Sorocaba

Dr. Humberto de Mello Brandão

EMBRAPA - Gado de Leite

Juiz de Fora, 29/10/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 29/11/2024, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Guedes Garcia, Professor(a)**, em 29/11/2024, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Silvana Alves, Professor(a)**, em 29/11/2024, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto de Mello Brandão, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angela Faustino Jozala, Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2067724** e o código CRC **8BD7BBD3**.

Dedico à memória da minha mãe, Arlete,
que com toda sua dedicação foi a maior
incentivadora de meus estudos, e sei o
quanto está feliz com essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu pastor e a luz no meu caminho, trazendo paz a meu coração.

À minha família - meu marido, Francisco Renato, meus filhos Gabriel e Renata, e tia, Vânia - por todo o apoio, pela compreensão em minhas ausências, pelo suporte constante e por estarem sempre ao meu lado com palavras de admiração. Espero também ter inspirado meus filhos a trilhar o caminho da dedicação aos estudos, caminho essencial para a vida.

Aos meus pais, Mauri e Arlete, minha gratidão incondicional por terem me apoiado a seguir nos estudos e por não medirem esforços para tornar isso possível. Sei o quanto vocês se dedicaram e de tudo de que abriram mão para que eu pudesse estudar. Agora, estou encerrando uma etapa que jamais imaginei concretizar.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares, por ter confiado em mim e por ter proporcionado a realização deste mestrado. Sou eternamente grata por você ter me permitido entrar no mundo das pesquisas científicas.

Às minhas amigas “Cajazeiras” e “Pilateiras” que me proporcionaram momentos de alegria, descontração, shows, risos e deixaram os dias mais leves para seguir neste caminho. E viva a carteirinha de estudante!

Aos meus irmãos André e Arlene e seus familiares que tanto amo, por me incentivarem. Mesmo sem entender ao certo o motivo de tanta vontade de estudar, vocês acreditam em mim.

Às minhas coorientadoras Profa. Dra. Maria Silvana Alves e Profa. Dra. Patrícia Guedes Garcia pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio na realização deste projeto, e por todo o enriquecimento que proporcionaram à minha pesquisa;

Aos amigos dos Laboratórios de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados por me receberem com tanto carinho e atenção, pelos momentos de aprendizado e risadas e em especial à Dra. Natália Prado da Silva e a futura farmacêutica Laís Lacerda por dividirem comigo tantas tarefas, sempre com entusiasmo e dedicação.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Silvana Alves por me receber em seu laboratório de

Bioatividade Celular e Molecular da Faculdade de Farmácia da UFJF e me proporcionar tanto aprendizado e em especial ao MSc. Ygor Ferreira Garcia da Costa e ao futuro farmacêutico Welder Silva, por todo o conhecimento compartilhado e parceria na realização de tantos experimentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Ana por ter me recebido tão carinhosamente no Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas da UFJF e em especial a doutoranda Daphne Fonseca de Coppoli Lanferini e a mestranda Vitória Basílio pela ajuda inestimável.

Ao Prof. Dr. Diego dos Santos Ferreira por ter me supervisionado no trabalho de campo na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e em especial a Pós-doc Juliana de Oliveira Silva pela enorme contribuição.

Ao Prof. Dr. Humberto de Mello Brandão da Embrapa Gado de Leite que me acolheu muito bem em seu laboratório e esteve sempre disposto a contribuir.

Aos Técnicos Administrativos em Educação (TAEs) e Secretários da Faculdade de Farmácia da UFJF, por todo o apoio técnico no processo de realização de experimentos e disponibilidade em me auxiliar. Agradeço ao TAE Romário Costa Fochat pela parceria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para a realização do Curso de Mestrado Acadêmico (Número do Processo - 88887.802789/2023-00), Programa de Demanda Social.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (PROPP/UFJF), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelos auxílios financeiros que viabilizaram o presente estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGCF/UFJF), por todas as contribuições nestes dois anos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, minha segunda casa nesses últimos dois anos, por novamente ter me recebido tão bem.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional e acadêmica.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a resistência antimicrobiana uma das maiores ameaças à saúde pública global no século XXI. Por isso, destaca a necessidade urgente de pesquisas por alternativas inovadoras, especialmente contra bactérias Gram-negativas críticas, como *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KpRC). Nesse contexto, a nanotecnologia emerge como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas para a entrega do meropenem (MRP) visando obter nova alternativa terapêutica frente à KpRC. Para tanto, foram desenvolvidas três diferentes formulações contendo quitosana (QT), um polímero com atividade antimicrobiana promissora: nanopartículas constituídas essencialmente por QT (NPQT), lipossomas constituídos por dipalmitoilfosfatidilcolina e colesterol recobertos com QT (LQT) e nanopartículas associando prata, que também apresenta atividade antimicrobiana, com QT (AgNPQT). Apesar de apresentarem resultados condizentes com a literatura em relação ao diâmetro hidrodinâmico médio (DHm) ($100,73 \pm 2,71$ nm), índice de polidispersividade (Pdl) ($0,300 \pm 0,02$) e potencial Zeta (PZ) ($+ 26,97 \pm 0,21$ mV), as NPQT exibiram baixa eficiência de encapsulação (EE) ($\sim 3\%$), inviabilizando estudos posteriores. Para os lipossomas, após o recobrimento com QT, obtivemos aumento no DHm (de $120,79 \pm 9,89$ nm para $205,46 \pm 18,41$ nm), manutenção do Pdl e inversão do PZ para valor positivo ($+27,17 \pm 1,36$ mV). Ademais, a EE foi maior que a observada para as NPQT ($\sim 26\%$). Porém, os resultados de atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de referência de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase evidenciaram que a nanoestruturação não foi eficiente para reduzir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em comparação ao MRP livre (CIM > 500 µg/mL para ambas as amostras). Finalmente, as AgNPQT-ME-MRP apresentaram DHm = $75,21 \pm 6,06$ nm, Pdl = $0,542 \pm 0,02$ e PZ = $+41,60 \pm 1,13$ mV. Além disso, as análises de espectroscopia Raman e espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS) corroboraram a adsorção do MRP à superfície das AgNPQT. Para essa formulação, realizamos também a caracterização morfológica por Microscopia de Força Atômica, a qual revelou a obtenção de partículas esféricas e com tamanho condizente com o obtido para o DHm. Em relação à atividade frente à KpRC, a CIM das AgNPQT-MRP foi menor que a obtida para o MRP livre para todas as cepas testadas (referência e clínicas), com efeito bacteriostático. Esses resultados podem estar relacionados a possível ação sinérgica entre o MRP e os constituintes da nanopartícula e indicam potencial promissor para o enfrentamento a bactérias resistentes aos carbapenêmicos.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana, carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, meropenem, nanotecnologia.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) has declared antimicrobial resistance as one of the greatest threats to global public health in the 21st century. Consequently, it highlights the urgent need for research into innovative alternatives, particularly against critical Gram-negative bacteria such as carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp). In this context, nanotechnology emerges as a promising strategy for developing new therapeutic approaches. Thus, the present study aimed to develop and characterize nanoparticles for the delivery of meropenem (MRP), with the goal of providing a new therapeutic alternative against CRKp. Three different formulations containing chitosan (QT), a polymer with promising antimicrobial activity, were developed: nanoparticles primarily composed of QT (NPQT), liposomes made of dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol coated with QT (LQT), and nanoparticles combining silver, which also has antimicrobial activity, with QT (AgNPQT). Although NPQT showed results consistent with the literature in terms of average hydrodynamic diameter (DHm) (100.73 ± 2.71 nm), polydispersity index (Pdl) (0.300 ± 0.02), and zeta potential (ZP) ($+26.97 \pm 0.21$ mV), they exhibited low encapsulation efficiency (EE) ($\sim 3\%$), precluding further studies. For the liposomes, after QT coating, we observed an increase in DHm (from 120.79 ± 9.89 nm to 205.46 ± 18.41 nm), maintenance of Pdl, and inversion of ZP to a positive value ($+27.17 \pm 1.36$ mV). Furthermore, EE was higher than that observed for NPQT ($\sim 26\%$). However, in vitro antibacterial activity results against reference strains of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* indicated that nanoencapsulation was not effective in reducing the minimum inhibitory concentration (MIC) compared to free MRP (MIC > 500 $\mu\text{g/mL}$ for both samples). Finally, the AgNPQT-ME-MRP exhibited DHm = 75.21 ± 6.06 nm, Pdl = 0.542 ± 0.02 , and ZP = 41.60 ± 1.13 mV. Additionally, Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) analyses corroborated the adsorption of MRP onto the AgNPQT surface. Morphological characterization of this formulation using Atomic Force Microscopy revealed spherical particles with sizes consistent with the DHm measurements. Regarding activity against CRKp, the MIC of AgNPQT-MRP was lower than that of free MRP for all tested strains (reference and clinical), with a bacteriostatic effect. These results may be associated with a potential synergistic action between MRP and the nanoparticle constituents, indicating promising potential for combating carbapenem-resistant bacteria.

Keywords: antimicrobial resistance, carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, meropenem, nanotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNP	Nanopartículas de prata
AgNPQT	Nanopartículas de prata/quitosana
AgNPQT-MRP	Nanopartículas de prata/quitosana – meropenem
AgNPQT-ME-MRP	Nanopartículas de prata/quitosana – 2-mercaptoetanol-meropenem
AMH	Ágar Müeller-Hinton
AMP	Aminometilpropanol
ANTs	Antibióticos
ATCC®	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
BLAs	Antibióticos beta-lactâmicos
<i>bla</i>	Gene que codifica metalo-β-lactamase
BGN	Bactérias Gram-negativas
BGP	Bactérias Gram-positivas
CAS	do inglês <i>Chemical Abstracts Service</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CHOL	Colesterol
COVID-19	do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i>
CP	Controle positivo
CMH	Caldo Müeller-Hinton
CN	Controle negativo
EE	Eficiência de Encapsulação
ERC	<i>Enterobacterales</i> resistentes aos carbapenêmicos
DDD	Dose diária definida
DHm	Diâmetro hidrodinâmico médio

DLS	do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DO	Densidade Ótica
EDTA	do inglês <i>Ethylene Diamine tetraacetic acid</i>
ESBLs	do inglês <i>Extended-Spectrum Beta-lactamases</i>
FA	Fase aquosa
FO	Fase orgânica
FF	Faculdade de Farmácia
GD	Grau de desacetilação
GLASS	Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância de uso antimicrobiano (GLASS em inglês)
H ₂ O _d	Água destilada estéril
HPLC	do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAM	Interferência das Amostras sobre o Meio
IMP	Imipenemase
INT	Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio
IPM	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ISC	Interferência dos solventes/diluentes sobre o crescimento bacteriano
ISM	Interferência dos Solventes/diluentes sobre o Meio
KOH	Hidróxido de potássio
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KpRC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos
hvKP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
LDNano	Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados
LIP-BRA	Lipossomas brancos
LIP-BRA-QT	Lipossomas brancos revestidos com quitosana
LIP-MRP	Lipossomas contendo meropenem
LIP-MRP-QT	Lipossomas com meropenem revestidos com quitosana

MBLs	Metalo β -lactamases
NDM	Metalo- β -lactamase de Nova Delhi
VIM	Metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona
MDR	Multidrogarresistente
ME	2-mercaptoetanol
MM	Massa molecular
MRP	Meropenem
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
Na ₃ cit	Citrato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NCTC®	do inglês <i>National Collection of Type Cultures</i>
NP	Nanopartículas
NPQT-MRP	Nanopartículas de quitosana – Meropenem
NPQT-B	Nanopartículas de quitosana brancas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	do inglês <i>Pan American Health Organization</i>
PBP _s	do inglês <i>Penicillin-Binding Proteins</i>
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PdI	Índice de polidispersividade
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
PZ	Potencial Zeta
QT	Quitosana
RAM	Resistência Antimicrobiana
RPM	Rotação por minuto
SARS-CoV-2	do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SEs	Soluções Estoque
SERS	Espectroscopia Raman com superfície modificada
SOB - LIP	Sobrenadante de lipossoma
Sol/Dil	Solvente/Diluyente
TSB	do inglês <i>Tryptic Soy Broth</i>

TPP	Tripolifosfato de sódio
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de terapia intensiva
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VRSA	<i>do inglês vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>
WHO	<i>do inglês World Health Organization</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<u>Quadro 1</u>	- Lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos	27
Figura 1	- Evolução da introdução dos antibióticos e o surgimento da resistência antimicrobiana	29
Figura 2	- Estrutura geral dos β -lactâmicos	30
Figura 3	- Estrutura química das quatro classes de β -lactâmicos existentes	31
Figura 4	- Estrutura química do meropenem	33
Figura 5	- Representação esquemática do posicionamento das β -lactamases nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	35
Figura 6	- Obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina	41
Figura 7	- Representação esquemática da interação entre a quitosana e o tripolifosfato no processo de gelificação iônica	43
Figura 8	- Nanopartícula de quitosana contendo meropenem	44
Figura 9	- Meropenem encapsulado em lipossoma revestido com quitosana	46
Figura 10	- Nanopartículas de prata/quitosana contendo meropenem	48
Figura 11	- Síntese de nanopartículas de quitosana	52
Figura 12	- Distribuição de tamanho das nanopartículas por intensidade (n=3)	57
Figura 13	- Gráfico de distribuição do potencial Zeta das nanopartículas (n=3)	58
Figura 14	- Curva analítica do padrão de meropenem por meio de HPLC	60
Figura 15	- Cromatogramas referentes ao padrão de meropenem à 10 $\mu\text{g/mL}$ (ponto central da curva analítica) e filtrado da NPQT-MRP	60
Figura 16	- Cromatogramas sobrepostos das amostras de NPQT-MRP, NPQT-B e do padrão de meropenem	63
Figura 17	- Processo de síntese dos lipossomas por nanoprecipitação microfluídica	69
Figura 18	- Esquema do processo de preparo das amostras para avaliação da eficiência de encapsulação do meropenem dos lipossomas	71

Figura 19	- Esquema ilustrativo da organização das microplacas de titulação utilizadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo das amostras e dos antibióticos	75
Figura 20	- Esquema ilustrativo do processo de diluição seriada realizado em microplacas de titulação	76
Figura 21	- Esquema ilustrativo dos controles utilizados para o teste de microdiluição em caldo	77
Figura 22	- Esquema ilustrativo para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático	79
Figura 23	- Distribuição de tamanho dos LIP-MRP (a), LIP-MRP-QT por intensidade (n=3)	83
Figura 24	- Distribuição de PZ dos lipossomas LIP-BRA (a), LIP-BRA-QT (b), LIP-MRP (c), LIP-MRP-QT (d)	84
Figura 25	- Curva analítica do padrão de meropenem por meio de HPLC	86
Figura 26	- Cromatogramas referentes ao padrão de MRP(a) à 10 µg/mL (ponto central da curva analítica)	87
Figura 27	- Cromatogramas sobrepostos das amostras de SOB-LIP-MRP, LIP-BRA e do padrão de meropenem	87
Figura 28	- Síntese das nanopartículas de prata/quitosana	97
Figura 29	- Síntese das nanopartículas de prata/quitosana e 2-mercaptoetanol e meropenem	98
Figura 30	- Gráfico de distribuição de tamanho das AgNPQT (a), AgNPQT-MRP (b) e AgNPQT-ME-MRP (c) por intensidade (n=3)	107
Figura 31	- Gráfico de distribuição do potencial Zeta das nanopartículas (n=3)	109
Figura 32	- Espectros Raman de meropenem puro e Espectroscopia Raman de superfície modificada (SERS) das nanopartículas de prata/quitosana	114

Figura 33	-	Microscopia de Força Atômica para as nanopartículas de prata/quitosana	118
Figura 34	-	Microscopia de Força Atômica em 3D para as AgNPQT-MRP	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Valores de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta para as nanopartículas brancas e com meropenem obtidas pelo método de gelificação iônica	55
Tabela 2	- Valor de Eficiência de Encapsulação para as NPQT-MRP	61
Tabela 3	- Composição quali-quantitativa dos lipossomas	69
Tabela 4	- Composição das soluções estoque (SEs) das amostras e antibióticos preparadas e utilizadas na determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de microdiluição em caldo	73
Tabela 5	- Valores de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta para as amostras de lipossomas obtidas pelo método microfluídico	81
Tabela 6	- Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidos com os lipossomas LIP-BRA, LIP-MRP, LIP-MRP-QT, imipenem (IPM) e meropenem (MRP) frente às cepas bacterianas de referência	91
Tabela 7	- Composição das soluções estoque (SEs) das amostras e antibióticos preparadas e utilizadas na determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de microdiluição em caldo	103
Tabela 8	- Valores de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta para as amostras de nanopartículas de prata/quitosana	106
Tabela 9	- Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidos com a solução de QT, AgNP, AgNPQT, AgNPQT-MRP, AgNPQT-ME-MRP, imipenem (IPM) e meropenem (MRP) frente às cepas bacterianas clínicas e de referência.	122

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1	- Aspecto macroscópico de liófilos de lipossomas (SOB-LIP-MRP) acima e de LIP-MRP ressuspensos abaixo	81
Fotografia 2	- Porta amostras para análises de AgNP por SERS	100
Fotografia 3	- Colóide de nanopartículas de prata sem quitosana (à esquerda) com quitosana (à direita)	106

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1.	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (RAM).....	25
2.2.	ANTIMICROBIANOS	28
2.2.1.	Antibióticos β -lactâmicos (BLAs) – Carbapenêmicos.....	29
2.2.1.1.	Meropenem (MRP)	32
2.3.	ENTEROBACTERIALES RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS (ERC) ...	33
2.3.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos.....	36
2.4.	NANOTECNOLOGIA.....	39
2.4.1.	Nanopartículas de Quitosana	40
2.4.2.	Lipossomas	44
2.4.3.	Nanopartículas de prata/quitosana	46
3.	OBJETIVOS	49
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO MEROPENEM		50
I.1.	MATERIAL E MÉTODOS	51
I. 1.1.	MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	51
I. 1.2	EQUIPAMENTOS.....	51
I. 1.3	MÉTODOS	51
I. 1.3.1	Desenvolvimento das nanopartículas	51
I. 1.3.2	Caracterização das nanopartículas	53
I. 1.3.2.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)	53
I.1.3.2.2	Eficiência de encapsulação.....	53
I.1.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
I.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
I.2.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	55

I.2.1.1.	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ).....	55
I.2.1.2	Eficiência de Encapsulação.....	59
I.3.	CONCLUSÃO	65
CAPÍTULO II:DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO MEROPENEM.....		66
II.1.	MATERIAL E MÉTODOS	67
II.1.1.	MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	67
II.1.2.	EQUIPAMENTOS.....	67
II.1.3.	MÉTODOS	67
II.1.3.1.	Preparo dos lipossomas	67
II.1.3.2.	Liofilização dos sobrenadantes	69
II.1.3.3.	Revestimento dos lipossomas com quitosana.....	69
II.1.3.4.	Caracterização dos lipossomas	70
II.1.3.4.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)	70
II.1.3.4.2	Eficiência de encapsulação (EE).....	70
II.1.3.4.3.	Avaliação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i> dos lipossomas	71
II.1.3.4.4.	Cepas bacterianas e condições de armazenamento	72
II.1.3.4.5.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	73
II.1.3.4.6.	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano: bactericida ou bacteriostático	78
II.1.4.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	79
II.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
II.2.1	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	80
II.2.1.1.	Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ).....	81
II.2.1.2	Eficiência de encapsulação	86
II.2. 3.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO <i>IN VITRO</i>	88
II.2.3.1.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima seguida da classificação do efeito antibacteriano em bactericida ou bacteriostático	88
II.3.	CONCLUSÃO	93

CAPÍTULO III:DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA/QUITOSANA CONTENDO MEROPENEM	94
III.1. MATERIAL E MÉTODOS (AgNPQT)	95
III.1.1. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	95
III.1.2. EQUIPAMENTOS.....	95
III.1.3. MÉTODOS	97
III.1.3.1. Síntese das nanopartículas de prata/quitosana (AgNPQT)	97
III.1.3.2. Caracterização das nanopartículas	98
III.1.3.2.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ).	98
III.1.3.2.2. Espectroscopia Raman e Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS)	99
III.1.3.2.2.1. Preparo de amostras para espectroscopia SERS	99
III.1.3.2.3. Caracterização morfológica - Microscopia de Força Atômica - AFM	100
III.1.3.2.4. Avaliação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i> das nanopartículas..	101
III.1.3.2.4.1. Cepas bacterianas e condições de cultura	101
III. 1.3.2.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	103
III.1.3.2.4.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano: bactericida ou bacteriostático ...	104
III.1.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	104
III.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
III.2.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	105
III.2.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ).....	106
III.2.1.2. Espectroscopia RAMAN	111
III.2.1.3. Espectroscopia SERS	111
III.2.1.4. Avaliação Morfológica - Microscopia de Força Atômica – AFM.....	115
III.2.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO <i>IN VITRO</i>	120
III.2.2.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima seguida da classificação do efeito antibacteriano em bactericida ou bacteriostático	120
III.3. CONCLUSÃO	127

4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	128
	REFERÊNCIAS.....	129
	ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP.....	144

1. INTRODUÇÃO

Em 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a resistência antimicrobiana (RAM) como um dos problemas de saúde pública global mais graves e complexos do século XXI, classificando-a entre as 10 principais ameaças enfrentadas pela humanidade (WHO, 2019). Mundialmente, a RAM tornou-se uma das principais causas de morte. Em estudo publicado, que analisou dados de 204 países e territórios no ano de 2019, estimou-se que 4,95 milhões de mortes foram atribuídas à RAM, das quais 1,27 milhões estavam diretamente associadas a infecções por microrganismos resistentes a medicamentos (Murray et al., 2022). O aumento contínuo da RAM é alarmante. Com base nos dados reportados por Murray et al. (2022), as previsões de O'Neill (2016), que estimam que até 2050 até 10 milhões de pessoas poderão morrer em decorrência de doenças multirresistentes, estão se concretizando mais cedo do que o esperado, com um custo anual de cerca de 1 bilhão de dólares (O'Neill, 2016).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos antibióticos (ANTs) diminuiu devido a barreiras econômicas e regulatórias (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019). A partir da década de 70, observa-se uma lacuna no desenvolvimento de novos ANTs, e poucos medicamentos foram aprovados desde então (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019; Silver, 2011; Theuretzbacher, 2017). O alto custo de desenvolvimento, o uso de ANTs por períodos curtos, o baixo valor comparado a outros tratamentos crônicos e a rápida resistência bacteriana desmotivam a indústria farmacêutica a investir nessa área (Dutescu; Hillier, 2021).

O agravamento do cenário da RAM, possivelmente antecipado, está intrinsecamente ligado à pandemia de COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*) causada pelo vírus SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). A sobrecarga nos sistemas de saúde durante a emergência sanitária contribuiu para o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, incluindo os carbapenêmicos (Farfour, 2020; Ghosh; Bornman; Zafer, 2021). Nesse contexto, a resistência a esses fármacos emerge como uma ameaça crescente à terapia antibacteriana.

Os carbapenêmicos, como o meropenem (MRP), são agentes antibacterianos β -lactâmicos (BLAs) de amplo espectro que desempenham um papel crítico no manejo de infecções complicadas e graves, que podem ser causadas por patógenos Gram-negativos multidrogarresistentes (MDR), especialmente contra cepas produtoras de β -lactamases (Doi, 2019). Entre estas cepas bacterianas, a *Klebsiella pneumoniae* é considerada uma espécie capaz de produzir β -lactamases de diferentes espectros, inclusive carbapenemases. Nesse contexto, essa espécie bacteriana foi considerada pela OMS como prioridade crítica, com urgência para descoberta de novos antimicrobianos (WHO, 2024).

De acordo com a lista de prioridades globais de bactérias resistentes, elaborada e divulgada pela OMS para orientar a pesquisa e o desenvolvimento de novos ANT's, o grupo de prioridade crítica inclui: *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *Enterobacterales* resistentes as cefalosporinas de terceira geração, *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) e *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina (WHO, 2024). Considerando a epidemiologia das infecções por ERC, observa-se que cepas de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* juntas somam mais de 90% dos casos, sendo amplamente disseminadas em todo o mundo (Ma et al., 2023; Pesesky et al., 2015).

Diante do desafio de enfrentar a RAM, várias abordagens têm sido investigadas para incrementar a eficácia dos carbapenêmicos. As mais relevantes incluem a otimização da estabilidade desses agentes em relação às carbapenemases bacterianas (Fair; Tor, 2014; Shaaban; Shaker; Mady, 2017), bem como o aumento de sua penetração e captação bacteriana (Abdelkader et al., 2017; Rashki et al., 2021). Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para a entrega de carbapenêmicos pode contribuir significativamente pois esses carreadores têm o potencial de aumentar a interação do agente adsorvido com a célula bacteriana, favorecendo sua internalização e, conseqüentemente, aumentando sua eficácia (Shaaban; Shaker; Mady, 2017; Shahbandeh et al., 2021).

A RAM em *Enterobacterales*, especialmente devido às carbapenemases, é um problema crescente e de difícil manejo, exigindo novas abordagens terapêuticas. A nanotecnologia, ao oferecer soluções inovadoras para potencializar a ação de ANT's

como o MRP, surge como uma estratégia promissora, embora ainda em fase de investigação. Nesse sentido, esta dissertação teve como foco o desenvolvimento de diferentes formulações de nanopartículas contendo MRP, visando combater infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, além de avaliar o potencial da nanotecnologia no enfrentamento da RAM.

O trabalho foi organizado em capítulos para facilitar a compreensão do percurso metodológico adotado. No Capítulo I, apresentamos o desenvolvimento e a caracterização de nanopartículas de quitosana para encapsulação de MRP. O Capítulo II aborda o desenvolvimento e a caracterização de lipossomas revestidos com quitosana para a veiculação de MRP. Finalmente, no Capítulo III, contextualizamos os resultados referentes ao desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de prata associadas à quitosana contendo MRP. Para cada Capítulo, foram descritos os itens *Material e Métodos*; *Resultados e Discussão* e *Conclusão*. Ao final do trabalho, são abordadas as perspectivas futuras visando a continuidade do estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA (RAM)

A RAM é um fenômeno natural que ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas se alteram ao longo do tempo, desenvolvendo ou adquirindo características de resistência por meio de mecanismos distintos, e já não respondem aos medicamentos, tornando as infecções mais difíceis de tratar e aumentando o risco de propagação e gravidade das doenças e de morte (Helmy et al., 2023; WHO, 2021). Nesse sentido, ocorre uma pressão seletiva no meio, o que pode fazer com que os microrganismos com mecanismos de resistência específicos se tornem dominantes e, assim, transfiram esse material genético para outra célula, aumentando as chances de resistência (Laxminarayan et al., 2016).

Segundo a OMS, a RAM é uma das dez principais ameaças à saúde global (WHO, 2021). A emergência de microrganismos resistentes a diversas classes de antimicrobianos tem sido um fenômeno progressivo. Nessa perspectiva, as consequências diretas das infecções causadas por esses patógenos são graves, incluindo o aumento do tempo de internação, escassez de opções terapêuticas e elevação da morbidade e mortalidade (OPAS, 2021). A esse respeito, existem estimativas de que as infecções bacterianas multirresistentes estejam associadas a 4,95 milhões de mortes em todo o mundo apenas no ano de 2019 (Murray et al., 2022).

É consenso que o uso excessivo e inadequado de ANTs tem acelerado a disseminação da resistência bacteriana (Helmy et al., 2023), desencadeando um problema crescente e complexo que ameaça a eficácia de todas as classes desses medicamentos (WHO, 2021). Nesse sentido, um estudo publicado por O'Neill em 2016 estimou que, até 2050, cerca de 10 milhões de mortes por ano seriam causadas por microrganismos resistentes caso intervenções como vigilância e uso racional dos antimicrobianos não fossem praticadas (O'Neill, 2016; WHO, 2021).

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, contribuiu para a ocorrência de infecções bacterianas e fúngicas secundárias (Hsu, 2020; Rodríguez et al., 2021), além de sobrecarregar os sistemas de saúde, o que levou ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos. Em um estudo conduzido em unidades dedicadas ao

tratamento da COVID-19 em um hospital em Maryland, Estados Unidos da América, durante maio e junho de 2020, 97% dos pacientes com COVID-19 receberam antibioticoterapia antes da primeira cultura positiva para bacilo Gram-negativo resistente, e 32% desses pacientes evoluíram para óbito. O uso inadequado desses medicamentos impactou diretamente a RAM, com até dois terços dos pacientes recebendo ANTs, apesar de apenas 5 a 8% terem real indicação (Patel et al., 2021). Coinfecções e infecções secundárias complicaram ainda mais o tratamento clínico (Guisado et al., 2020; Nori et al., 2020; Patel et al., 2021).

Nesse cenário complexo, diversos patógenos dificulta ainda mais a dinâmica do tratamento. Estudo indica que a pandemia de COVID-19 aumentou a prevalência de genes de resistência antimicrobiana em patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e bactérias da ordem *Enterobacterales* (carregando genes como *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*). Esse fenômeno foi especialmente notado em espécies como *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *K. pneumoniae*, intensificando os desafios terapêuticos durante a pandemia (Kiffer et al., 2023).

Em 2024, a OMS atualizou a lista de patógenos prioritários resistentes a ANTs, destacando 15 grupos bacterianos que representam uma grave ameaça à saúde humana (Quadro 1). O objetivo dessa lista é orientar e incentivar a pesquisa e o desenvolvimento de novos ANTs, com ênfase nas bactérias Gram-negativas multirresistentes de prioridade crítica, como parte dos esforços para conter a crescente RAM (WHO, 2024).

Quadro 1 - Lista de patógenos prioritários resistentes a ANT's

Prioridade Crítica
<i>Enterobacterales</i> resistente aos carbapenêmicos
<i>Enterobacterales</i> resistente à cefalosporina de 3ª geração
<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente aos carbapenêmicos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente a rifampicina*
Prioridade Alta
<i>Salmonella</i> Typhi resistente à fluoroquinolona
<i>Shigella</i> spp. resistente à fluoroquinolona
<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos
<i>Salmonella</i> não tifoide resistente à fluoroquinolona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente à cefalosporina de 3ª geração e/ou resistente à fluoroquinolona
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
Prioridade Média
Estreptococos do Grupo A resistente aos macrolídeos
<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente aos macrolídeos
<i>Haemophilus influenzae</i> resistente à ampicilina
Estreptococos do Grupo B resistente à penicilina
*incluído após análise independente com critérios paralelos e posterior aplicação de matriz <i>multi-criteria decision analysis</i> (MCDA) adaptada

Fonte: Adaptado de WHO (2024)

A divisão em três níveis de prioridade reflete a urgência com que novos tratamentos são necessários. Ao longo das últimas décadas, a exposição contínua de microrganismos a antimicrobianos resultou no surgimento de patógenos multirresistentes, conhecidos como superbactérias (Ganewatta; Rahman; Chuanbing, 2017). Entre esses, as bactérias Gram-negativas resistentes, especialmente os membros da ordem *Enterobacterales*, destacam-se como uma das maiores ameaças à saúde humana (Parmanik et al., 2022).

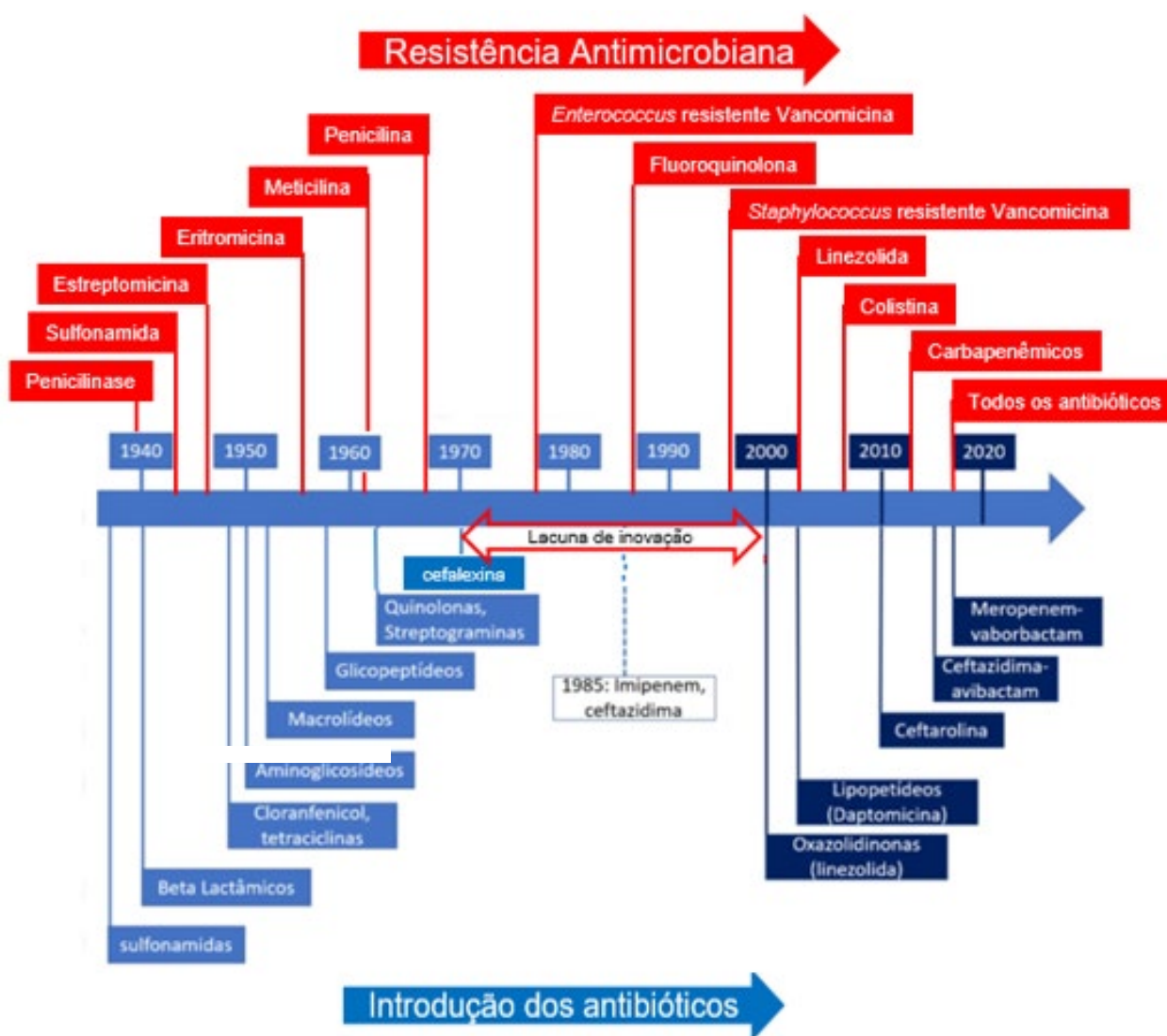
A *K. pneumoniae* está classificada como prioridade crítica e também está entre os 17 patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de vacinas, listados pela OMS recentemente, alinhando assim seus esforços para enfrentar os desafios mais significativos das doenças infecciosas resistentes (Hasso-Agopsowicz et al, 2024).

2.2. ANTIMICROBIANOS

No início do século XX, as doenças infecciosas eram a principal causa de morte global. Contudo, a introdução de agentes antimicrobianos levou a uma significativa redução na morbidade e mortalidade associadas a essas enfermidades (Cohen, 2000). O período entre 1940 e 1960 é frequentemente referido como a "era de ouro" dos ANT, caracterizado pela descoberta e desenvolvimento contínuo de medicamentos eficazes. Desde então, a descoberta de novos ANT tem diminuído gradualmente, acompanhada pela evolução de patógenos resistentes a medicamentos (Salam et al., 2023).

Atualmente, a resistência aos ANT atinge níveis críticos, comprometendo a eficácia das opções terapêuticas. Nos últimos anos, o número de novos antibacterianos que completam o processo de desenvolvimento e recebem aprovação tem diminuído vertiginosamente, refletindo uma queda contínua nas aprovações, enquanto a RAM apresenta sinais alarmantes de aumento (Huh; Kwon, 2011) (Figura 1). As infecções resistentes, tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, estão crescendo e ameaçam gravemente nossa capacidade de tratar doenças sérias. Essa situação exige soluções de longo prazo para enfrentar o crescente desafio da RAM.

Figura 1 - Evolução da introdução dos antibióticos e o surgimento da resistência antimicrobiana



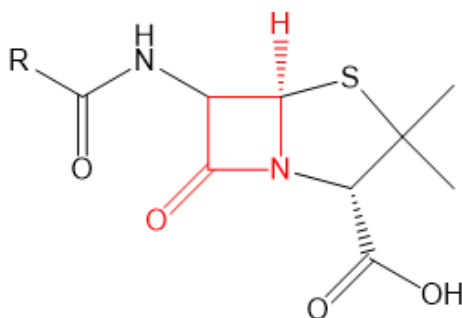
Fonte: Adaptado de Helmy, (2023)

2.2.1. Antibióticos β -lactâmicos (BLAs) – Carbapenênicos

Os antibióticos BLAs são agentes bactericidas que atuam interrompendo a formação da parede celular bacteriana por meio da ligação covalente às transpeptidases PBPs (do inglês, *Penicillin-Binding Proteins*). Essas enzimas desempenham um papel crucial nas etapas finais da reticulação do peptidoglicano, tanto em bactérias Gram-negativas quanto em Gram-positivas (Bush; Bradford, 2016). Além disso, nas bactérias

Gram-negativas, os BLAs, sendo moléculas hidrofílicas, penetram através de porinas; a diminuição da expressão dessas porinas contribui para a seleção de bactérias resistentes. Os BLAs contêm um anel β -lactâmico (Figura 2) que interfere na biossíntese da parede celular, inibindo as PBPs responsáveis pela reticulação do peptidoglicano. Essa modificação interfere na serina do sítio ativo das PBPs, inibindo as enzimas biossintéticas e prejudicando a biossíntese da parede celular. Como resultado, ocorre a citólise bacteriana, com baixa toxicidade para os humanos, já que as células humanas não possuem parede celular (Drawz; Bonomo, 2010).

Figura 2 - Estrutura geral dos beta-lactâmicos



Em vermelho, a representação do anel β -lactâmico

Fonte: Adaptado de Drawz; Bonomo (2010)

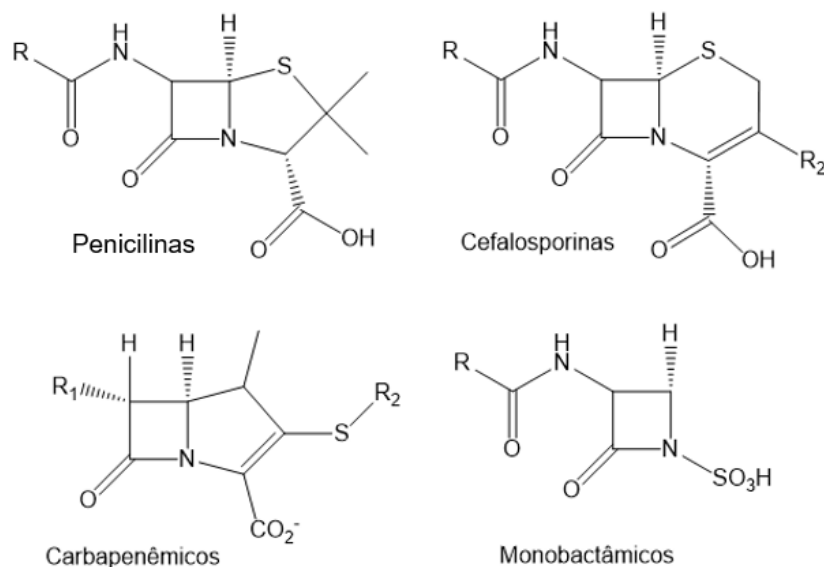
Além disso, os BLAs constituem a classe de ANTs mais amplamente utilizada no mundo, representando mais de 50% do mercado global e 65% das prescrições injetáveis nos Estados Unidos da América (Bush; Bradford, 2016; Hamed et al., 2013; Rajivgandhi et al., 2021). No entanto, o uso indiscriminado desses medicamentos, incluindo sua aplicação em infecções virais e fúngicas, tem contribuído para o aumento da RAM (Ferreira; Paes; Lichtenstein, 2008; Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017).

Os mecanismos de resistência incluem mutações nas PBPs, bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana e produção de β -lactamases, que rompem o anel β -lactâmico dos ANTs (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017; Reygaert, 2018; Zheng et al., 2023). Essas β -lactamases comprometem a eficácia dos BLAs ao abrirem o anel β -lactâmico, uma porção crucial para a função biológica (Massova; Mobashery, 1998).

Com o anel aberto, o ANT perde a capacidade de se ligar às PBPs, ficando impossibilitado de interromper a síntese da parede celular (Reygaert, 2018).

Existem quatro classes principais de BLAs: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 3). Cada uma dessas classes apresenta variações em suas estruturas químicas, o que influencia tanto o espectro de ação quanto a resistência às β -lactamases (Suárez; Gudíol, 2009).

Figura 3 - Estrutura química das quatro classes de β -lactâmicos existentes



Fonte: Adaptado de Draws; Bonomo (2010)

Os carbapenêmicos se diferenciam de outras classes de BLAs por apresentarem um anel β -lactâmico insaturado e sem enxofre (Mancuso et al., 2021). Essa classe inclui imipenem, ertapenem, MRP e doripenem, sendo considerada como tratamento de última linha para infecções causadas por organismos MDR, definidos como aqueles que são resistentes a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos (Mancuso et al., 2021).

Nas últimas duas décadas, o uso excessivo de carbapenêmicos na prática clínica global tem sido impulsionado pela necessidade de combater infecções causadas por

bactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), que hidrolisam quase todos os ANTs BLAs, exceto os carbapenêmicos (Jean et al., 2022).

No entanto, a disseminação de bactérias Gram-negativas resistentes a carbapenêmicos, tanto em situações endêmicas quanto em surtos, representa um desafio terapêutico diário na maioria das unidades de terapia intensiva (UTIs) em todo o mundo. Essa resistência é um dos principais fatores que contribuem para a resistência a múltiplos medicamentos, frequentemente caracterizando o último estágio antes da pan-resistência (Aurilio et al., 2022).

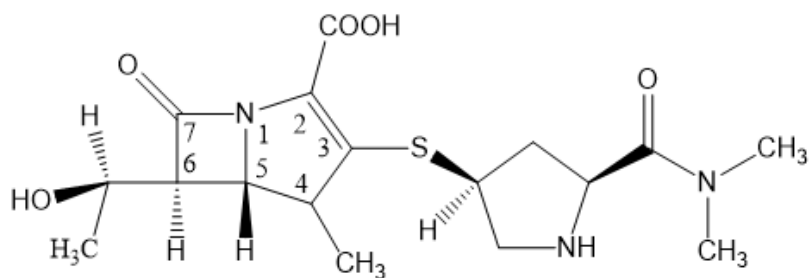
2.2.1.1. Meropenem (MRP)

O MRP (Figura 4) é administrado por via intravenosa e demonstra eficácia contra uma ampla gama de bactérias aeróbicas e anaeróbicas, tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas (Cielecka-Piontek et al., 2013). Ele apresenta notável resistência à degradação causada por β -lactamases, devido à introdução de um grupo metil na posição C4 (Abdelkader et al., 2017; Cielecka-Piontek et al., 2013; Mohr, 2008).

Do ponto de vista físico-químico, o MRP é um pó cristalino que varia de branco a amarelo pálido, pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em álcool etílico, e solúvel em fosfato de potássio monobásico a 5% (p/v) (Brasil, 2019). Sua estrutura zwitteriônica apresenta dois valores de constante de dissociação (pK_a): 2,9, referente ao grupamento ácido carboxílico, e 7,4, para o grupamento amínico do anel pirrolidínico (Tomasello et al., 2019).

O MRP possui meia-vida curta e apresenta variabilidade nas concentrações plasmáticas, exigindo administração frequente de doses elevadas (0,5 a 1 g, três vezes ao dia) (Abdelkader et al., 2017). Após a administração parenteral, ele se distribui rapidamente nos tecidos, apresenta baixa ligação a proteínas plasmáticas (aproximadamente 2%) e possui uma meia-vida de eliminação de cerca de 1 hora em pacientes com função renal normal (Craig, 1997).

Figura 4: Estrutura química do Meropenem



Fonte: Adaptado de Cielecka-Piontek et al. (2013)

O MRP é um ANT de última linha para tratar infecções graves causadas por bactérias multirresistentes. No entanto, a seleção de *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) tem limitado sua eficácia, reduzindo as opções terapêuticas disponíveis e representando uma séria ameaça à saúde global (Memar et al., 2020).

2.3. ENTEROBACTEREALES RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS (ERC)

A ordem *Enterobacterales* abrange um extenso e diversificado conjunto de bactérias Gram-negativas, caracterizadas por sua natureza facultativamente anaeróbica, pela ausência de formação de esporos e por uma morfologia em forma de bastonete. Esses microrganismos são ubíquos, colonizando uma variedade de nichos ecológicos, como solos e ambientes aquáticos, e estabelecendo associações com diversos seres vivos, incluindo plantas, insetos, animais e humanos. Além disso, são reconhecidos como patógenos oportunistas (Adeolu et al., 2016; Procop et al., 2018).

Essa ordem inclui as famílias *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae* (Adeolu et al., 2016). Entre elas, os membros da família *Enterobacteriaceae* têm um impacto significativo na medicina, na saúde pública e na veterinária em todo o mundo. Essas bactérias estão associadas a diversas síndromes clínicas e desempenham um papel crucial em enterites de origem alimentar e infecções zoonóticas, que podem variar desde surtos localizados até pandemias (Janda; Abbott, 2021).

As *Enterobacterales* são particularmente relevantes nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), como infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres, infecções urinárias, pneumonia e infecções de sítio cirúrgico, elevando os

custos com os cuidados de saúde (WHO, 2024). Entre os patógenos mais comuns nessas infecções, destacam-se *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., seguidos por *Proteus* spp., *Serratia* spp. e *Citrobacter* spp. (Kang et al., 2012).

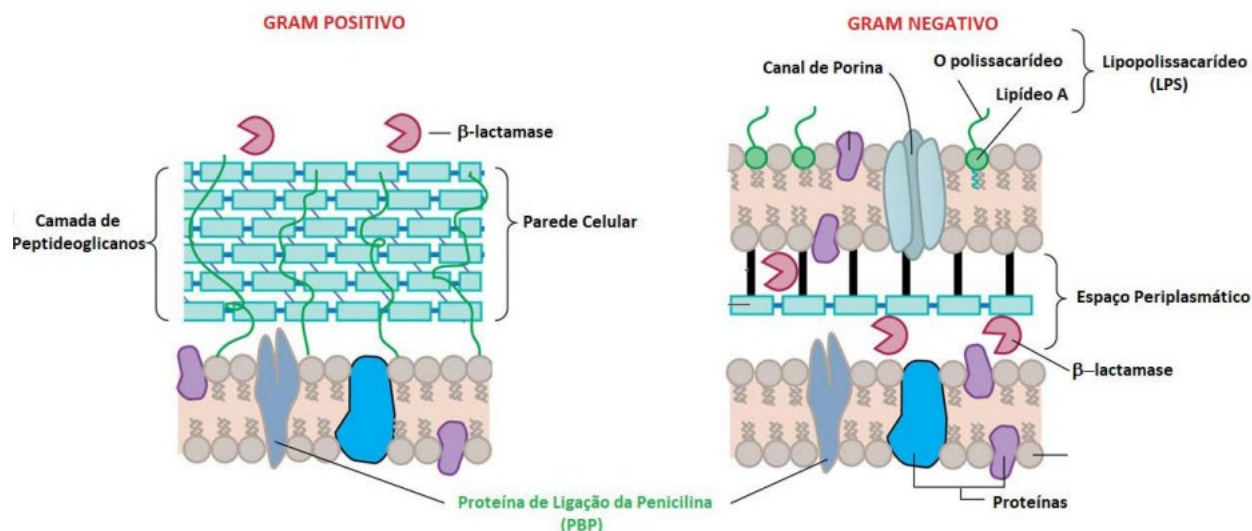
A emergência de ERC representa uma complicação significativa no contexto das infecções enterobacterianas (Vivas et al., 2020). Classificados como uma prioridade crítica pela OMS para orientar pesquisas e estratégias de prevenção e controle da RAM (WHO, 2024), esses patógenos constituem um grupo de superbactérias que representam ameaças sérias em ambientes hospitalares, casas de repouso e entre pacientes que dependem de dispositivos médicos, como respiradores e cateteres intravenosos.

Esses microrganismos são notavelmente adaptáveis e têm a capacidade de formar biofilmes, permitindo-lhes colonizar diversos nichos ecológicos. Além disso, possuem uma extraordinária habilidade para adquirir elementos genéticos móveis, como plasmídeos, o que facilita a disseminação de genes de resistência bacteriana. Essa capacidade de troca genética complica ainda mais as opções de tratamento disponíveis (Pompilio et al., 2023; WHO, 2024). As infecções causadas por ERC são particularmente desafiadoras, pois muitas vezes não respondem à terapia com ANT, resultando em falhas terapêuticas para quase todas as opções antibacterianas disponíveis na prática clínica, o que configura uma séria ameaça à saúde pública (CDC, 2019; Memar et al., 2020).

A disseminação global da resistência aos carbapenêmicos é impulsionada principalmente pela produção de enzimas do tipo β -lactamases, principalmente as carbapenemases. Essas enzimas estão associadas a taxas crescentes de resistência em todo o mundo, resultando em altas taxas de mortalidade devido as opções de tratamento extremamente limitadas (PAHO, 2021; Pesesky et al., 2015).

Nas bactérias Gram-positivas (BGP), observa-se uma expressão mais acentuada de β -lactamases, embora não haja um acúmulo significativo desta enzima. Em contrapartida, nas bactérias Gram-negativas (BGN), a produção de β -lactamases é menos pronunciada, contudo, ocorre uma abundância notável dessa enzima no espaço periplasmático, situado abaixo da membrana externa (Kapoor; Saigal; Elongavan, 2017), conforme visualizado na Figura 5.

Figura 5— Representação esquemática do posicionamento das β -lactamases nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.



Fonte: Zangrossi (2017)

A classificação de Ambler, proposta em 1980, é baseada em analogias com a sequência peptídica e categoriza as β -lactamases em quatro grupos (A, B, C e D). Três desses grupos (A, C e D) consistem em enzimas com sítio ativo na serina, conhecidas como serina β -lactamases. O quarto grupo (B) é formado por metalo β -lactamases (MBLs), que dependem de zinco e são "inibidas por EDTA" (Ambler, 1980). Na Classe A, incluem-se β -lactamases de espectro estreito, β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e serinocarbapenemases. A Classe C abriga as cefalosporinas, enquanto a Classe D contém as oxacilinas. Dentre essas enzimas, as que conseguem hidrolisar os carbapenêmicos incluem as serinocarbapenemases, MBLs e algumas oxacilinas (Nordmann; Poirel, 2019; Queenan; Bush, 2007).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), um tipo de β -lactamase da classe A de Ambler codificada pelo gene *bla_{KPC}*, foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos no final da década de 1990. É a enzima mais disseminada desse grupo, associada a altas taxas de mortalidade (Bush, 2018). Atualmente, apenas combinações que incluem avibactam, vaborbactam e relebactam demonstram eficácia na inibição dessas enzimas (Coppola et al., 2022; Tompkins; van Duin, 2021). A busca por potenciais inibidores de β -lactamases é uma das principais estratégias na investigação de terapias alternativas

(Theuretzbacher et al., 2020). As ERC produtoras de KPC se disseminaram globalmente, estabelecendo essa carbapenemase como a mais prevalente entre *Enterobacterales* nos Estados Unidos, Europa e América Latina (Satlin et al., 2022).

As MBLs utilizam um ou dois íons de zinco para ativar moléculas de água, permitindo a hidrólise de quase todos os tipos de BLAs, o que as tornam uma ameaça crescente. A prevalência global de *Enterobacterales* produtoras de carbapenemases (EPC) está em ascensão, com uma tendência acentuada de isolados produtores de MBLs. Os principais representantes deste grupo incluem a *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM), a *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase* (VIM) e a *imipenemase* (IMP) (Potter; D'Souza; Dantas, 2016), codificadas, respectivamente, pelos genes *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}*, sendo as mais frequentemente disseminadas. Dada a rápida propagação dessas enzimas e as opções limitadas de tratamento, a NDM merece atenção especial (Coppola et al., 2022, Tompkins; van Duin, 2021).

As oxacilinas são enzimas que também utilizam serina em seu sítio ativo para catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico. Entre essas, destacam-se as carbapenemases do tipo OXA-*like*, que possuem a capacidade de degradar carbapenêmicos. A enzima OXA-48-*like*, codificada pelo gene *bla_{OXA-48-like}*, é a representante mais comum desse grupo, encontrada em diversas espécies da ordem *Enterobacterales*. No que tange ao tratamento, somente combinações que incluem avibactam demonstram eficácia contra essas enzimas (Coppola et al., 2022, Tompkins; van Duin, 2021).

2.3.1. *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

A *K. pneumoniae* é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, normalmente presente na microbiota intestinal, mas que pode atuar como patógeno oportunista, causando infecções graves em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (ECDC, 2024). Estima-se que seja responsável por 20 a 30% das pneumonias nosocomiais nas Américas e está entre os principais isolados em casos de bacteremia Gram-negativa (WHO, 2024).

O principal mecanismo de resistência em *K. pneumoniae*, com implicações significativas para a saúde pública, é a resistência aos carbapenêmicos. A enzima KPC

é a principal responsável por esse fenótipo de resistência. Cepas KPC demonstram elevada resistência não apenas a todos os BLAs, mas também à maioria das outras classes de ANTs (Seibert et al., 2014).

As carbapenemases da classe A foram identificadas de forma esporádica em isolados clínicos desde a década de 1980, geralmente como enzimas cromossômicas. A primeira cepa contendo a carbapenemase KPC-1, localizada em um plasmídeo, foi detectada na Carolina do Norte em 1996 (Yigit et al., 2001). No entanto, essas cepas permaneceram raras nos Estados Unidos da América até 2005, quando surtos de *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC foram relatados em vários hospitais de Nova York e Nova Jersey. A partir desse momento, a disseminação dessas cepas se expandiu para diversas regiões do mundo, facilitando a troca genética entre diferentes espécies de enterobactérias (Nordmann et al., 2014).

Relatórios globais indicam altos níveis de resistência em bactérias frequentemente associadas a casos de sepse em ambientes hospitalares, como *K. pneumoniae* e *Acinetobacter* spp. Antibióticos de última linha, como os carbapenêmicos, são essenciais para o tratamento dessas infecções graves. No entanto, dados recentes revelam que as sepses causadas por *K. pneumoniae* frequentemente apresentam resistência aos carbapenêmicos, aumentando o risco de morte por infecções intratáveis (OPAS, 2021).

Nos últimos anos, além do aumento na incidência de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ANTs, houve a disseminação de uma nova variante conhecida como *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKP). A hvKP é capaz de causar infecções graves em indivíduos tanto saudáveis quanto imunocomprometidos. Caracterizada por sua alta invasividade, a maioria das infecções por essa variante se origina na comunidade (Struve et al., 2015). Em 2024, a OMS relatou uma crescente identificação de cepas de *K. pneumoniae* hvKP-ST23 que carregam genes de resistência aos carbapenêmicos. A seleção desses isolados resistentes a ANTs de última linha, como os carbapenêmicos, demanda a utilização de tratamentos antimicrobianos alternativos, os quais podem não estar disponíveis em diversos contextos (WHO, 2024).

Segundo a OMS, no documento *Bacterial Priority Pathogens List* (2024), a *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos é classificada como de prioridade crítica para a pesquisa e descoberta de novos agentes antimicrobianos. Essa categorização

reflete a ameaça significativa que representa para a saúde pública, dada a escassez de opções de tratamento disponíveis. A bactéria é considerada prioritária não apenas por sua capacidade de transferir genes de resistência, mas também pela gravidade das infecções e doenças que causa, resultando em elevada morbidade e mortalidade, além de seu impacto global significativo (WHO, 2024). *K. pneumoniae* figura entre os seis principais patógenos responsáveis por quase 1 milhão de mortes atribuídas à RAM (Murray et al., 2022).

A emergência de cepas resistentes a ANTs de última linha, como os carbapenêmicos, exige a implementação de opções alternativas de tratamento antimicrobiano, que podem não estar disponíveis em diferentes contextos. Assim, é imperativo desenvolver novas abordagens terapêuticas para mitigar o risco apresentado por bactérias resistentes a esses medicamentos.

2.4. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia refere-se à engenharia e manipulação controlada de partículas em escala nanométrica, tipicamente entre 1 e 100 nm, permitindo sua reorganização em nanosistemas com funções otimizadas (Yusuf et al., 2023). As nanopartículas (NPs), fruto dessa abordagem tecnológica, exibem propriedades aprimoradas, como alta estabilidade e capacidade de auto-organização. Elas são altamente versáteis e podem ser ajustadas para adquirir características específicas, incluindo uma área de superfície significativamente maior em comparação com materiais convencionais, o que potencializa sua eficácia em diversas aplicações (Kango et al., 2013).

A nanotecnologia é um dos campos de pesquisa e desenvolvimento mais dinâmicos, com avanços substanciais em áreas como biomedicina, eletrônica e engenharia mecânica. As nanopartículas têm despertado grande interesse científico devido às suas propriedades físico-químicas excepcionais, que se devem principalmente às suas pequenas dimensões, formato e características de superfície (Jamkhane et al., 2019), além de sua elevada flexibilidade (Vishwanath; Negi, 2021). Na área farmacêutica, a nanoestruturação permite, ainda, a redução da dose e frequência de administração de medicamentos, o que diminui efeitos colaterais e melhora o perfil farmacocinético. Adicionalmente, otimiza parâmetros importantes como solubilidade e estabilidade dos fármacos, ampliando a eficácia terapêutica (Sousa et al., 2020; Yusuf et al., 2023).

O uso de NPs como sistemas de liberação de fármacos contra bactérias resistentes oferece uma estratégia promissora, aproveitando a atividade antibacteriana tanto dos antimicrobianos quanto das próprias NPs (Lee et al., 2019). As NPs podem atuar por diversos mecanismos antibacterianos, incluindo a indução de estresse oxidativo, a liberação de íons metálicos e mecanismos não oxidativos. A ativação de múltiplos modos de ação pelas NPs amplia seu espectro antimicrobiano e pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento de resistência bacteriana. Estudos recentes mostram que as NPs são eficazes contra patógenos prioritários listados pela OMS (Adeniji et al., 2022). Além disso, as NPs funcionalizadas com agentes antimicrobianos têm potencial para combater a RAM ao aumentar a captação intracelular e reduzir o efluxo de fármacos, além de inibir a formação de biofilmes (Pelgrift; Friedman, 2013).

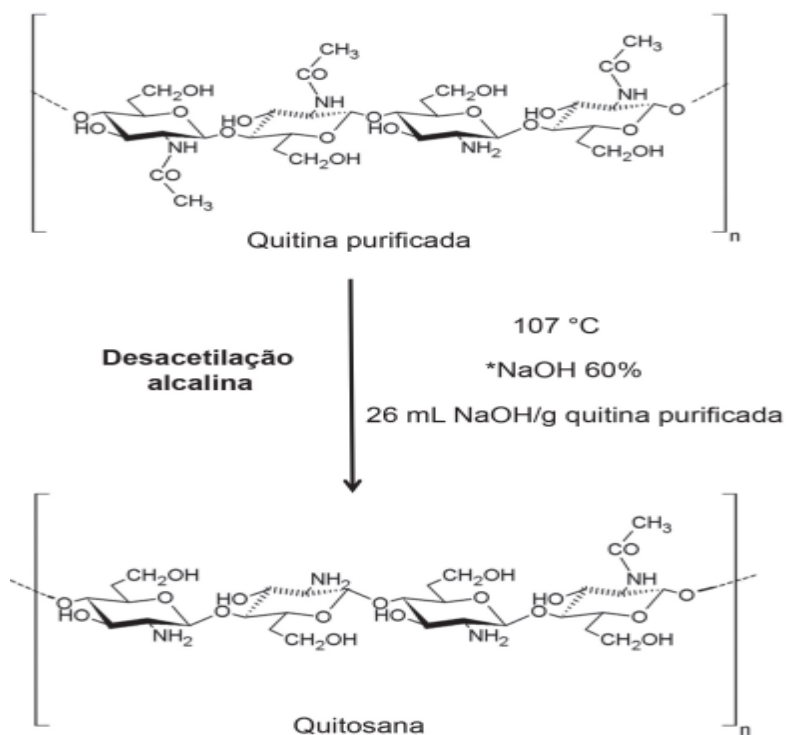
As NPs podem ser classificadas em orgânicas e inorgânicas, cada uma apresentando características específicas que as tornam adequadas para diferentes aplicações. As NPs orgânicas incluem polímeros como a quitosana (QT) e o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), além de lipossomas, constituídos essencialmente por fosfolipídios. Já as NPs inorgânicas incluem metais e óxidos metálicos, como as nanopartículas de prata, ouro e óxido de zinco, reconhecidas por sua capacidade de induzir estresse oxidativo e outros mecanismos antimicrobianos (Adeniji et al., 2022).

Entre as vantagens das NPs orgânicas estão sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e menor toxicidade, o que as torna ideais para aplicações médicas; no entanto, podem apresentar menor estabilidade física e uma taxa de liberação de fármacos menos controlada em comparação com as inorgânicas (Hetta et al., 2023). Em contrapartida, as NPs inorgânicas são extremamente estáveis e possuem ação antimicrobiana intrínseca, mas podem apresentar toxicidade mais elevada (Pelgrift; Friedman, 2013). Ambas as classes de NPs têm sido extensivamente investigadas como alternativas promissoras para enfrentar a RAM, aproveitando suas propriedades específicas para inibir bactérias resistentes e minimizar os desafios associados à resistência a múltiplos fármacos (Essa et al., 2022).

2.4.1. Nanopartículas de quitosana

A quitosana (QT) é um aminopolissacarídeo linear obtido por meio da desacetilação parcial da quitina, sob condições alcalinas (Figura 6).

Figura 6 – Obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina.



Fonte: Felipe (2017)

Por sua vez, a quitina, considerada o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, após a celulose, é um polímero encontrado no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos (Ardean et al., 2021; Zacaron et al., 2023). A QT é formada por unidades repetidas de β - (1,4) 2-amino 2-desoxi-D-glicose e β - (1,4) 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, com presença de grupos amino e hidroxila primários e secundários (Donalisio et al., 2018). É considerada uma base fraca com valor de $\text{pK}_a = 6,5$, solúvel em soluções ácidas em virtude da protonação dos grupamentos amino. Contudo, perde a carga e se precipita em meios neutro e alcalino (Tavares et al., 2020).

A QT apresenta características promissoras para utilização na área farmacêutica, incluindo as características de biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e bioadesividade (Zacaron et al., 2023). Ademais, possui diversas propriedades biológicas, tais como atividades anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, antitumoral e antimicrobiana (Confederat et al., 2021, Rashki et al., 2021). Assim, esse polímero vem sendo amplamente empregado como biomaterial para o preparo de sistemas de liberação

de fármacos, principalmente sistemas nanoestruturados (Maravieski, 2019; Rajivgandhi et al., 2021) e em aplicações antibacterianas (Su et al., 2021).

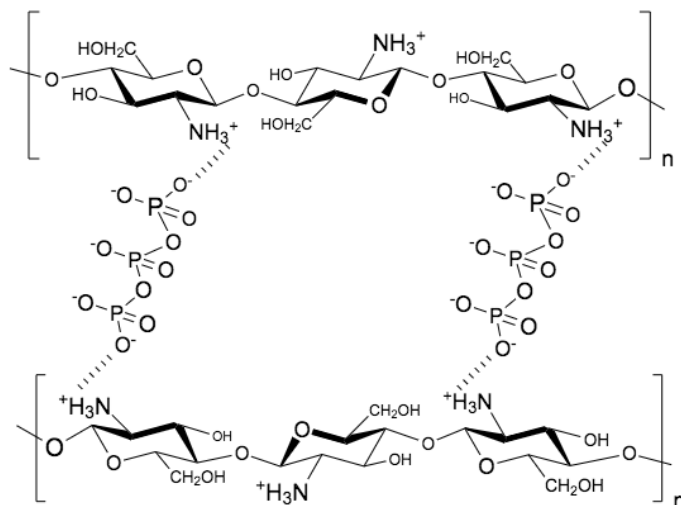
A ação antibacteriana da QT não está totalmente esclarecida e várias hipóteses foram propostas tendo como base sua natureza catiônica, dentre elas: (I) estudos mostram que interações iônicas e eletrostáticas entre agentes antibacterianos carregados positivamente e carga negativa da membrana celular superficial de bactérias/fungos podem danificar as membranas e promover aumento da permeabilidade da mesma, consequentemente vazamento de componentes do citoplasma e morte celular (Zacaron et al., 2023); (II) a possível ação de atividade suprimida de RNAm, causada por ligação intranuclear de QT ao DNA do microrganismo (Abdelkader et al., 2017); (III) outro efeito da QT é a quelação específica de íons metálicos como Ca^{+2} e Mg^{+2} , que desempenham um papel importante no metabolismo bacteriano; (IV) finalmente, outra hipótese é a possível interrupção das vias de geração de energia, uma vez que a QT forma uma camada impermeável ao redor da célula, que impede que nutrientes e oxigênio alcancem seu interior (Delattre, 2017; Rashki et al., 2021).

Vários fatores podem influir na atividade antibacteriana da QT, fatores ditos intrínsecos, como suas fontes (cascas de insetos, fungos ou crustáceos), a concentração, o peso molecular, o grau de desacetilação, e fatores extrínsecos, englobando pH do ambiente, o tipo e a sensibilidade dos microrganismos alvo, a composição química do substrato, dentre outros (Ardean et al., 2021).

Diferentes metodologias podem ser empregadas para a preparação de nanopartículas constituídas de QT. As abordagens básicas consistem nas técnicas de emulsificação, precipitação, reticulação iônica ou covalente, ou combinações destas.

Nesse contexto, desde sua introdução por Calvo et al. (1998), a técnica de gelificação iônica tem sido a mais amplamente utilizada, uma vez que é uma metodologia simples, de baixo custo, ecologicamente amigável e com potencial de escalonamento (Desai et al., 2016). Essa técnica está fundamentada na ocorrência de interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados da QT e compostos carregados negativamente, os quais atuam como agentes de reticulação (ou contra-íons), no caso o tripolifosfato de sódio (TPP); essa abordagem foi utilizada para o preparo de NPs poliméricas de QT neste estudo (Figura 7).

Figura 7 - Representação esquemática da interação entre a quitosana e o tripolifosfato de sódio no processo de gelificação iônica



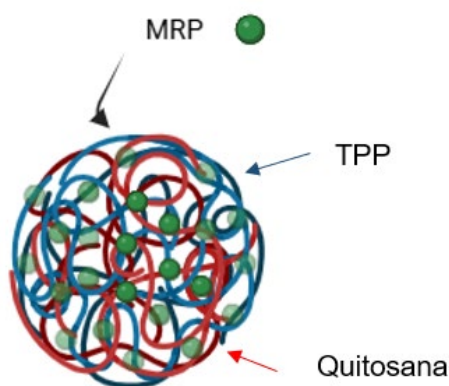
Fonte: Zacaron et al., 2023.

As NPs poliméricas se destacam em virtude da elevada estabilidade durante o armazenamento, bem como no ambiente fisiológico (Silva et al., 2020). Além disso, grande parte dos processos produtivos é facilmente escalonável, o que tem despertado o interesse da indústria farmacêutica (Begines et al., 2020; Silva et al., 2020).

Foram desenvolvidas NPs de QT contendo óleo essencial das folhas de goiabeira com notável atividade frente a *K. pneumoniae* multirresistente. O estudo revelou que a QT de baixo peso molecular e com um grau de desacetilação de 75% foi capaz de potencializar a ação antibacteriana do óleo essencial (Zhang et al., 2020).

Por outro lado, NPs de QT contendo MRP exibiram atividade mais pronunciada contra cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* sensíveis e resistentes ao MRP e *Staphylococcus aureus* sensível e resistente à meticilina, quando em comparação ao MRP livre (Abdelkader et al., 2017). No entanto, não encontramos estudos com avaliação da atividade antibacteriana de NPs de QT com MRP contra cepas clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e NDM. Portanto, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver uma formulação nanoestruturada, constituída por QT, como forma de obter uma alternativa terapêutica inovadora frente a *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Capítulo I). A Figura 8 ilustra a possível estrutura dessas NPs.

Figura 8 – Nanopartícula de quitosana contendo meropenem



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

2.4.2. Lipossomas

Os lipossomas são sistemas de entrega nanoestruturados, constituídos por vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que mimetizam a estrutura das membranas celulares. Graças à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, esses veículos oferecem uma plataforma altamente versátil para o transporte de agentes terapêuticos (Andra et al., 2022). Os lipossomas podem ser facilmente funcionalizados com ligantes de direcionamento, como anticorpos, peptídeos ou outras biomoléculas, o que permite uma entrega seletiva e específica, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais. Além disso, possuem a capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos no seu núcleo aquoso quanto aqueles hidrofóbicos nas camadas lipídicas, ampliando o escopo de moléculas que podem ser transportadas. Essa versatilidade torna os lipossomas úteis em diversas áreas, incluindo terapia gênica e entrega de vacinas, onde a entrega específica é crucial para otimizar a resposta terapêutica (Guimarães et al., 2021).

O uso de lipossomas na entrega de ANTs é uma estratégia promissora, pois facilita a penetração em barreiras de biofilme, modula a liberação controlada do ANT e direciona a ação de forma específica para os locais de infecção (Alavi et al., 2017; Zahra et al., 2017).

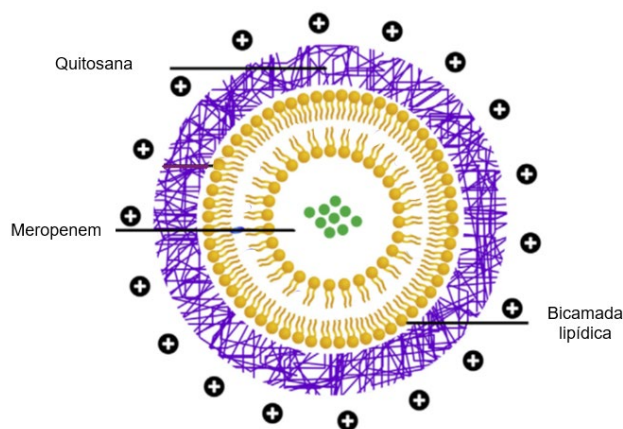
Em estudo realizado por Zahra et al., formulações lipossomais de MRP foram mais eficazes que o MRP livre contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ANTs. No estudo, os autores reportaram que a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do lipossoma encapsulado com MRP foi notavelmente mais potente contra todas as cepas, clínicas e de referência, em comparação com o MRP livre (6,25 µg/mL *versus* 100,0 µg/mL). Além disso, o lipossoma contendo MRP erradicou completamente o biofilme em todas as cepas testadas (Zahra et al., 2017).

A eficácia de lipossomas contendo MRP também foi testada frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo que as formulações catiônicas apresentaram melhor eficácia. Nesse caso, a CIM dos lipossomas com MRP foi 2 a 4 vezes menor do que as do fármaco livre (Drulis-Kawa et al., 2006). De fato, a maioria dos estudos publicados concorda que os ANTs encapsulados são mais eficazes na prevenção ou erradicação da formação de biofilme do que sua contraparte de fármaco livre (Zahra et al., 2017).

A superfície dos lipossomas pode ser funcionalizada com ligantes específicos com o intuito de atribuir uma função ou característica específica para o mesmo. Nessa perspectiva, lipossomas revestidos com QT podem apresentar um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, maior interação com membranas celulares, além de maior controle na liberação do fármaco encapsulado (Yang et al., 2015). No caso da encapsulação de antimicrobianos, o revestimento com QT proporciona um envoltório com cargas positivas, favorecendo a interação dos lipossomas para a membrana celular bacteriana carregada negativamente, contribuindo para o aumento da atividade do fármaco (Alavi et al., 2017).

Assim, um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver lipossomas revestidos com QT para a encapsulação do MRP, visando obter uma alternativa terapêutica para o enfrentamento de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Capítulo II). A Figura 9 ilustra a provável estrutura desse carreador.

Figura 9 – Meropenem encapsulado em lipossoma revestido com quitosana



Fonte: Adaptado de Alavi (2017)

2.4.3. Nanopartículas de prata/quitosana

A busca por sistemas alternativos economicamente viáveis para combater infecções bacterianas, além dos tratamentos ANTs tradicionais, representa um desafio global. Nesse contexto, estudos demonstram que NPs metálicas possuem atividade antibacteriana e têm sido utilizadas no controle de doenças infecciosas (Rai et al., 2009; Schaller et al., 2004). Esses sistemas oferecem benefícios como aumento da estabilidade química, controle da liberação do agente encapsulado, direcionamento e otimização da biodisponibilidade, o que contribui para melhorar a eficácia, reduzir efeitos adversos e aumentar a internalização celular (Huh; Kwon, 2011; Rashki et al., 2021).

As nanopartículas de prata (AgNPs) se destacam entre as nanoestruturas descritas devido à elevada atividade antibacteriana dos íons prata liberados em meio aquoso, bem como ao tamanho reduzido, que aumenta a área de superfície de contato (Helmlinger et al., 2016; Lok et al., 2007; Vishwanath; Negi, 2021). Um dos mecanismos propostos para a ação bactericida das AgNPs é seu acúmulo nas paredes celulares dos microrganismos, onde os íons Ag^+ se ligam à membrana bacteriana de carga negativa. Esse processo altera a estrutura lipídica da membrana, formando poros e aumentando sua permeabilidade, o que compromete as funções respiratórias da célula. Além disso, a presença de AgNPs induz à formação de espécies reativas de oxigênio, amplificando os danos celulares (Campo-Beleño et al., 2022; Chicea et al., 2023; Huh; Kwon, 2011).

Devido à rápida evolução das espécies bacterianas, o que limita a eficácia das terapias convencionais, muitos estudos têm sido conduzidos recentemente para explorar o potencial das AgNPs como alternativas promissoras.

O uso combinado de AgNPs com ANTs para tratamento antibacteriano possui precedentes importantes, pois essa associação pode resultar em efeitos aditivos ou sinérgicos, permitindo a redução das doses necessárias e, consequentemente, a diminuição da toxicidade dos compostos, ao mesmo tempo em que aumenta a eficácia antimicrobiana (Haji et al., 2022). Nesse contexto, os ANTs atuam em alvos específicos das células bacterianas, enquanto as AgNPs apresentam um mecanismo de ação mais amplo, atacando múltiplas estruturas celulares. Assim, o uso combinado desses agentes facilita uma interação inicial e uma afinidade de acúmulo nas paredes e membranas celulares. Essa associação oferece vantagens como a maior concentração do ANT no local de ação e a potencial prevenção de mecanismos de resistência, uma vez que as AgNPs podem desestabilizar barreiras celulares e proteínas de membrana, facilitando a ação do ANT tanto a nível de membrana quanto intracelular (Bruna et al., 2021).

A funcionalização de nanopartículas de prata (AgNPs) com quitosana (QT) tem despertado crescente interesse para aplicações médicas devido à biocompatibilidade e à menor citotoxicidade proporcionadas pela QT. Esse polissacarídeo natural, derivado da quitina, aprimora as propriedades das AgNPs ao combinar o efeito antibacteriano da prata com as características biológicas dos polímeros naturais, como a biodegradabilidade e a capacidade de interação com células e tecidos (Chicea et al., 2023; Zienkiewicz-Strzałka et al., 2019).

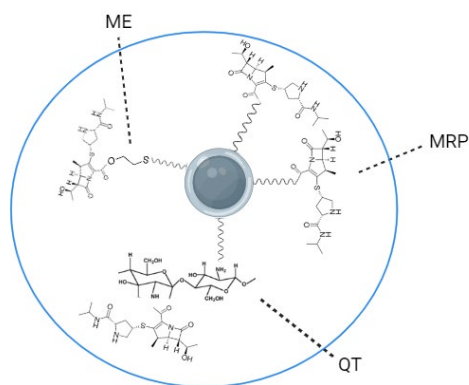
A QT contém grupos funcionais, como amino primários, que interagem com íons metálicos, estabilizando as NPs e conferindo propriedades antibacterianas. Essas interações ocorrem devido à afinidade entre o nitrogênio da QT e os orbitais da prata, criando sistemas funcionais com alta eficácia antibacteriana (Kalaivani et al., 2018). Além disso, os grupos amina da QT, quando protonados, podem alterar a permeabilidade das células bacterianas, contribuindo para suas propriedades antibacterianas.

Campo-Beleño et al. (2022) sintetizaram AgNPs usando uma abordagem baseada na química verde. Ao usar um extrato de folhas como agentes redutores, os pesquisadores mostraram que AgNPs biossintetizadas têm um efeito antibacteriano

potente, causando danos graves à parede celular, membrana e DNA, e induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, além de mostrar efeito antibacteriano sinérgico com ANT, entre eles o MRP. Nanopartículas de prata biogênicas, associadas ao MRP, foram testadas contra isolados multirresistentes de *A. baumannii* e os pesquisadores mostraram que a combinação apresentou um efeito sinérgico e aditivo, sendo possível reduzir a CIM de MRP de 4 a 8 vezes (Allend et al., 2024). Além disso, Shehabeldine et al. (2022) observaram que as nanopartículas de prata funcionalizadas com quitosana (AgNPQT) apresentaram uma maior zona de inibição bacteriana tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, além de baixa citotoxicidade (Campo-Beleño et al., 2022; Allend et al., 2024).

Portanto, neste estudo, uma das alternativas investigadas para o enfrentamento à *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase baseou-se no desenvolvimento de NPs constituídas pela associação entre prata e QT para a entrega de MRP (Capítulo III). A Figura 10 ilustra a possível estrutura deste carreador.

Figura 10 – Nanopartículas de prata/quitosana contendo meropenem



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver NPs contendo MRP visando a obtenção de alternativa terapêutica inovadora frente à *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver NPs poliméricas, lipídicas e metálicas contendo MRP;
- Caracterizar as NPs do ponto de vista físico-químico e morfológico;
- Avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* das NPs desenvolvidas frente a cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases dos tipos KPC e NDM.

CAPÍTULO I:

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO MEROPENEM

I. 1. MATERIAL E MÉTODOS

I. 1.1. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

Quitosana (QT) (CAS - *Chemical Abstracts Service* 9012-76-4); baixo peso molecular (50.000 – 190.000 g/mol); grau de desacetilação: 75 - 85% foi adquirida junto à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América); o tripolifosfato de sódio (TPP) (CAS 7758-29-4) e meropenem triidratado (MRP) (CAS 11947; massa molecular (MM) = 437,51 g/mol) foram adquiridos da Sigma Aldrich. O ácido acético glacial foi obtido da All Chemistry (São Paulo, SP, Brasil). O aminometilpropanol (AMP) foi adquirido da Sigma Aldrich.

I. 1.2 EQUIPAMENTOS

No Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) foram disponibilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica de precisão (Gehaka BG 2000, São Paulo, Brasil); Processador Ultrassônico 900W (Ultrasonic Processor, Yuchengtech); agitador magnético (Marte), pHmetro Gehaka PG 1800.

No Laboratório Magistral da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram disponibilizados: centrífuga 5000 RPM (rotação por minuto) (Kasvi), HPLC Waters Acquity Arc 2998, detector UV-Vis PDA2998. O equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) foi utilizado no Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária-Embrapa Gado de leite (Juiz de Fora, MG).

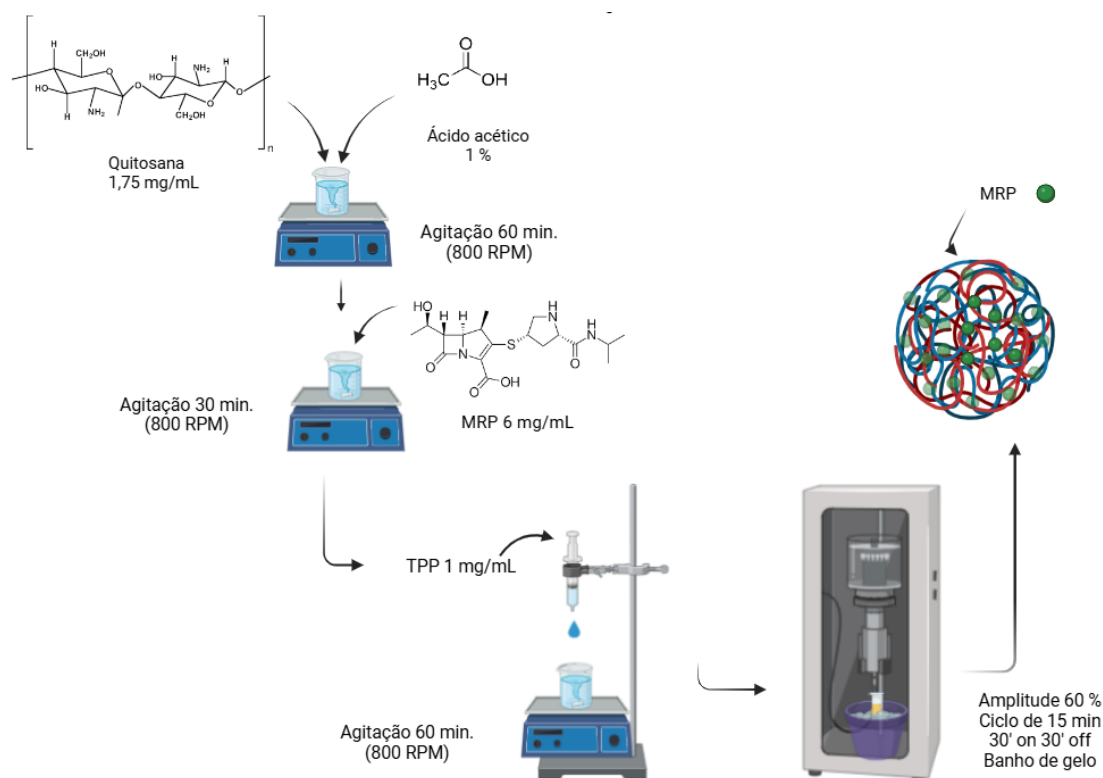
I. 1.3 MÉTODOS

I. 1.3.1 Desenvolvimento das nanopartículas

Para o preparo das NPs de QT contendo meropenem (NPQT-MRP) foi empregado o método de gelificação iônica proposto por Calvo et al (1998), com modificações. Inicialmente, a QT (1,75 mg/mL) foi dissolvida em 15 mL de solução de ácido acético a

1% (v/v), sob agitação de 800 RPM durante 60 minutos. Ao final, o pH foi ajustado para 4,7 com solução de AMP. Em seguida, o MRP (6,0 mg) foi adicionado e o sistema foi mantido em agitação por 30 minutos. Então, 6 mL de uma solução aquosa de TPP (1,0 mg/mL; pH 9,0) foi gotejada sob a solução contida no béquer, de modo a obtermos a razão QT:TPP igual a 5:2 e a agitação foi mantida por mais 60 minutos. Posteriormente, as NPs obtidas foram submetidas ao processador ultrassônico em banho de gelo, com amplitude de 60% por 15 minutos e ciclo *on/off* a cada 30 segundos (Ciro et al., 2020), conforme Figura 11.

Figura 11 – Síntese das nanopartículas de quitosana



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Para fins de comparação, foram preparadas NPs sem a adição do MRP, denominadas nanopartículas de quitosana “brancas” (NPQT-B). Ambas as formulações foram preparadas à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e em triplicata. As amostras foram armazenadas sob refrigeração para as análises posteriores.

I. 1.3.2 Caracterização das nanopartículas

I. 1.3.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)

O DHm e o Pdl foram avaliados por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS- do inglês - *Dynamic Light Scattering*) - utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°. O potencial Zeta foi determinado pela avaliação da mobilidade eletroforética. As determinações foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

I. 1.3.2.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada indiretamente, por meio do método de ultrafiltração-centrifugação. Para o preparo das amostras, as NPQT-MRP (n=3) foram previamente diluídas na proporção de 1:4 em água ultrapura, inseridas em unidades de filtração Amicon (MWCO 10,000, Millipore, Germany), e centrifugadas à 4000 RPM por 20 minutos. Os ultrafiltrados foram diluídos na proporção de 1:4 em água ultrapura.

O método analítico foi padronizado de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição. A quantificação do MRP foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) no equipamento Waters Acquity Arc 2998, detector UV-Vis PDA2998. Foi utilizada uma coluna de fase reversa Pursuit-C18 (150 mm x 3,9 mm) e fase móvel composta por tampão fosfato de potássio monopotássico 0,03 M, com pH ajustado para 3,0 e acetonitrila (90:10). O fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/minuto, o volume da injeção das amostras foi de 20 μ L; a temperatura do forno 25°C e a detecção foi realizada a 298 nm. Os espectros completos foram registrados na faixa de 210–400 nm. O sistema foi controlado pelo software da Waters que também realizou a coleta de dados do DAD e medidas quantitativas. O tempo de corrida de cada amostra foi de 7 minutos.

A EE foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE (\%) = \frac{\text{total de MRP adicionado} - \text{quantidade de MRP quantificado}}{\text{total de MRP adicionado}} \times 100$$

O resultado foi expresso como média $\pm$ desvio padrão.

Para a construção da reta analítica, as absorbâncias de soluções aquosas de MRP em concentrações entre 2,5 e 30 $\mu\text{g/mL}$ foram determinadas no mesmo comprimento de onda.

Previamente às análises, o efeito de adsorção do MRP ao filtro foi avaliado. Para tanto, as absorbâncias de soluções aquosas de MRP (10 $\mu\text{g/mL}$), submetidas ou não ao processo de ultrafiltração-centrifugação descrito acima, foram medidas em 298 nm. Além disso, visando investigar a interferência dos constituintes das NPs na absorbância do MRP, uma amostra de NPQT-B foi submetida aos mesmos processos descritos para as NPQT-MRP e, após a diluição específica, o espectro do ultrafiltrado foi avaliado na faixa de comprimento de onda especificada para a amostra por HPLC.

I. 1.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram submetidos a uma avaliação estatística por meio da análise de teste t de *student*, adotando um nível de significância de 0,05. A comparação entre as amostras foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.

I. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A QT destaca-se como um polímero natural amplamente utilizado na área biomédica devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, características que a tornam segura e eficaz para aplicações em sistemas de entrega de fármacos (Zacaron et al., 2023). Além disso, possui propriedades biológicas relevantes, como atividade antimicrobiana intrínseca, que pode potencializar a eficácia terapêutica de agentes antimicrobianos. Essas características fazem desse polímero uma escolha promissora para o desenvolvimento de NPs destinadas à entrega de ANT, sobretudo no contexto da RAM (Su et al., 2021).

Apresentamos abaixo, os resultados obtidos para o desenvolvimento e caracterização de NPs de QT contendo MRP.

I. 2.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

I. 2.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

Abaixo estão apresentados os resultados de DHm, Pdl e PZ para as formulações desenvolvidas (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores* de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersibilidade e Potencial Zeta para as NPQT-B e NPQT-MRP obtidas pelo método de gelificação iônica

	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)
NPQT-B	99,98 ± 1,56 _a	0,360 ± 0,01 _b	+24,20 ± 0,92 _c
NPQT-MRP	100,73 ± 2,71 _a	0,300 ± 0,02 _b	+26,97 ± 0,21 _c

NPQT-B: nanopartícula de quitosana branca; NPQT-MRP: nanopartícula de quitosana contendo meropenem.

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n=3)

****Letras iguais representam valores sem diferença estatisticamente significativa (teste *t student*)**

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A partir dos resultados apresentados na Tabela 1, podemos observar que o DHm para as NPQT-MRP foi menor do que valor reportado em outro estudo (247-375 nm, com Pdl entre 0,4-0,9) (Abdelkader et al., 2017). Além disso, nossos dados foram similares aos resultados descritos na literatura quando da utilização do método de gelificação iônica associado à sonicação (Floris et al., 2013; Tolentino et al., 2021). Isso pode indicar que a energia de ultrassom aplicada foi eficiente em facilitar a dispersão de aglomerados de partículas, por meio do processo de cavitação (Ciro et al., 2020), resultando em um sistema monodisperso ($Pdl \leq 0,3$). É importante ressaltar que o Pdl é um parâmetro crucial para a avaliação da homogeneidade de distribuição de tamanho de NPs e pode indicar a estabilidade física do sistema coloidal (Tavares et al., 2020).

É consenso na literatura de que a grande área de superfície das NPs é fator determinante para a interação com os microrganismos e rápida penetração nas células. Nesse sentido, de forma geral, quanto menor o DHm das partículas, maior a eficácia antibacteriana (Sharmin et al., 2021). Essa relação já foi comprovada em estudos que avaliaram a atividade antibacteriana de nanopartículas de QT (Ali.; Josh; Rajendran, 2010; Sarwar; Katas; Zin, 2014). Dessa forma, é possível que as NPs desenvolvidas nesse trabalho (DHm ~100 nm – Tabela 1) possam apresentar eficácia antibacteriana satisfatória.

Ademais, é interessante observar que não houve diferença estatística entre o DHm das NPQT-MRP comparativamente às NPQT-B. Esse dado sugere que a presença do MRP não contribui significativamente para o incremento do diâmetro das partículas, provavelmente devido a pequena proporção desse fármaco em relação à matriz polimérica.

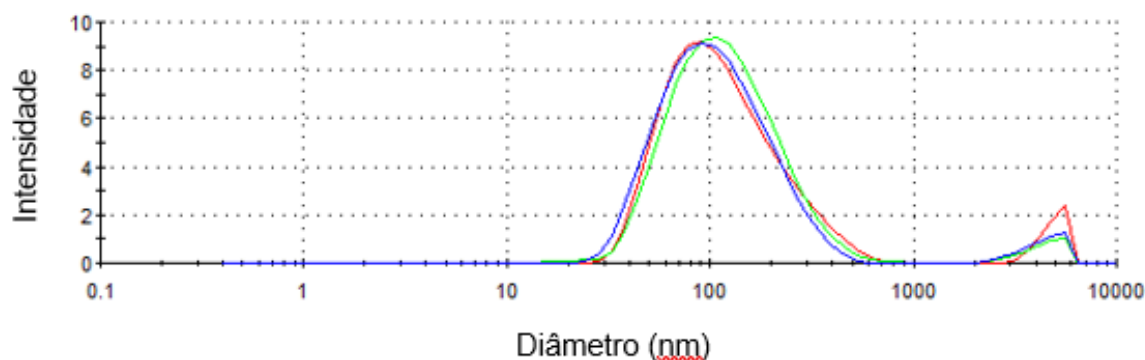
Adicionalmente, foi constatado um maior valor de Pdl para as NPs brancas ($0,360 \pm 0,01$) em detrimento àquelas contendo o MRP ($0,300 \pm 0,02$) (Tabela 1). Esse resultado é corroborado a partir dos gráficos de distribuição de tamanho demonstrados na Figura 12, nos quais é possível perceber uma distribuição bimodal mais acentuada para as NPQT-B (Figura 12a). Entretanto, apesar de um maior valor de Pdl, as NPQT-B podem

ser caracterizadas como um sistema monodisperso, já que o valor encontrado se situa $\leq 0,3$. Esse dado é particularmente importante, uma vez que, como já descrito, o Pdl está atrelado à estabilidade do sistema coloidal.

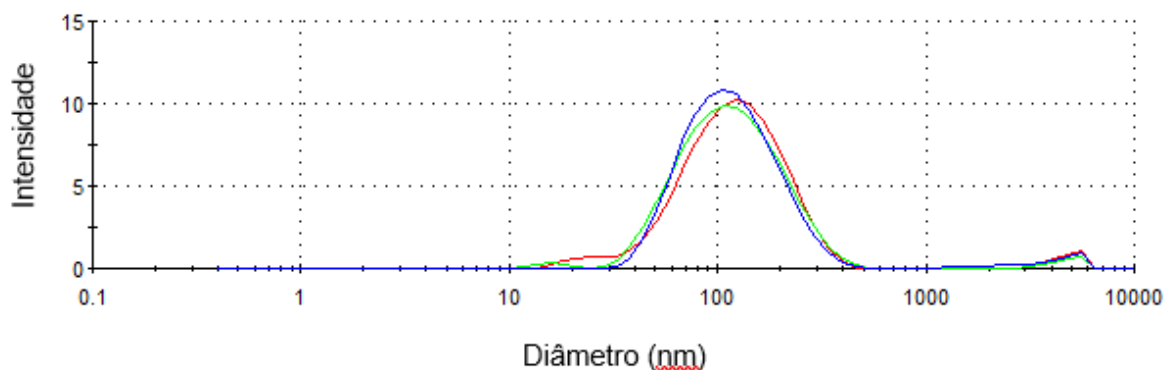
Figura 12 – Distribuição de tamanho das nanopartículas por intensidade (n=3).

(a) NPQT-B; (b) NPQT-MRP

(a)



(b)



NPQT-B: nanopartícula de quitosana branca; NPQT-MRP: nanopartícula de quitosana contendo meropenem.

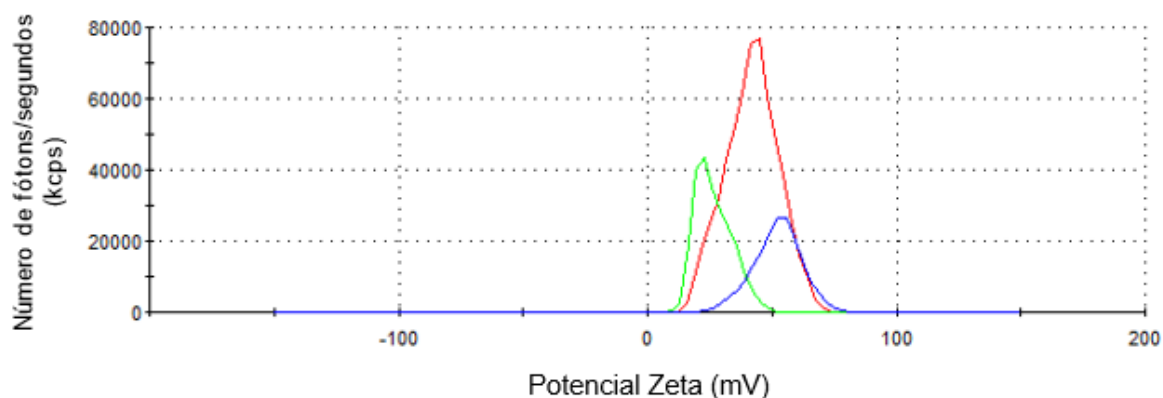
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

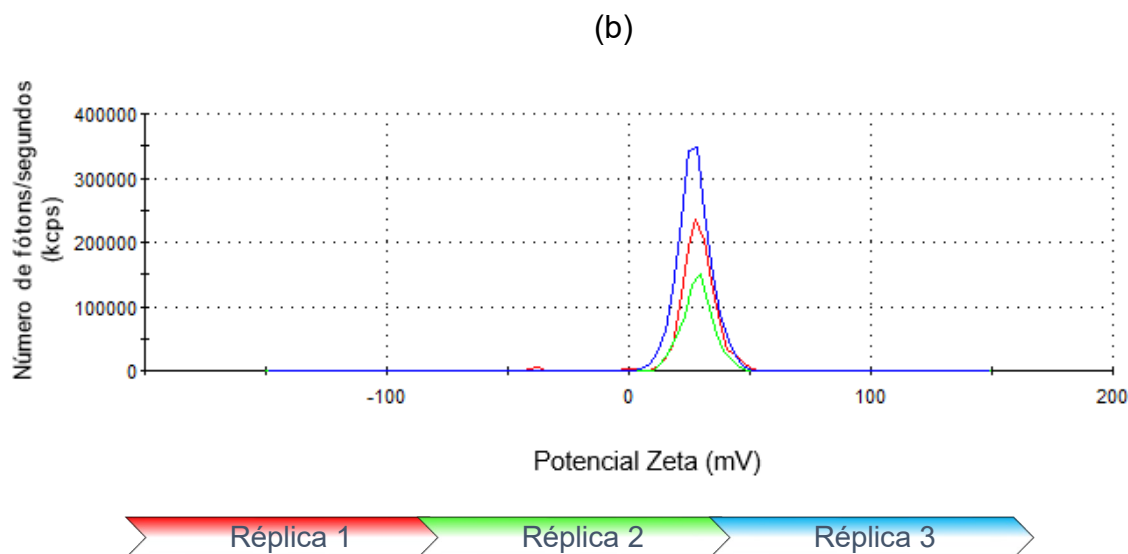
Em relação ao PZ, valores positivos foram encontrados. Esses resultados podem ser explicados devido à natureza da QT, um polímero que contém grupamentos amino

primários que existem sob a forma protonada após a solubilização da QT em meio ácido (Khanal et al., 2016). A literatura aponta que NPs com PZ de aproximadamente ± 30 mV propiciam elevada estabilidade coloidal ao sistema, devido à repulsão eletrostática entre as partículas em suspensão (Maravieski, 2019). Portanto, o valor encontrado para as NPQT-MRP ($+26,97 \pm 0,21$ mV - Tabela 1) pode ser indicativo de estabilidade coloidal. Além disso, por meio dos dados obtidos, observamos que não houve diferença estatística entre os valores de PZ entre as NPQT-B e as NPQT-MRP ($+24,20 \pm 0,92$ mV e $+26,97 \pm 0,21$ mV, respectivamente - Tabela 1). Esses dados podem sugerir que o MRP esteja localizado principalmente no interior da matriz polimérica. A esse respeito, existe a constatação de que, quando o fármaco está prioritariamente adsorvido à superfície das NPs de QT, há o bloqueio/neutralização de cargas positivas, resultando em diminuição dos valores de PZ (Amin; Boateng, 2022).

Ainda sobre o PZ, uma vez que um dos principais mecanismos de ação antibacteriana da QT está relacionado à interação eletrostática com a membrana celular dos microrganismos, a carga positiva é importante para a garantia dessa atividade. Nesse sentido, foi relatado que, quanto maior o valor de PZ, maior a eficácia antibacteriana das nanopartículas de QT (Ali; Josh; Rajendran, 2010). A Figura 13 traz os gráficos de distribuição do PZ das NPs.

Figura 13 – Gráfico de distribuição do potencial Zeta das nanopartículas (n=3)
(a) NPQT-B; (b) NPQT-MRP
(a)





NPQT-B: nanopartícula de quitosana branca; NPQT-MRP: nanopartícula de quitosana contendo meropenem.

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

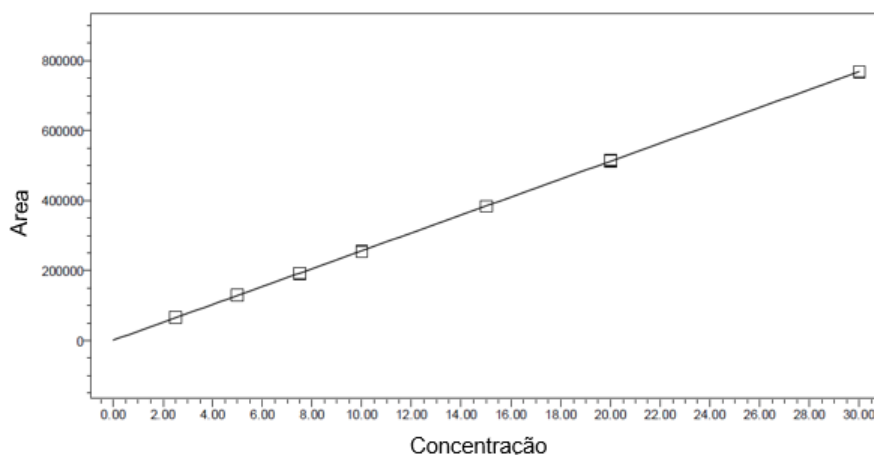
I. 2.1.2 Eficiência de EncapsulaçãoB

A encapsulação de fármacos em NPs de QT pode ser obtida por meio de interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (Ahmed; Aljaeid, 2016). Portanto, pensando em favorecer a interação entre o MRP e o polímero carregado positivamente, esse fármaco foi dissolvido diretamente na solução de QT. Nossa hipótese foi a de que, no valor de pH da referida solução (4,7), o MRP encontraria-se ionizado negativamente ($pK_a = 2,9$, referente ao grupamento ácido carboxílico), o que poderia favorecer a interação eletrostática MRP-QT e, conseqüentemente, a encapsulação do fármaco.

Previamente à determinação da EE, realizamos análises iniciais com o intuito de verificarmos possível interação do MRP com a membrana da unidade de filtração. Conforme descrito, as absorbâncias de duas diferentes soluções de MRP (10 $\mu\text{g/mL}$) submetidas (amostra 1) ou não (amostra 2) ao processo de ultrafiltração-centrifugação foram medidas. Como resultado, obtivemos valores semelhantes (0,524 para a amostra 1 e 0,525 para a amostra 2), indicando que não houve adsorção do MRP ao filtro. Dessa forma, os resultados obtidos para a EE não teriam a interferência desse possível efeito.

O ensaio de EE foi realizado por HPLC e primeiramente foi efetuada injeção da curva analítica de padrão de MRP, nas concentrações de 2,5 – 30,0 µg/mL. A curva analítica para avaliação da EE das NPQT-MRP foi construída em água ultrapura, sendo apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Curva analítica do padrão de meropenem por meio de HPLC.



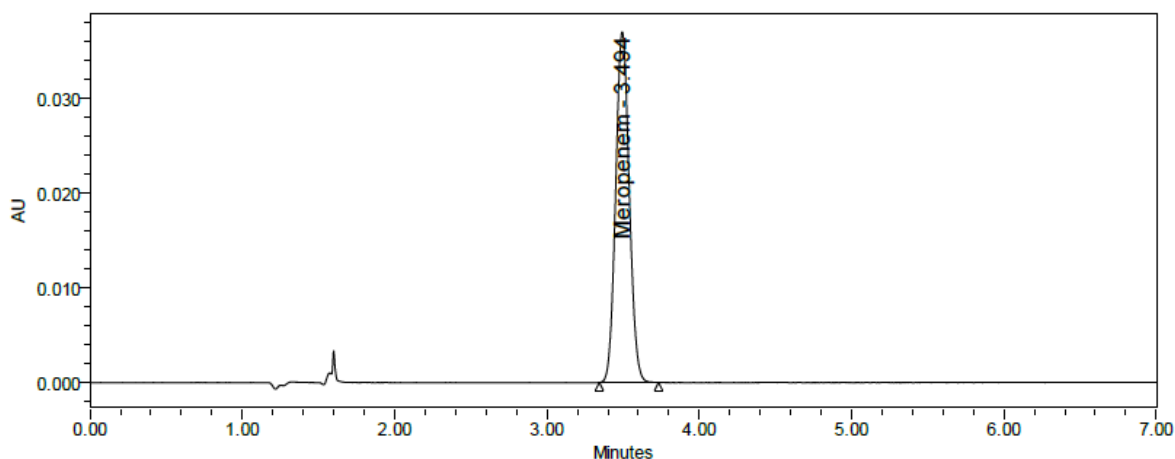
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A equação da reta para a EE de MRP foi obtida por meio da regressão linear. Os dados da curva foram $Y = 23138 X + 330,2$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0.999941$.

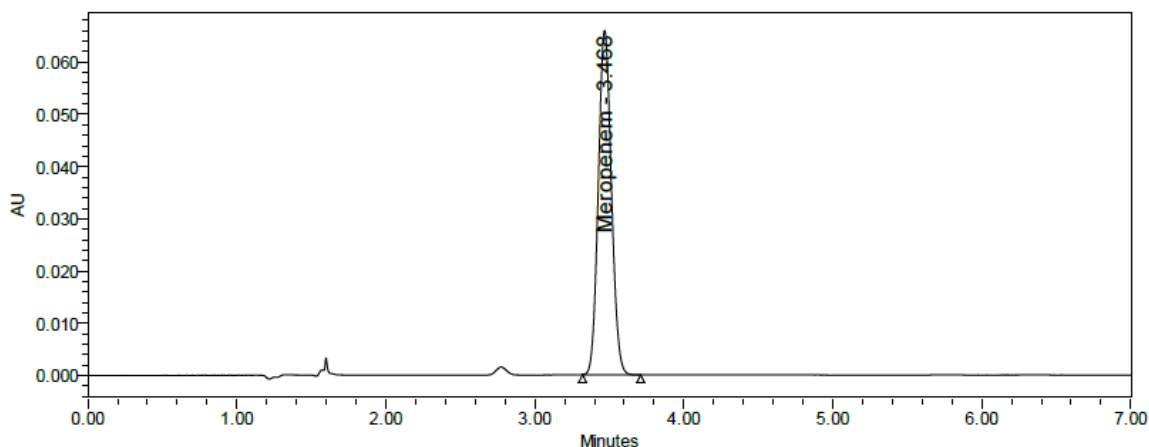
Em relação aos cromatogramas, obtivemos um pico bem resolvido em 298nm, com tempo de retenção próximo a 3 minutos e meio, dentro da faixa prevista (Figura 15).

Figura 15 – Cromatogramas referentes ao padrão de MRP(a) à 10 µg/mL (ponto central da curva analítica) e filtrado da NPQT-MRP (b)

(a)



(b)



MRP: meropenem; NPQT-MRP: nanopartícula de quitosana contendo meropenem

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Tabela 2 - Valor de Eficiência de Encapsulação para as NPQT-MRP

Amostras	Concentração μg/mL	EE (%)
NPQT-MRP	276,70 ± 5,2	3,15 ± 1,81

NPQT-MRP: nanopartícula de quitosana contendo meropenem

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

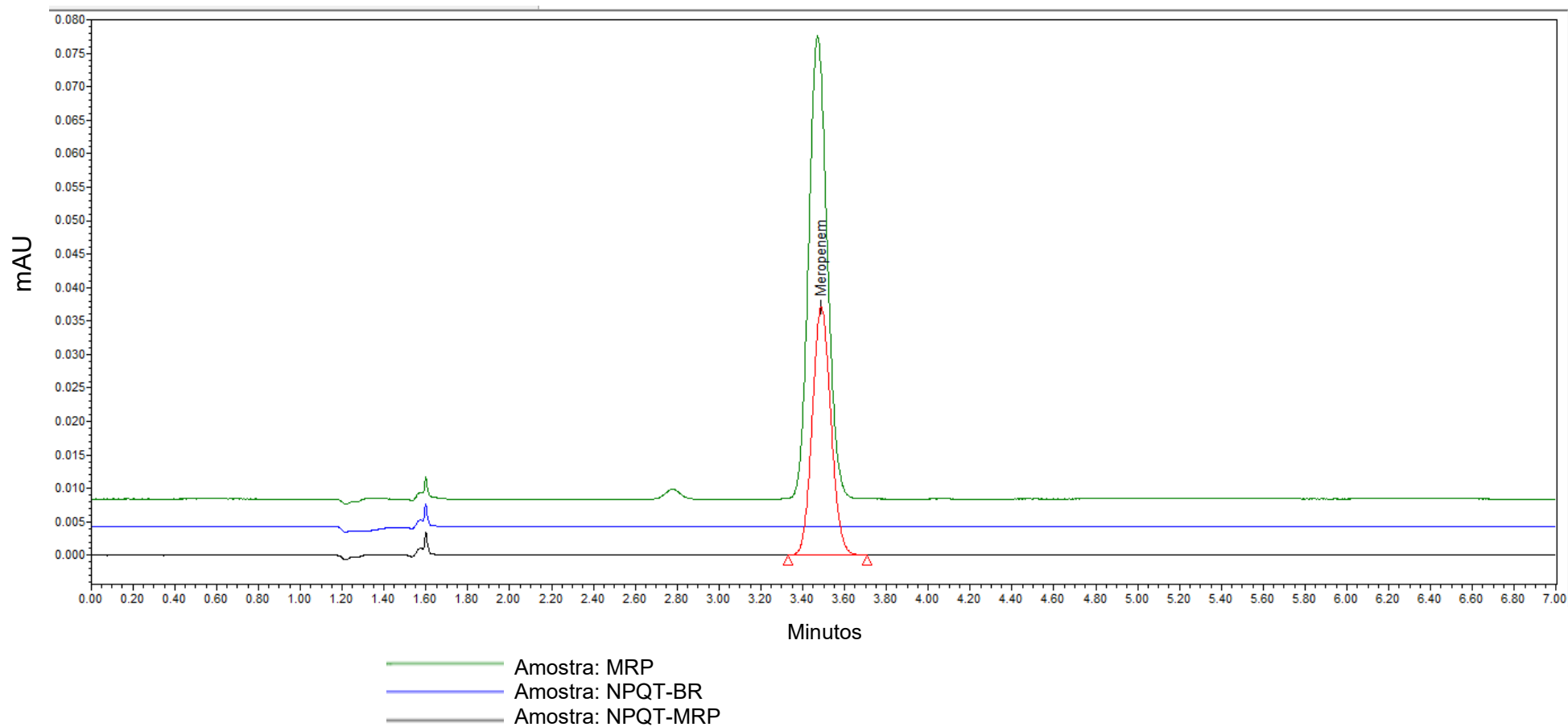
Contudo, obtivemos um baixo valor de EE ($3,15 \pm 1,81\%$), conforme Tabela 2. Esse valor foi menor que o obtido em outro estudo ($\sim 76\%$), no qual os pesquisadores avaliaram a encapsulação do MRP (3,5 mg) em NPs de QT:TPP (5:1) (Abdelkader et al., 2017). Os autores descreveram a utilização da QT com grau de desacetilação (GD) $\geq 90\%$ (em comparação com 75-80% para a QT utilizada em nosso trabalho), o que pode ter contribuído para a maior EE obtida no referido estudo. É importante esclarecer que o GD é um parâmetro chave em relação às propriedades físico-químicas e biológicas da QT, uma vez que representa a quantidade de grupamentos NH_2 que podem ser protonados em meio ácido (Zacaron et al., 2023).

Além disso, sugerimos que uma possível competição entre o TPP e o MRP pelas cargas positivas da QT possa ter contribuído para o valor de EE obtido em nosso trabalho. Nesse caso, nosso grupo de pesquisa, quando da padronização das condições de

preparo de NPs de QT-TPP, priorizou que a solução aquosa desse contra-íon fosse preparada em pH 9,0. Nesse valor, todos os grupamentos hidroxila do TPP estão ionizados, o que favorece a ocorrência do processo de reticulação e, com isso, a formação das nanoestruturas. Assim, devido à elevada densidade de cargas, é provável que a interação entre a QT e o TPP supere as possíveis interações eletrostáticas do polímero com o MRP. Ademais, vale notar que a relação QT:TPP padronizada em nosso trabalho foi de 5:2, enquanto a relação estabelecida no estudo citado acima foi igual a 5:1. Esse fato também pode ter contribuído para a menor EE obtida.

Além disso, avaliamos a interferência dos constituintes das NPs na absorbância do MRP. Na Figura 16 pode-se observar que não foi identificado nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção do MRP, comprovando a seletividade do método analítico para a quantificação desse analito. Com o objetivo de avaliar a seletividade do método, foi realizada a sobreposição de uma amostra branca (NPQT-B) e não houve interferência.

Figura 16 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de NPQT-MRP, NPQT-B e do padrão de meropenem



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Diante desses resultados, decidimos não prosseguir com os estudos envolvendo as NPs poliméricas compostas por QT. No entanto, considerando as propriedades desse polímero — especialmente sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e atividade antibacteriana promissora — optamos, pela continuidade do trabalho, por desenvolver novos sistemas nanoestruturados que incluíssem QT em sua formulação.

I. 3. CONCLUSÃO

Obtivemos NPs poliméricas de QT com características físico-químicas adequadas e condizentes com a literatura no que diz respeito ao DHm, Pdl e PZ. A síntese das NPs é relativamente simples e não requer equipamentos sofisticados, o que constitui uma vantagem quando em comparação a outros métodos de preparo de NPs. No entanto, a formulação não atingiu a EE esperada, sendo necessário implementar estratégias para melhoria dessa característica, as quais podem envolver o uso de diferentes tipos de QT e modificações em parâmetros-chave, como a relação QT:TPP. Assim, novos estudos serão conduzidos visando padronizar formulação nanoestruturada mais promissora.

CAPÍTULO II:

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO MEROPENEM

II. 1. MATERIAL E MÉTODOS

II.1.1. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

Os lipossomas foram sintetizados no laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

No Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) foram disponibilizados os seguintes reagentes: Quitosana (QT) (CAS 9012-76-4; baixo peso molecular (50.000 – 190.000 g/mol); grau de desacetilação (GD): 75 - 85% foi adquirida junto à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América); meropenem triidratado (MRP) (CAS 11947 MM = 437,51 g/mol) adquirido da Sigma Aldrich, o aminometilpropanol (AMP) foi adquirido da Sigma Aldrich.

No Laboratório de Farmacotécnica da UFMG, foram disponibilizados os seguintes reagentes: colesterol (CHOL) CAS 5788-5, (MM: 386,7 g/mol) da Sigma Life Science, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (MM: 734,039 g/mol) adquirido da Avanti Polar Lipids, Inc, álcool absoluto CAS 64-17-5 da Neon.

II.1.2. EQUIPAMENTOS

Foram disponibilizados os seguintes equipamentos: Equipamento Zetasizer Nano Series ZS90 Malvern, Ultracentrífuga Optima L-80 XP Ultracentrifuge – Beckman Coulter, Bombas de infusão Harvard Apparatus Holliston, Estados Unidos da América, conector T (Valco Instruments Company, Schenkon, Suíça), Liofilizador Liotop K105, agitador RO 5p S1, IKA, Labortechnik Staufen, Germany, pHmetro de bancada (Gehaka, PG 1800).

II.1.3. MÉTODOS

II. 1.3.1. Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados (n=3) pela técnica de nanoprecipitação em sistema microfluídico, com adaptações (Yu et al., 2009). A composição qualitativa dos lipossomas brancos (sem inclusão do ativo – LIP-BRA), bem como dos lipossomas contendo meropenem (LIP-MRP) está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição quali-quantitativa dos lipossomas

	Composição	LIP-BRA	LIP-MRP
Fase orgânica	Álcool absoluto	1,0 mL	1,0 mL
	DPPC	8,8 mg	8,8 mg
	CHOL	3,0 mg	3,0 mg
Fase aquosa	Água ultrapura	3,0 mL	3,0 mL
	Meropenem	-	3,9 mg

LIP-BRA: lipossoma branco; LIP-MRP: lipossoma contendo meropenem; DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina; CHOL: colesterol.

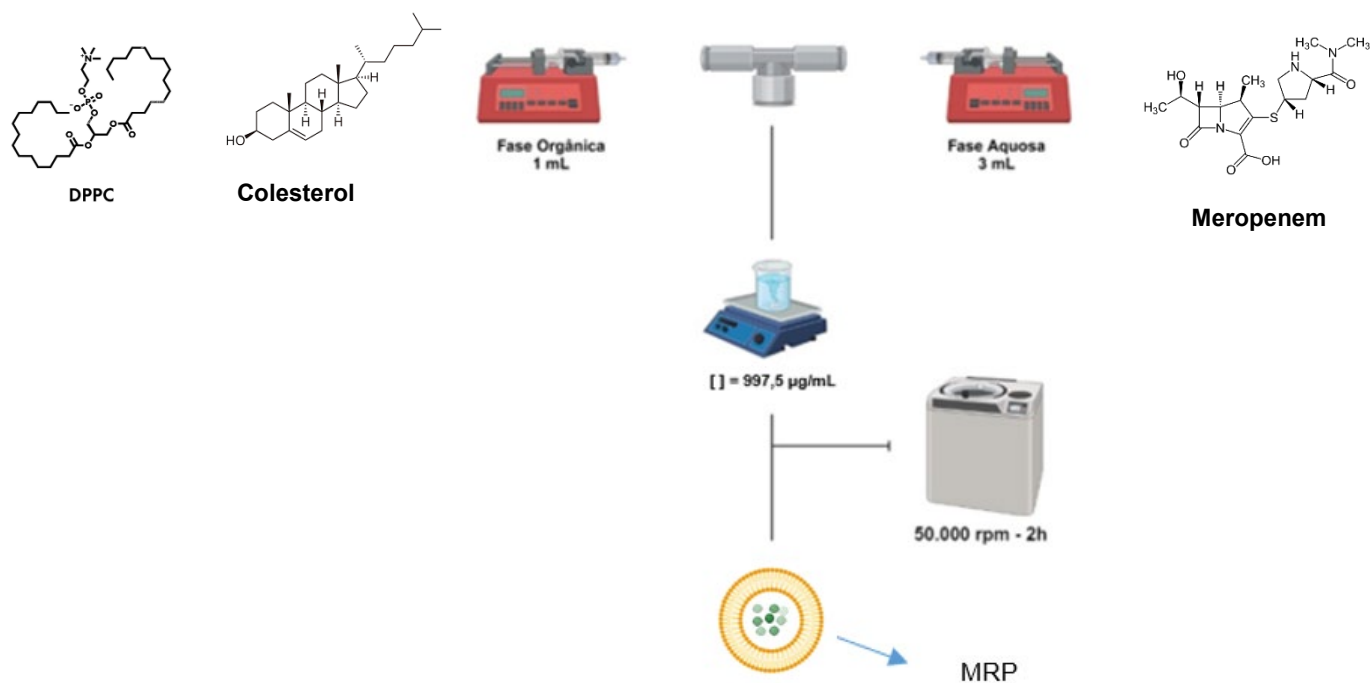
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Utilizamos DPPC/CHOL na proporção de 6:4. Os lipossomas com MRP (LIP-MRP) foram preparados a partir de duas fases distintas: uma fase orgânica (FO), composta por DPPC e CHOL, e uma fase aquosa (FA), contendo MRP solubilizado em água ultrapura. Ambas as fases foram preparadas separadamente. Na FO, os fosfolipídios foram adicionados a um tubo de polipropileno juntamente com álcool absoluto, sendo agitados em banho de ultrassom por 30 minutos, à temperatura ambiente, até a completa dissolução dos lipídeos. Para a FA, o MRP foi transferido para um balão volumétrico, completou-se o volume com água ultrapura, e a solução foi homogeneizada até completa solubilização do fármaco. Para o preparo de amostras sem o fármaco (LIP-BRA), utilizou-se apenas água ultrapura na FA.

A síntese dos lipossomas foi realizada utilizando um sistema de mistura com bombas de infusão. Uma das bombas foi carregada com uma seringa contendo a FO (1,0 mL), enquanto a outra recebeu uma seringa com a FA (3,0 mL). Ambas as bombas foram conectadas a um sistema conector em T Valco. O fluxo foi ajustado para manter uma pressão constante, com uma vazão final de 1 mL/min. As amostras foram coletadas sob agitação magnética de 500 RPM em temperatura ambiente. Após essa etapa, o sistema foi submetido à ultracentrifugação a 50.000 RPM por 2 horas na temperatura de 4°C, resultando na formação de um pellet de lipossomas e sobrenadante. O

sobrenadante (SOB-LIP) foi separado do pellet por inversão e, posteriormente, liofilizado para análises de EE. O processo de preparo está representado na Figura 17.

Figura 17 – Processo de preparo dos lipossomas por nanoprecipitação em sistema microfluídico



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

II. 1.3.2. Liofilização dos sobrenadantes

Primeiramente, o SOB-LIP foram pré-congelados com nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram transferidas para o liofilizador a -50°C por 24h. O pó liofilizado foi coletado para experimentos posteriores.

II. 1.3.3. Revestimento dos lipossomas com quitosana

Para a obtenção dos lipossomas revestidos (LIP-MRP-QT) foi inicialmente preparada uma solução de QT na concentração de 4,0 mg/mL. A QT foi pesada e dissolvida em solução de ácido acético a 1% (v/v) (Calvo et al., 1997), sob agitação de

800 RPM por 60 minutos. Ao final, o pH da solução foi ajustado para 4,7 com solução de AMP. O revestimento dos lipossomas foi realizado por gotejamento da solução de QT a 4,0 mg/mL, sobre a suspensão de lipossomas previamente obtida, com auxílio de seringa de 3,0 mL e agulha 25mm x 0,7mm, mantendo a proporção de 2:1 entre lipossomas e QT. Finalmente, o sistema foi mantido sob agitação de 500 RPM por 30 minutos à temperatura ambiente. Para fins de comparação, lipossomas sem o fármaco também foram revestidos, denominados LIP-BRA-QT.

II. 1.3.4. Caracterização dos lipossomas

II. 1.3.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)

O DHm e o Pdl foram avaliados por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*) utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°. O potencial Zeta foi determinado pela avaliação da mobilidade eletroforética. Para as leituras, as amostras foram diluídas, sendo utilizado 40 µL de amostra em 1,0 mL de água ultrapura. As determinações foram realizadas em triplicata, à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries pertencente ao Laboratório de Bioprodutos e Bioprocessos (CentralBio) da FF/UFJF). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

II. 1.3.4.2 Eficiência de encapsulação (EE)

A EE foi determinada de forma indireta, utilizando o método de ultrafiltração-centrifugação (Yang et al., 2015). Para isso, quantificou-se o MRP nos sobrenadantes liofilizados dos lipossomas, a fim de avaliar o quantitativo desse ANT que não foi encapsulado.

Para o preparo das amostras, os sobrenadantes liofilizados dos lipossomas (SOB-LIP) (n=3) foram reconstituídos em 4,0 mL de água ultrapura. Em seguida, uma alíquota de 500 µL dessa solução foi diluída em 2.500 µL de água ultrapura em um tubo de polipropileno. O sistema foi transferido para a unidade de filtração Amicon (MWCO

10.000, Millipore, Alemanha) e submetido à centrifugação a 4.000 RPM por 20 minutos. Após a centrifugação, 500 µL do filtrado foram coletados e diluídos em 2000 µL de água ultrapura, para posterior análise por HPLC, conforme condições descritas no Capítulo I.

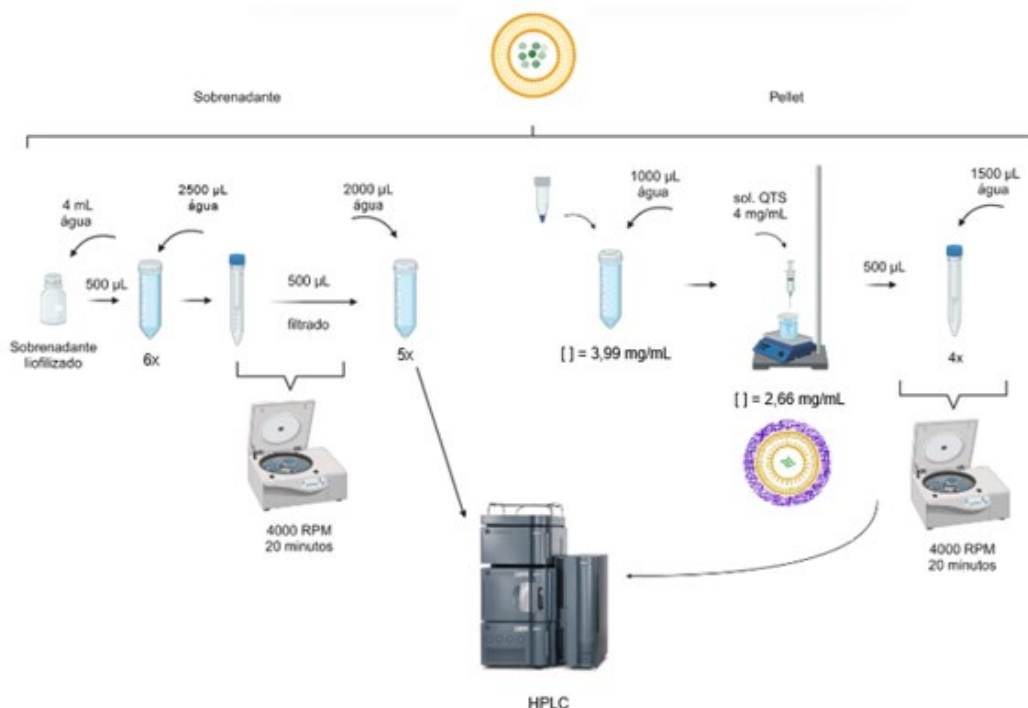
Para os LIP-MRP-QT, 500 µL da amostra foram adicionados a um tubo Amicon contendo 1500 µL de água ultrapura. O tubo foi centrifugado a 4000 RPM por 20 minutos, e a análise do conteúdo foi realizada por HPLC. O processo de preparo das amostras para a determinação da EE está representado na Figura 18.

A EE foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$EE (\%) = \frac{\text{total de MRP adicionado} - \text{quantidade de MRP quantificado}}{\text{total de MRP adicionado}} \times 100$$

O resultado foi expresso como média ± desvio padrão.

Figura 18 - Esquema do processo de preparo das amostras para avaliação da eficiência de encapsulação do meropenem nos lipossomas



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

II. 1.3.4.3. Avaliação do potencial antibacteriano *in vitro* dos lipossomas

Os ensaios microbiológicos para avaliação do potencial antibacteriano *in vitro*

foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas, FF/UFJF, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Silvana Alves e tutoria do doutorando Ygor Ferreira Garcia da Costa.

A avaliação do potencial antibacteriano foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), conforme descrito nos documentos CLSI M07-Ed12 e CLSI M100-Ed34 (CLSI, 2024_{a,b}) para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O estabelecimento da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático foram realizados utilizando o método proposto por Andrews (2001), com pequenas adaptações, incluindo a substituição do meio de cultura *IsoSensitest Agar* (ISA; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) pelo Ágar Müller-Hinton (AMH, Difco® Laboratories, Michigan, Estados Unidos da América).

II. 1.3.4.4. Cepas bacterianas e condições de armazenamento

Para a realização dos ensaios microbiológicos, foram selecionadas cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®) *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922) e do *National Collection of Type Cultures* (NCTC®) *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13438), produtora de carbapenemase do tipo KPC-3 (Woodford et al., 2008), e *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13443), produtora de metalo- β -lactamase do tipo NDM-1 (<https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/klebsiella-pneumoniae-90>, acesso em 22 out. 2024). A cepa *E. coli* (ATCC 25922) foi utilizada no estudo para validação dos métodos microbiológicos empregados.

As culturas bacterianas (matrizes) foram preservadas em suspensão, utilizando uma solução de armazenamento que consistia em meio de cultura e crioprotetor [meio TSB (do inglês, *Tryptic Soy Broth*) + 10% de glicerol (v/v)]. Para a preparação, 3 a 5 colônias de cada cepa foram inoculadas em 1 mL da solução, com o auxílio de uma alça calibrada estéril descartável de 10 μ L. As colônias foram cultivadas em AMH por 24 horas, em aerobiose, a 37 ± 2 °C. Posteriormente, os tubos plásticos com tampa de rosca apropriados para congelamento foram armazenados a uma temperatura aproximada de -80 °C até a realização dos ensaios microbiológicos.

II. 1.3.4.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos estabelecidos pelo CLSI, descritos nos documentos CLSI M07-Ed12 e CLSI M100-Ed34 (CLSI, 2024_{a,b}).

As soluções estoque (SEs) das amostras LIP-BRA, LIP-MRP e LIP-MRP-QT, bem como dos ANTs imipenem (IPM) e MRP, foram preparadas de acordo com as diretrizes do documento CLSI M100-Ed34 (CLSI, 2024_b) (Tabela 4). Todas as SEs das amostras e dos ANTs foram preparadas na concentração de 1 mg/mL.

O IMP e o MRP foram selecionados devido à sua relevância na pesquisa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos. Em termos de mecanismo de ação, tanto o IPM quanto o MRP atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana, interferindo na formação do peptidoglicano (Hilal-Dandan; Brunton, 2015).

Tabela 4 - Composição das SEs das amostras e ANTs preparadas e utilizadas na determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de microdiluição em caldo

Amostra	Volume (µL) Massa (mg)	Solvente	Diluyente	Concentração Final SEs (mg/mL)
LIP-BRA	84 µL	916 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
LIP-MRP	351 µL	649 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
LIP-MRP-QT	526 µL	474 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
MRP	1,0 mg	1000 µL H ₂ O _d	900 µL H ₂ O _d	1,0
IPM	1,0 mg	1000 µL Tampão fosfato 0,01 M pH 7,2	900 µL Tampão fosfato 0,01 M pH 7,2	1,0

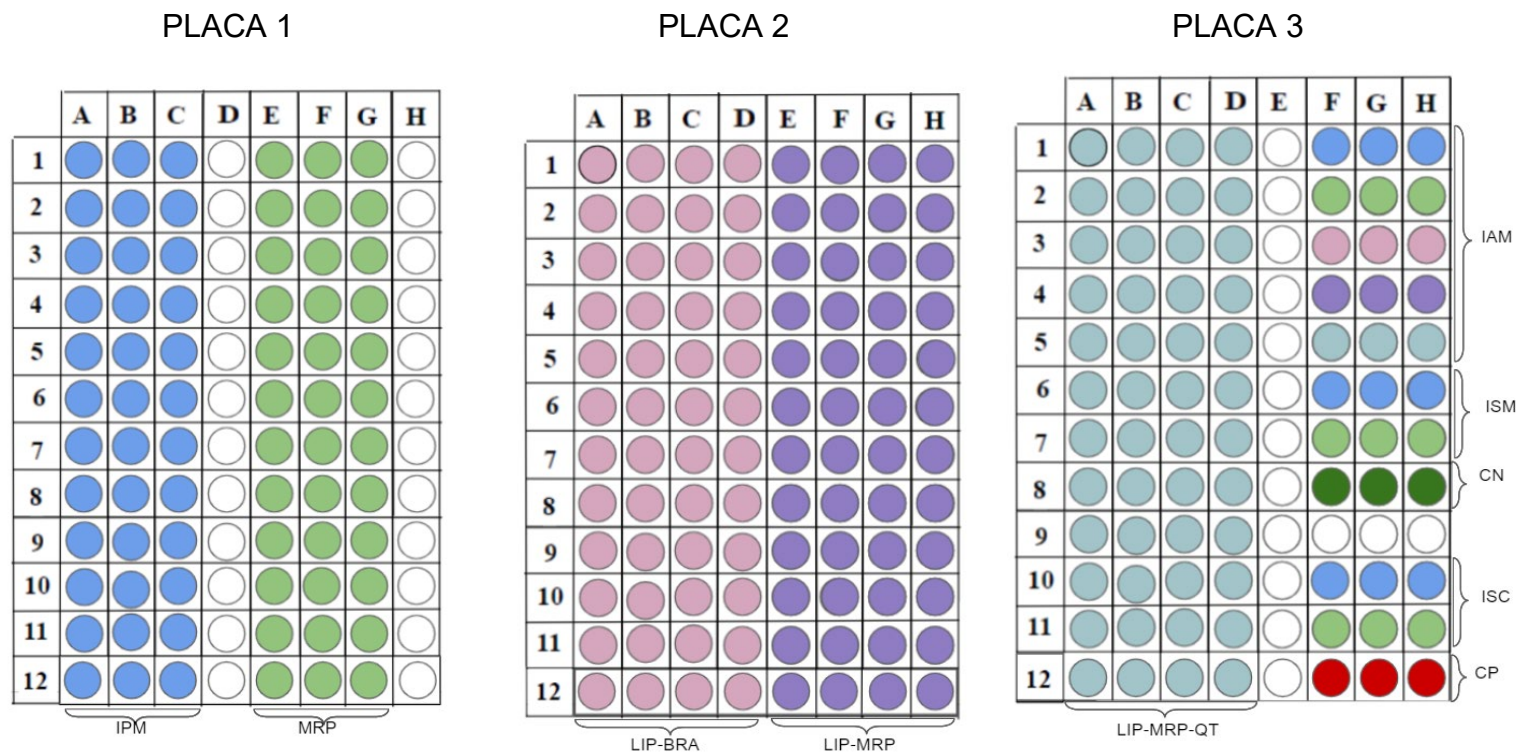
SEs: soluções estoque; LIP-BRA: lipossoma sem meropenem; LIP-MRP: lipossoma com meropenem; LIP-MRP-QT: lipossoma com meropenem revestido com quitosana; IPM: imipenem; MRP: meropenem; H₂O_d: água destilada estéril.
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Como indicado na Tabela 4, para a preparação das SEs dos lipossomas, foi escolhida água destilada estéril (H₂O_d), devido a ser um solvente polar que proporciona boa solubilidade (CLSI, 2024_b), evitando a presença de interferentes.

As matrizes das cepas bacterianas a serem testadas foram descongeladas e aclimatadas. Em seguida, uma alíquota de 10 µL foi retirada da matriz e estriada em placa

de Petri contendo AMH, utilizando uma alça bacteriológica calibrada estéril descartável de 10 µL. A incubação ocorreu em aerobiose, a 37 ± 2 °C, por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica. Para o preparo do inóculo bacteriano, foram retiradas de 3 a 5 Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) do AMH e transferidas, com auxílio de alça bacteriológica calibrada estéril descartável de 10 µL, para uma solução salina estéril 0,9% [NaCl 0,9% (p/v)]. A padronização do inóculo foi realizada por meio da leitura da Densidade Ótica (DO) em um espectrofotômetro a 625 nm, onde valores de absorbância entre 0,08 e 0,13 correspondem ao padrão da escala 0,5 de McFarland, contendo aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL (CLSI, 2024_a). Os ensaios para determinação da CIM foram realizados em microplacas de titulação de 96 poços de fundo chato (InLab®, São Paulo, Brasil), conforme ilustra a Figura 19.

Figura 19 - Esquema ilustrativo da organização das microplacas de titulação utilizadas para a determinação da Concentração Inibitória Mínima pelo método de microdiluição em caldo das amostras e dos ANT



IPM: imipenem; MRP: meropenem; LIP-BRA: lipossoma sem meropenem; LIP-MRP: lipossoma com meropenem; LIP-MRP-QT: lipossoma com meropenem revestido com quitosana; IAM: interferência das amostras sobre o meio; ISM: interferência dos solventes/diluentes sobre o meio; ISC: interferência dos solventes/diluentes sobre o crescimento bacteriano; CN: controle negativo de crescimento no meio; CP: controle positivo de crescimento no meio; * poços na coloração branca indicam poços vazios.
 Fonte: Adaptado de Costa (2021).

Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de caldo Müller-Hinton (CMH) em todos os poços das microplacas de titulação. Em seguida, 100 μ L das SEs das amostras ou ANT's a serem testados foram acrescidos na primeira fileira (linha 1). A diluição seriada foi realizada transferindo 100 μ L da fileira 1 para a fileira 2 após homogeneização, e assim sucessivamente até a fileira 12, onde foram descartados 100 μ L, mantendo-se o mesmo volume, conforme ilustrado na Figura 20. Dessa forma, obteve-se um gradiente de concentração na microplaca de titulação variando de 500 a 0,25 μ g/mL para os lipossomas e ANT's. Após, inoculou-se 10 μ L da suspensão bacteriana previamente padronizada em todos os poços da microplaca, exceto nos poços destinados às interferências das amostras e solventes/diluentes sobre o meio, bem como no controle negativo, onde foram adicionados 10 μ L de solução salina estéril a 0,9%. Após a diluição do inóculo na microplaca, a concentração final alcançada foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço) (CLSI, 2024_a). Os testes foram realizados em quadruplicata para as amostras e em triplicata para os ANT's.

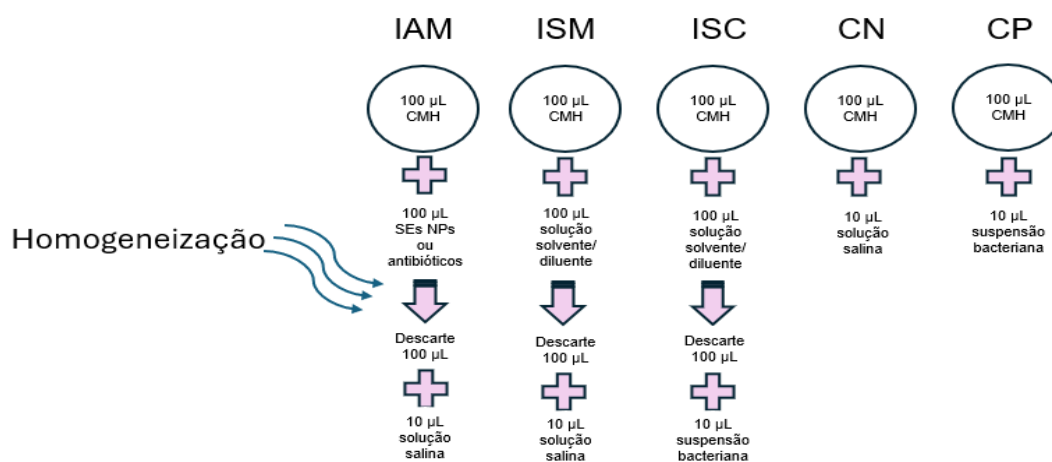
Figura 20 - Esquema ilustrativo do processo de diluição seriada realizado em microplacas de titulação



SEs NPs: soluções estoque; CMH: caldo Müller-Hinton.
Fonte: Adaptado de Costa (2021).

Para validar o ensaio e assegurar a reprodutibilidade dos resultados, foi realizado um controle de qualidade para cada variável dos testes. Esses controles abordaram as potenciais interferências, incluindo as das amostras (lipossomas e ANT's) sobre o meio [IAM], dos solventes/diluentes sobre o meio [ISM] e sobre o crescimento bacteriano [ISC]. Além disso, foram incluídos os controles positivo [CP] e negativo [CN] de crescimento, conforme ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Esquema ilustrativo dos controles utilizados para o teste de microdiluição em caldo



IAM: interferência das amostras sobre o meio; ISM: interferência do solvente/diluyente sobre o meio; ISC: interferência do solvente/diluyente sobre o crescimento bacteriano; CN: controle negativo de crescimento no meio; CP: controle positivo de crescimento no meio.

Fonte: Adaptado de Costa (2021).

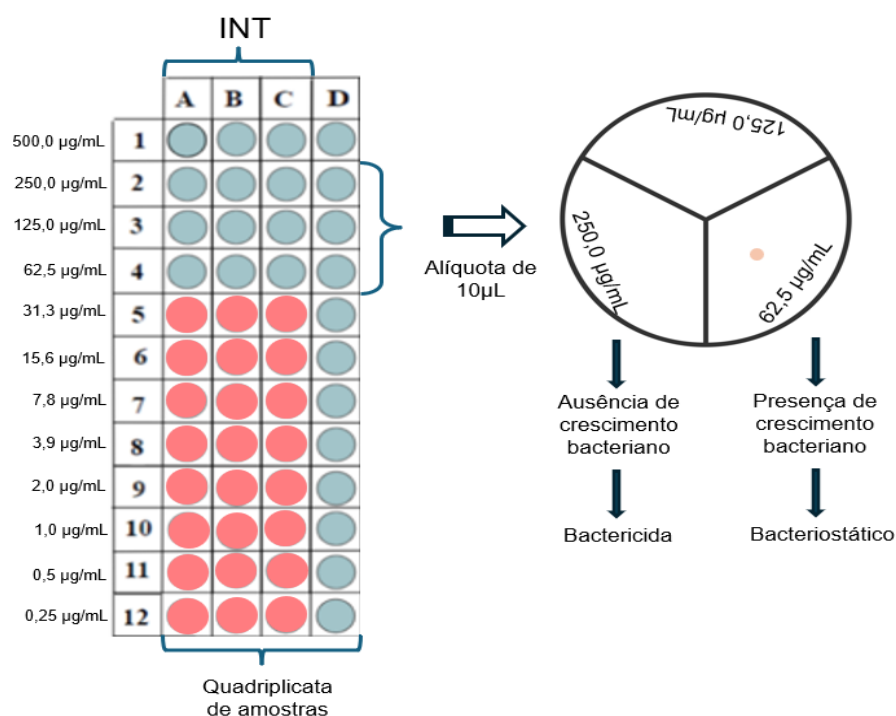
Os testes com lipossomas, ANT's e demais controles foram realizados simultaneamente para cada cepa bacteriana. Após a incubação das microplacas de titulação em estufa bacteriológica por 16 a 20 horas a 35 ± 2 °C em ambiente aeróbico, foram adicionados 20 µL de solução de INT [cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio], utilizado como indicador biológico, na concentração de 1 mg/mL (*p/v*) a todos os poços testados, com exceção da quarta fileira das quadruplicatas de cada amostra, que posteriormente foram usadas para determinar a CBM e classificar o efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático. Em seguida, as microplacas foram

incubadas por 30 minutos adicionais nas mesmas condições. Após esse período, os poços que apresentaram coloração roxa indicaram crescimento bacteriano, enquanto os que mantiveram a cor original indicaram ausência de crescimento. A CIM foi estabelecida como a menor concentração que demonstrou inibição visual da cepa testada, conforme descrito no documento M07-Ed12 (CLSI, 2024_a).

II. 1.3.4.6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático

Para a determinação da CBM, seguiu-se o procedimento descrito por Andrews (2001), com pequenos ajustes conforme mencionado anteriormente. Foi retirada, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 10 µL dos poços das microplacas de titulação citadas no item II-1.3.4.5 (pág. 65), que não receberam a solução do indicador biológico (colunas D e H – Placa 2 e coluna D – Placa 3 - pág. 67) e que, visualmente, não apresentaram crescimento bacteriano, correspondendo à CIM e duas concentrações acima. Essas alíquotas foram transferidas para placas de Petri contendo AMH, previamente marcadas com a concentração dos poços, e incubadas em estufa bacteriológica por 18 a 20 horas a 35 ± 2 °C em condições aeróbicas. Após a incubação, o efeito antibacteriano foi classificado como bactericida ou bacteriostático: as concentrações que permitiram o crescimento de colônias bacterianas no AMH foram consideradas bacteriostáticas, enquanto aquelas que inibiram o crescimento foram classificadas como bactericidas, conforme ilustrado na Figura 22. A CBM foi, então, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano após esses procedimentos.

Figura 22 - Esquema ilustrativo para determinação da Concentração Bactericida Mínima e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático



INT: cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio (indicador biológico); neste exemplo, a CIM foi determinada como 62,5 µg/mL, enquanto a CBM foi estabelecida em 125,0 µg/mL, sendo o efeito categorizado como bacteriostático.

Fonte: Adaptado de Costa (2021).

II.1.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism (versão 8.0.1) (GraphPad Software, Califórnia, Estados Unidos da América). Os dados experimentais foram submetidos a uma avaliação estatística por meio da análise de comparação múltipla por ANOVA (dados paramétricos) com post hoc de Tukey. Para todos os testes, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

II. 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lipossomas apresentam diversas vantagens que os tornam sistemas promissores para a entrega de fármacos, especialmente aqueles com características hidrofílicas, como o MRP. Devido à sua estrutura formada por uma bicamada lipídica que envolve um compartimento aquoso, os lipossomas são altamente adequados para encapsular fármacos hidrofílicos, protegendo-os de possíveis degradações e melhorando sua biodisponibilidade (Alavi et al., 2017; Guimarães et al., 2021).

No presente estudo, escolhemos a DPPC como principal componente da bicamada lipídica devido à sua biocompatibilidade e estabilidade, que favorecem a integridade estrutural dos lipossomas (Andra et al., 2022; Hasanovic et al., 2010). Além disso, a adição de CHOL desempenha um papel essencial no controle da permeabilidade da membrana dos lipossomas, reduzindo a fluidez e aumentando a estabilidade da bicamada (Gomes et al., 2021).

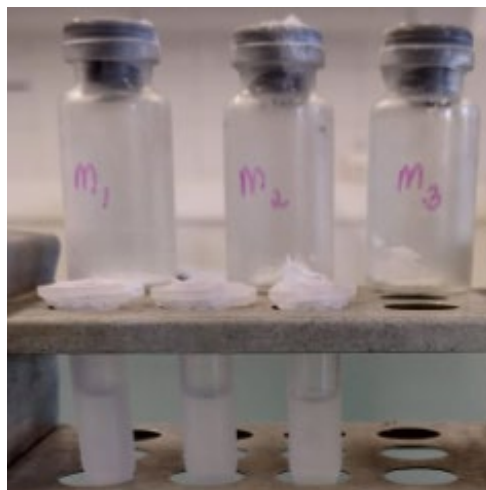
Além disso, de acordo com a literatura, o revestimento dos lipossomas com QT melhora sua estabilidade e pode favorecer o direcionamento de ação. Nesse sentido, ao adquirirem uma carga positiva na superfície, os lipossomas revestidos com QT interagem de maneira mais eficaz com as membranas de microrganismos, que possuem carga negativa, aumentando assim seu potencial antimicrobiano (Yang et al., 2015).

A seguir, são apresentados os resultados referentes à caracterização dos lipossomas contendo MRP.

II. 2.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Como pode ser observado na Fotografia 1, a aparência macroscópica das formulações LIP-MRP após a reconstituição foi uniforme, sem floculação, translúcidas, com leve opalescência azul clara. Além disso, o sobrenadante liofilizado apresentou-se como um pó fino e branco, como pode ser visto nos frascos na parte superior da imagem.

Fotografia 1 – Aspecto macroscópico de líofilos de lipossomas (SOB-LIP-MRP) acima e de LIP-MRP reconstituídos abaixo.



SOB-LIP-MRP: Sobrenadante lipossomas com Meropenem; LIP-MRP: lipossomas com Meropenem.

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

II. 2.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

Abaixo estão apresentados os resultados de DHm, Pdl e PZ para as formulações desenvolvidas (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores* de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersibilidade e Potencial Zeta para as LIP-BRA, LIP-BRA-QT, LIP-MRP e LIP-MRP-QT obtidas pelo método microfluídico

	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)
LIP-BRA	134,57 ± 23,39 ^{a,b,c}	0,442 ± 0,24 ^f	-21,14 ± 2,28 ^g
LIP-BRA-QT	198,20 ± 35,91 ^d	0,540 ± 0,01 ^f	+24,22 ± 6,44 ^h
LIP-MRP	120,79 ± 9,89 ^{a,e}	0,560 ± 0,06 ^f	-17,61 ± 1,98 ^g
LIP-MRP-QT	205,46 ± 18,41	0,590 ± 0,05 ^f	+27,17 ± 1,36 ^h

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n=3);

b – Diferença significativa comparando LIP-BRA e LIP-BRA-QT; c - Diferença significativa comparando LIP-BRA e LIP-MRP-QT; d - Diferença significativa comparando LIP-BRA-QT e LIP-MRP; e - diferença significativa comparando LIP-MRP e LIP-MRP-QT. Letras iguais representam valores sem diferença estatística significativa (ANOVA seguida de teste de Tukey).

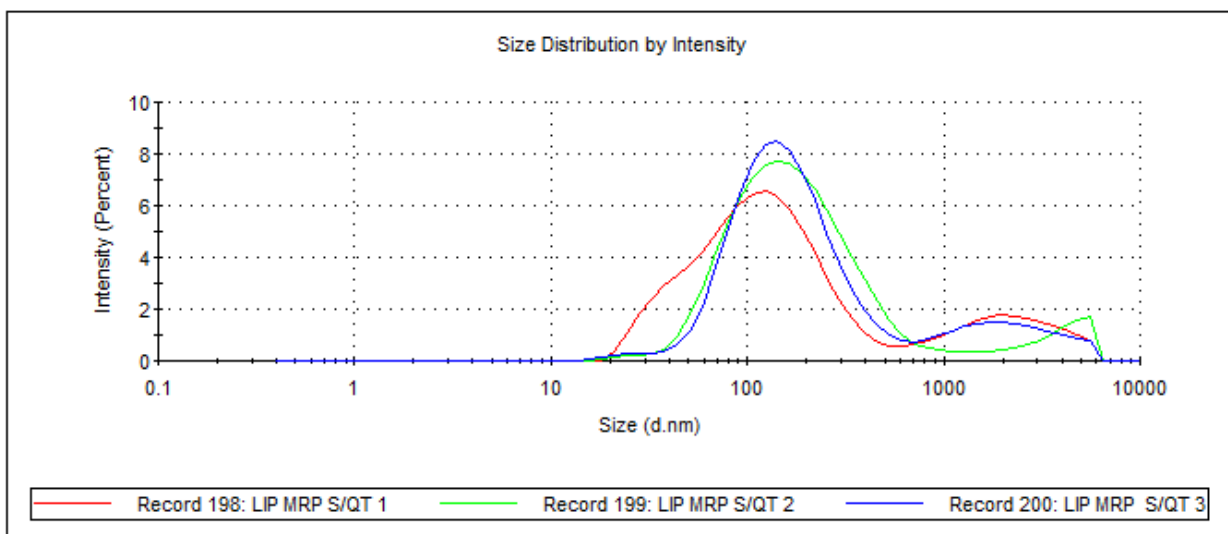
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Em relação ao DHm dos lipossomas não revestidos (LIP-BRA; LIP-MRP), os valores obtidos são consistentes com os dados da literatura para lipossomas preparados com a mesma composição lipídica e método de preparação (Yang et al, 2015). Para essas amostras, observou-se que a encapsulação do MRP não provocou alterações significativas no tamanho médio das partículas, o que pode ser atribuído à baixa massa molar desse fármaco, bem como à sua provável localização no núcleo aquoso dos lipossomas. Dessa forma, possivelmente o MRP interage minimamente com a bicamada lipídica, preservando a estrutura das vesículas e mantendo seu tamanho original (Eloy et al., 2014). Contudo, um aumento significativo no DHm foi observado nos lipossomas revestidos com QT (Tabela 5), o que sugere a incorporação do polímero na superfície externa das vesículas, confirmando o sucesso do revestimento. Um comportamento semelhante foi descrito em estudos prévios (Alavi et al., 2017).

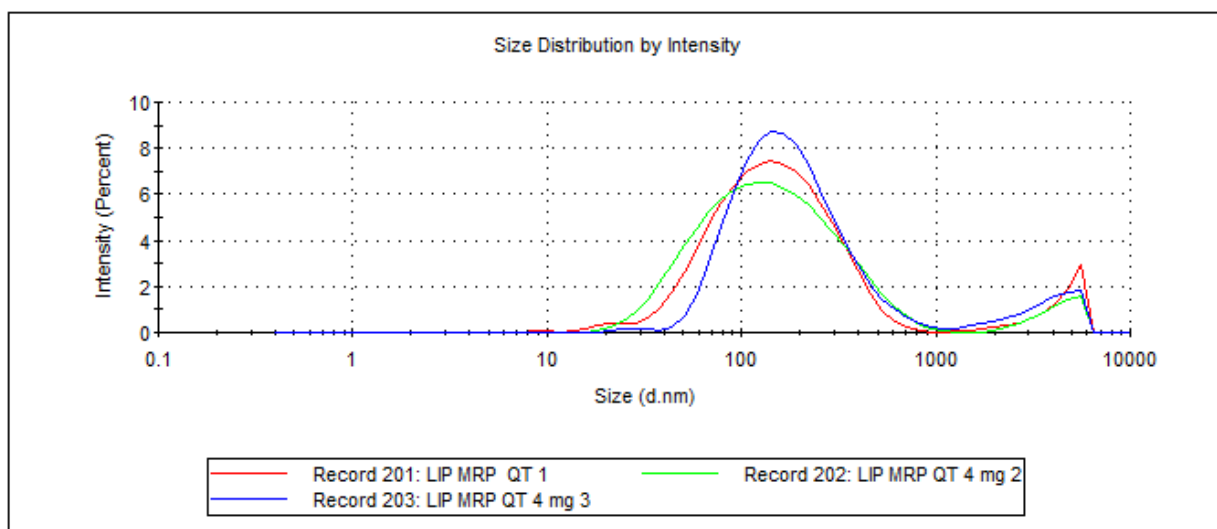
No que diz respeito ao Pdl, os valores obtidos (acima de 0,3) (Tabela 5) indicam uma maior dispersividade das amostras, sugerindo uma distribuição de tamanhos mais ampla. Esse resultado é corroborado pelos gráficos de distribuição de tamanho apresentados na Figura 23. Uma possível explicação para esses valores pode ser a presença de uma população de partículas adicionais, possivelmente micelas formadas devido ao excesso de fosfolipídios, detectadas na faixa de tamanho acima de 1000 nm, o que contribui para a heterogeneidade observada nas amostras. Ainda, especificamente para os lipossomas revestidos, o excesso de QT pode também ser responsável por essa discrepante população de partículas.

Figura 23 – Distribuição de tamanho dos LIP-MRP (a) e LIP-MRP-QT (b) por intensidade (n=3)

(a)



(b)



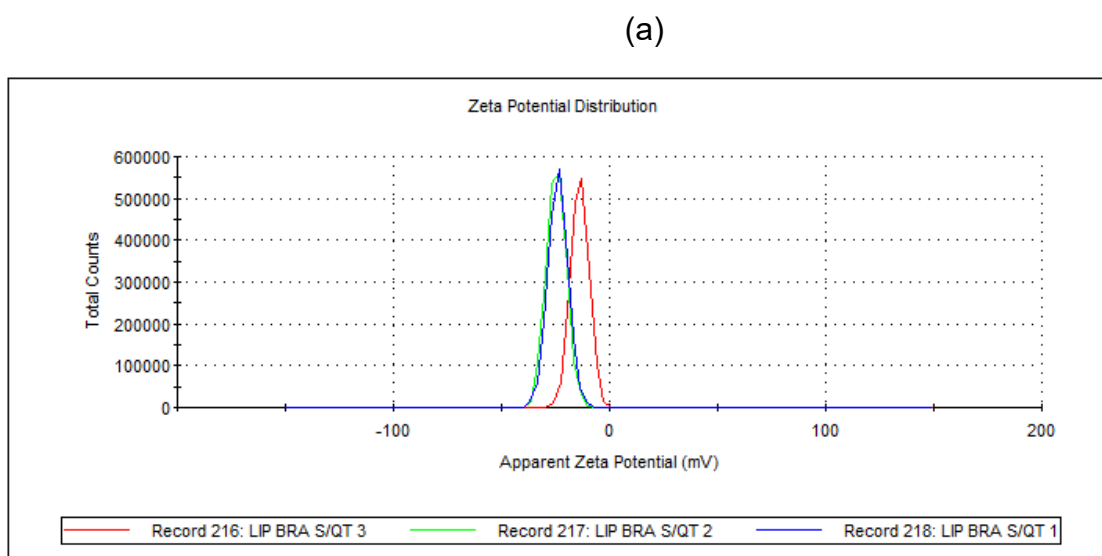
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Quanto ao PZ, os valores obtidos variaram de $-21,14 \pm 2,28$ mV a $+24,22 \pm 6,44$ mV para LIP-BR-QT e de $-17,61 \pm 1,98$ mV a $+27,17 \pm 1,36$ mV para LIP-MRP-QT (Tabela 5). O aumento do PZ para valores positivos nos lipossomas revestidos indica um

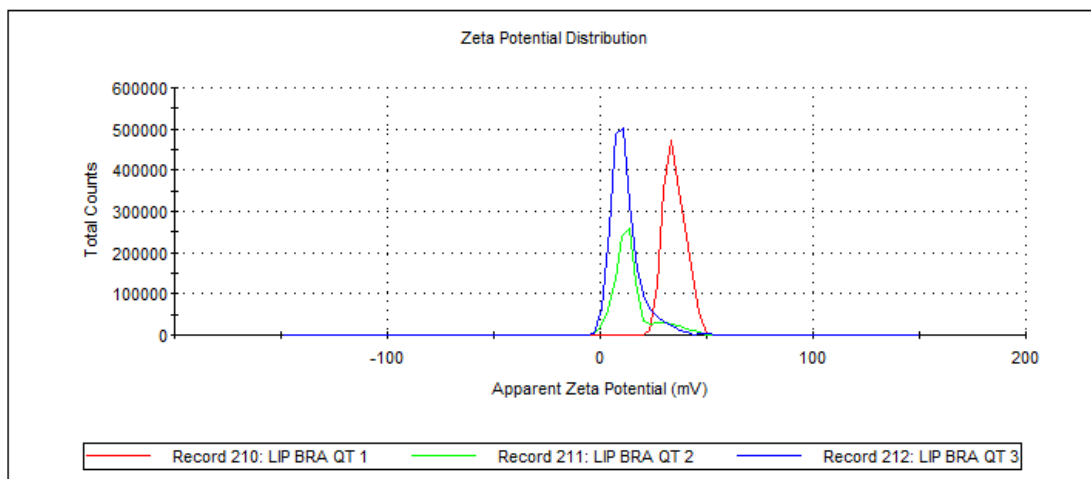
revestimento eficaz de QT. A mudança no PZ é claramente evidenciada pelos gráficos de distribuição apresentados na Figura 24, reforçando a incorporação da QT à superfície das partículas. Nos gráficos, observa-se a inversão de carga, com valores negativos no LIP-BRA (a) e LIP-MRP (c), passando para valores positivos nos lipossomas revestidos (LIP-BRA-QT) (b) e LIP-MRP-QT (d).

Como já descrito, a carga positiva adquirida pelos lipossomas após o revestimento pode favorecer a interação com membranas bacterianas, que possuem carga negativa, sugerindo uma potencial atividade antimicrobiana. Além disso, o aumento do PZ observado após o revestimento sugere que as formulações finais possuem uma estabilidade coloidal satisfatória. Esse comportamento é consistente com outros estudos da literatura, que também relataram um aumento no DHm e uma inversão do PZ para valores positivos em lipossomas revestidos com QT (Alavi et al., 2017; Yang et al., 2015).

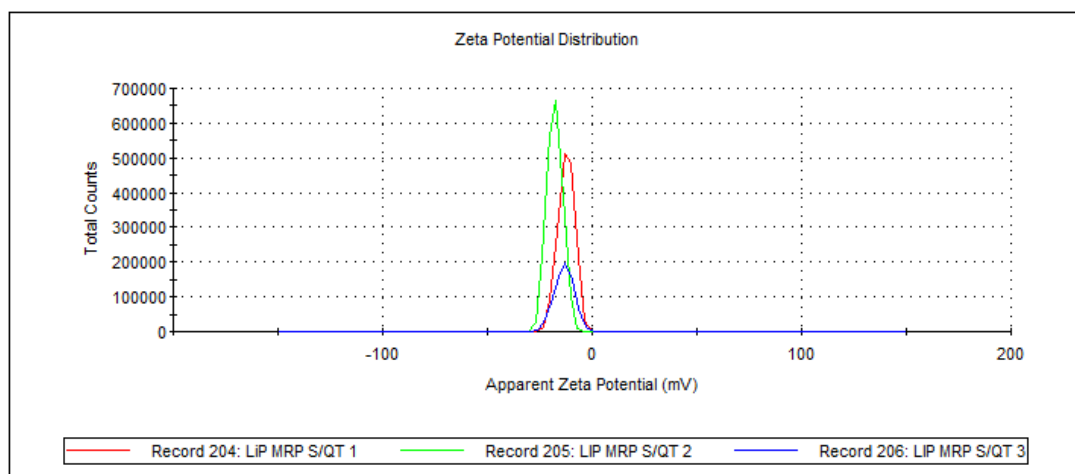
Figura 24 – Distribuição de PZ dos lipossomas LIP-BRA (a), LIP-BRA-QT (b), LIP-MRP (c), LIP-MRP-QT (d)



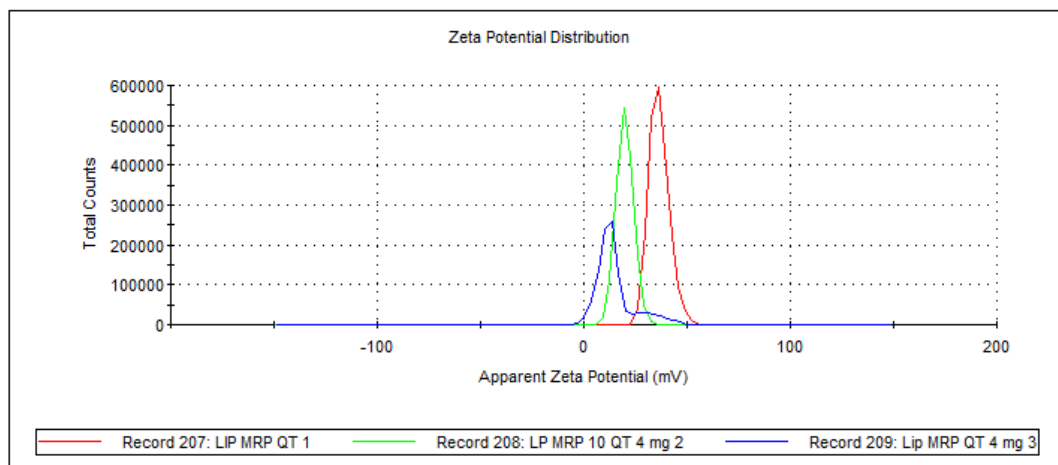
(b)



(c)



(d)

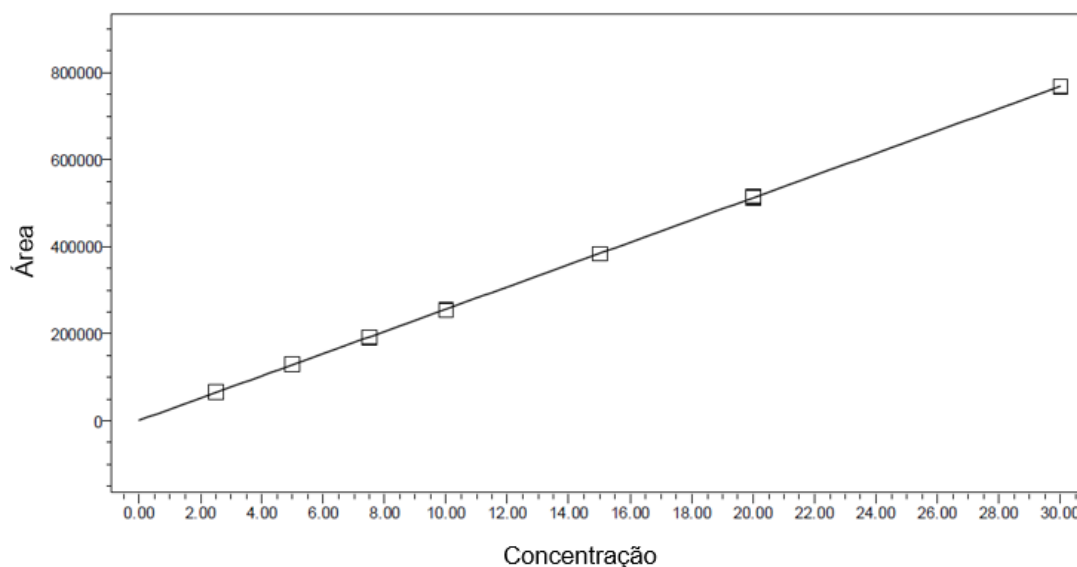


Fonte: Elaborado pela autora (2024)

II. 2.1.2 Eficiência de encapsulação

O ensaio para a quantificação do MRP foi realizado por HPLC, para tanto, primeiramente foi realizada injeção da curva analítica de padrão de MRP, nas concentrações de 2,5 – 30,0 µg/mL (Figura 25).

Figura 25 – Curva analítica do padrão de meropenem por meio de HPLC.

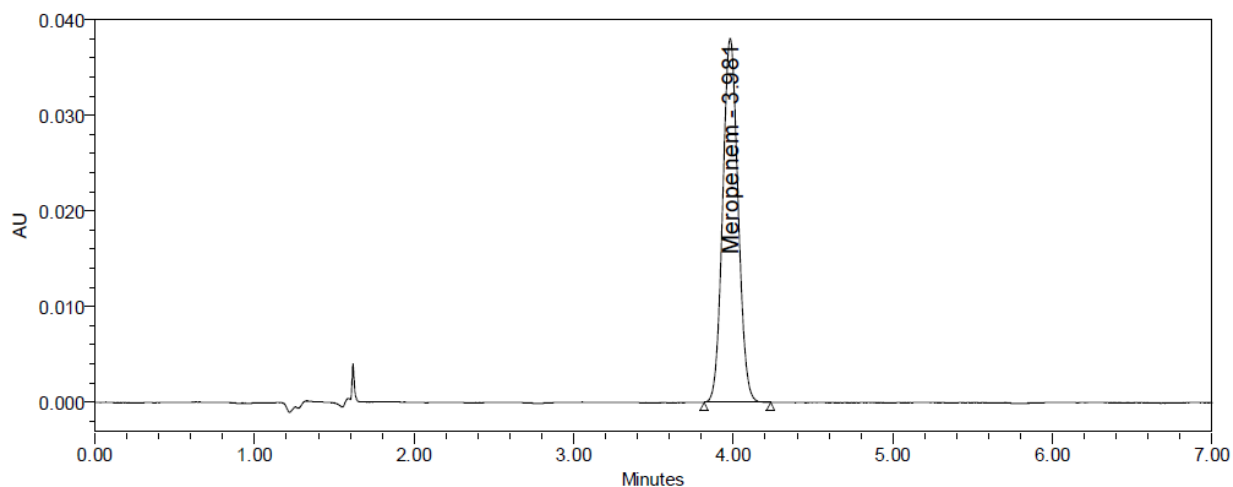


Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A equação da reta obtida para a EE de MRP foi construída por meio da regressão linear. Os dados da curva foram $Y = 23138 X + 330,2$, com coeficiente de determinação, $R^2 = 0.999941$.

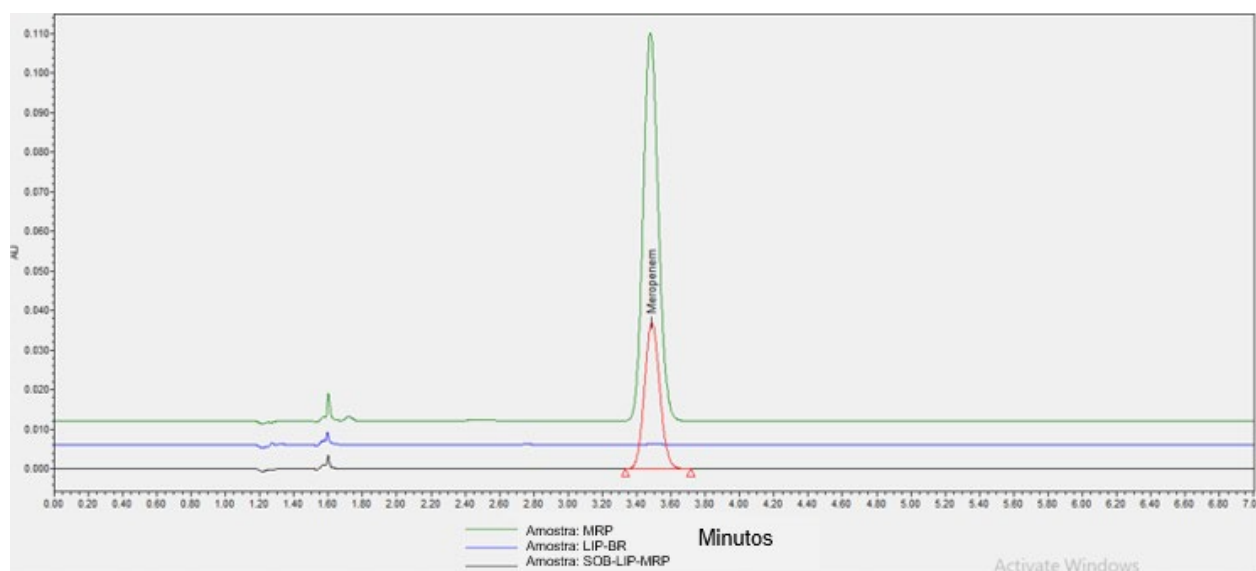
Em relação aos cromatogramas, obtivemos um pico bem resolvido em 298nm, com tempo de retenção próximo a 4 minutos, dentro da faixa prevista (Figura 26).

Figura 26 – Cromatograma referente ao padrão de MRP(a) à 10 µg/mL (ponto central da curva analítica)



Além disso, na Figura 27 pode-se observar que não foi identificado nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção do MRP, comprovando a seletividade do método para a quantificação desse analito. Com o objetivo de avaliar a seletividade do método, foi realizada a sobreposição de uma amostra branca (LIP-BRA) e não houve interferência.

Figura 27 – Cromatogramas sobrepostos das amostras de SOB-LIP-MRP, LIP-BRA e do padrão de meropenem



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A EE do MRP nos lipossomas sem revestimento (LIP-MRP) e revestidos (LIP-MRP-QT) foi de $24,74 \pm 1,37\%$ e $25,58 \pm 4,12\%$, respectivamente. A partir desses resultados, foi possível constatar que não houve diferença significativa entre os valores obtidos. Tal resultado era previsível uma vez que, considerando a estrutura organizacional dos lipossomas, é provável que o MRP esteja localizado no interior da cavidade aquosa das vesículas. Portanto, essa possível localização não traria influência no sentido da perda de fármaco durante o processo de revestimento com a QT.

De maneira semelhante ao observado em nosso estudo, um trabalho anterior envolvendo oito formulações lipossômicas catiônicas, duas neutras e três aniônicas, preparadas por hidratação de filme lipídico contendo MRP e gentamicina, também reportou uma baixa EE. Nesse estudo, a EE do MRP variou entre 1,16% e 3,70% (Drulis-Kawa et al., 2006), sendo inferior à obtida em nosso trabalho.

A encapsulação de certos fármacos hidrofílicos em lipossomas pode ser dificultada devido à sua baixa afinidade com a fase lipídica, o que pode resultar em uma quantidade reduzida do ativo encapsulado, predominantemente no compartimento aquoso. Além disso, é sabido que fármacos hidrofílicos podem ser perdidos durante a preparação dos lipossomas, especialmente quando a formação das vesículas é realizada por métodos como a nanoprecipitação ou hidratação de filmes lipídicos (Torres et al., 2012; Wijesooriya et al., 2013).

Apesar do baixo valor de EE, como prova de conceito, prosseguimos com o estudo da formulação revestida e investigamos sua atividade antibacteriana contra cepas de referência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

II. 2. 3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO *IN VITRO*

II. 2.3.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima seguida da classificação do efeito antibacteriano em bactericida ou bacteriostático

O presente estudo foi conduzido utilizando uma cepa de referência da ATCC® *E. coli* (ATCC 25922), que é sensível aos ANT's e é comumente empregada no controle de qualidade de ensaios microbiológicos. Além disso, foram utilizadas duas cepas de referência do NCTC® *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13438), produtora de carbapenemase do tipo KPC-3, e *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13443), produtora de metalo- β -lactamase do tipo NDM-1. Ambas as cepas são reconhecidas por sua resistência a múltiplos fármacos e são classificadas como prioridade crítica pela OMS para a descoberta e desenvolvimento de novos ANT's, dada a sua relevância nas infecções causadas por bactérias Gram-negativas (Smith; Hollingshead; Kendall, 2024; WHO, 2024).

Dessa forma, alinhando-se às diretrizes da OMS, esta investigação concentrou-se na pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, especificamente por meio do desenvolvimento de lipossomas revestidos com QT para a entrega de MRP.

A atividade antibacteriana de lipossomas contendo MRP e gentamicina foi investigada por Drulis-Kawa et al. (2006) em quatro cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 700601) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Os resultados indicaram que a eficácia dos ANT's é influenciada pela sua encapsulação, uma vez que formulações lipossomais com baixa EE tendem a apresentar atividade antibacteriana reduzida. Como já descrito, a EE de MRP variou entre 1,16 a 3,70%, valores que se mostraram inferiores ao ideal para garantir uma ação antibacteriana eficaz (Drulis-Kawa et al., 2006).

Por outro lado, um estudo sobre lipossomas de cefepima e ceftazidima revelou EE de 2,29% e 5,77%, respectivamente, com uma perda significativa do fármaco observada nas primeiras 24 horas (Torres et al., 2012).

No presente estudo, a EE de LIP-MRP-QT foi de $25,58 \pm 4,12\%$. Embora esse valor seja superior ao reportado por Drulis-Kawa et al. (2006) e Torres et al., (2012) para MRP e outros BLAs lipossomais, respectivamente, não foi suficiente para proporcionar um potencial antibacteriano significativo, como será discutido a seguir.

A Tabela 6 evidencia os valores de CIM obtidos para *E. coli* (ATCC 25922), com uma CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para IMP e CIM < 0,25 $\mu\text{g/mL}$ para MRP. De acordo com o

documento CLSI M100-Ed34 (CLSI 2024_b), CIMs entre 0,06 e 0,5 µg/mL para IMP validam a qualidade do teste realizado, demonstrando a sensibilidade esperada da cepa em questão, enquanto CIMs entre 0,008 e 0,06 µg/mL para MRP corroboram a qualidade do ensaio também demonstrando sua sensibilidade esperada. É importante notar que a menor concentração de MRP testada foi de 0,25 µg/mL dentro do gradiente proposto, o que não permitiu estabelecer CIMs na faixa prevista pelo CLSI. Entretanto, os valores encontrados para IMP estão alinhados com os parâmetros esperados para *E. coli* (ATCC 25922), validando o ensaio.

A análise das CIMs de *E. coli* (ATCC 25922) apresentada na Tabela 6 revela que a CIM obtida com LIP-BRA (> 500 µg/mL) indica a ausência de atividade antibacteriana no gradiente de concentração testado, devido à falta de MRP, que seria responsável pela ação antibiótica. As CIMs de 2 µg/mL obtidas com LIP-MRP e LIP-MRP-QT, embora significativamente inferiores aos valores com LIP-BRA, afastam os resultados dos valores descritos como esperados pelo CLSI para essa cepa (2024_b). Considerando-se que os valores de CIM de IMP e MRP ≤ 1 , 2 e ≥ 4 µg/mL, classificam os membros da ordem *Enterobacterales*, exceto *Salmonella* e *Shigella*, como sensível, intermediário e resistente a esses fármacos, nessa ordem, os valores obtidos com LIP-MRP e LIP-MRP-QT erroneamente classificariam a cepa de *E. coli* (ATCC 25922) como intermediária ao MRP, o que não é verdade. Isso sugere que, apesar da atividade antibacteriana observada com esses lipossomas, ela não foi efetiva visto que não atingiu a concentração desejada, ou seja, ≤ 1 µg/mL.

Em relação à CBM, tanto o LIP-MRP quanto o LIP-MRP-QT apresentaram valores de 16 µg/mL para *E. coli* (ATCC 25922), indicando que são necessárias concentrações mais elevadas desses lipossomas para inviabilizar essa cepa, em contraste com a quantidade necessária apenas para inibir seu crescimento. Como mencionado na pág. 21, o BLA MRP é um ANT bactericida; no entanto, para alcançar esse efeito, foi necessária uma concentração três vezes superior à CIM determinada de 2 µg/mL.

Tabela 6 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidos com os lipossomas LIP-BRA, LIP-MRP, LIP-MRP-QT, imipenem (IPM) e meropenem (MRP) frente às cepas bacterianas de referência

Cepa bacteriana	CIM (µg/mL)					CBM(µg/mL)		
	LIP-BRA	LIP-MRP	LIP-MRP-QT	IPM	MRP	LIP-BRA	LIP-MRP	LIP-MRP-QT
Escherichia.coli (ATCC 25922)	> 500	2,0 ¹	2,0 ¹	0,5	<0,25	-	16	16
Klebsiella.pneumoniae. (NCTC 13443)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	-	-	-
Klebsiella.pneumoniae (NCTC 13438)	> 500	> 500	> 500	500	> 500	-	-	-

LIP-BRA: lipossoma sem meropenem; LIP-MRP: lipossoma com meropenem; LIP-MRP-QT: lipossoma com meropenem revestido com QT; IPM: imipenem; MRP: meropenem; ATCC: *American Type Culture Collection*; NCTC: *National Collection of Type Cultures*; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; ¹: efeito bacteriostático.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A Tabela 6 apresenta os valores de CIM obtidos com LIP-BRA, LIP-MRP, LIP-MRP-QT, IPM e MRP em relação às cepas de referência NCTC® de *K. pneumoniae*. Para as cepas *K. pneumoniae* (NCTC 13438) e *K. pneumoniae* (NCTC 13443), que produzem KPC-3 e NDM-1, respectivamente, a CIM foi superior a 500 µg/mL para todas as formulações lipossomais e ANTs analisados, exceto para IMP em *K. pneumoniae* (NCTC 13438), que apresentou CIM de 500 µg/mL. Esses resultados indicam uma resistência elevada ao IMP e ao MRP, provavelmente devido à produção de carbapenemases, que inativam a ação antibiótica desses fármacos e comprometem sua eficácia terapêutica (Smith; Hollingshead; Kendall, 2024).

Observa-se que as CIMs obtidas com MRP livre foram superiores a 500 µg/mL, sugerindo que LIP-MRP e LIP-MRP-QT não conseguiram proteger o carbapenêmico da ação enzimática de KPC-3 e NDM-1. Além disso, a baixa EE dos lipossomas pode ter impactado negativamente a eficácia antibacteriana (Torres et al., 2012). A encapsulação inadequada provavelmente resultou em uma liberação insuficiente do MRP, reduzindo a quantidade disponível do ANT para atingir eficazmente as bactérias-alvo e não impedindo a ação das carbapenemases. As CBMs não puderam ser determinadas devido ao gradiente de concentração utilizado (0,25 a 500 µg/mL).

No estudo de Drulis-Kawa et al. (2006) nota-se que a atividade antibacteriana *in vitro* de lipossomas de MRP contra *P. aeruginosa* revelou que as CIMs foram mais elevadas para todos os lipossomas testados em comparação ao MRP livre. Os autores sugeriram que o MRP encapsulado pode interagir com os lipídios, alterando as propriedades dos lipossomas e inibindo a fusão eletrostática entre esses e a célula bacteriana.

Com base nos achados deste estudo, decidiu-se realizar um refinamento metodológico, explorando novas formulações de lipossomas. No entanto, os resultados preliminares dessas tentativas não foram promissores (dados não divulgados). Assim, optou-se por testar uma nova formulação de NPs de prata associada à QT, conforme descrito no capítulo III.

3. CONCLUSÃO

Os lipossomas revestidos com QT e encapsulados com MRP, desenvolvidos neste estudo, foram produzidos por meio de uma técnica simples e de baixo custo, com potencial escalabilidade. Além disso, apresentaram característica promissora de carga superficial positiva para futura administração.

No entanto, os resultados sugerem que a baixa EE pode ter comprometido a eficácia microbiológica. A otimização do método de preparo e da formulação é essencial para aumentar o potencial terapêutico desses nanoantibióticos no combate a infecções bacterianas resistentes.

CAPÍTULO III:

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA/QUITOSANA CONTENDO MEROPENEM

II. 1. MATERIAL E MÉTODOS

III. 1.1. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

No Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) foram disponibilizados os seguintes reagentes: Quitosana (QT) (CAS 9012-76-4; baixo peso molecular (50.000 – 190.000 g/mol); grau de desacetilação (GD): 75 - 85%, foi adquirida junto à Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos da América); meropenem triidratado (MRP) (CAS 11947 MM = 437,51 g/mol) adquirido da Sigma Aldrich.

No Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas (LNano) foram disponibilizados os seguintes reagentes: nitrato de prata (AgNO_3 Sigma-Aldrich) como estabilizante QT de baixo peso molecular ($[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}]^-$ CAS 9012-76-4; peso molecular: 50.000-190.000 g/mol ($8,3027 \times 10^{-23}$ – $3,155 \times 10^{-22}$ g) e GD de 75% a 85% - Sigma-Aldrich], borohidreto de sódio (NaBH_4 - Sigma-Aldrich) e citrato de sódio (Na_3cit) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - Sigma - Aldrich) como agentes redutores e ácido acético glacial (CH_3COOH - Synth), 2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ -Sigma-Aldrich), como modificador de superfície. Foi utilizada água MilliQ de resistividade igual a 18.2 MΩ.cm, como solvente nas reações. As vidrarias foram limpas com solução de água régia (3 HCl:1 HNO_3) e enxaguada abundantemente com água deionizada, sem uso de detergente ou soluções de limpeza adicionais.

No Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Farmacêuticas, FF/UFJF, foram disponibilizados os seguintes reagentes, solventes e meios de cultura: Ágar Müeller-Hinton (Difco® Laboratories, Michigan, Estados Unidos da América); Caldo Müeller-Hinton (Difco® Laboratories, Michigan, Estados Unidos da América); TSB (do inglês, *Tryptic Soy Broth*; Difco® Laboratories, Michigan, Estados Unidos da América); glicerol (Synth®, São Paulo, Brasil); Tampão Fosfato de Potássio pH 7,2, Imipenem lote 853752 CAS 74431.23.5 Inlab® e cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazólio (Sigma-Aldrich®, Missouri, Estados Unidos da América).

III. 1.2. EQUIPAMENTOS

No LDNano foram disponibilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica de precisão (Gehaka BG 2000, São Paulo, Brasil) e pHmetro Gehaka PG 1800. Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) pertencente ao Centro de Pesquisas da FF da UFJF. No Laboratório de Controle de Qualidade da FF foi disponibilizado o Liofilizador LJJ04 (Científica).

No Laboratório LNano foram disponibilizados os seguintes equipamentos: os espectros Raman das amostras sólidas foram obtidos utilizando-se o espectrômetro FR-Raman da Bruker, modelo RFS-100, com radiação excitante de comprimento de onda 1064 nm, equipado com detector de germânio resfriado com nitrogênio líquido. A espectroscopia Raman com superfície modificada (SERS) foi realizada utilizando-se o espectrômetro Raman da Bruker, modelo Senterra com radiações excitantes de comprimentos de onda de 200 nm a 1800nm, equipado com detector CCD. Banho ultrassônico Cristófoli, frequência: 50/60Hz; potência: 160W, 127V e temporizador.

No Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, foram disponibilizados os seguintes equipamentos: agitador tipo vórtex (Arsec, São Paulo, Brasil); autoclave (Primatec®, São Paulo, Brasil); balança eletrônica de precisão modelo JK-EAB-2204N (JKI®, Brasil); cabine de segurança biológica classe II B2 (Veco®, São Paulo, Brasil); espectrofotômetro modelo SP-1105 (Bel® Photonics, São Paulo, Brasil); estufa bacteriológica (Quimis®, São Paulo, Brasil); estufa de secagem e esterilização (Limatec, Rio de Janeiro, Brasil); forno de micro-ondas (LG Eletronics® Brasil, São Paulo, Brasil); micropipetas (Thermo Scientific®, Massachusetts, Estados Unidos da América); placas de Petri 90 x 15 mm (PlastLabor®, Rio de Janeiro, Brasil); refrigeradores (Electrolux® Brasil, São Paulo, Brasil); sistema purificador de água por osmose reversa (Permutation®, Paraná, Brasil); tubos plásticos com tampa de rosca próprios para congelamento (Inlab®, São Paulo, Brasil); entre outros.

No Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária-Embrapa Gado de leite de Juiz de Fora, foi disponibilizado o microscópio de Força Atômica EasyScan 2 FlexAFM Sample Stage equipado com as ponteiras Tap190Al-G 380pcs da Budget Sensors, com controlador Nanosurf Easyscan 2 Controller.

III. 1.3. MÉTODOS

III. 1.3.1. Síntese das nanopartículas de prata/quitosana (AgNPQT)

As AgNP sintetizadas com QT (AgNPQT) foram obtidas através do método descrito por Filgueiras (Filgueiras, 2013), como se segue: Em um erlenmeyer com o exterior revestido com papel alumínio, foi adicionado 50mL de de nitrato de prata (AgNO_3) ($2,1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$). Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL de citrato de sódio ($1,6 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$) e em seguida, a prata foi reduzida pelo gotejamento de 0,5 mL de borohidreto de sódio (NaBH_4) ($2,1 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$). Após, foram adicionados 5,0 mL de solução de QT de baixo peso molecular (0,2 g/L). Todo o procedimento de síntese foi realizado em temperatura ambiente e sob agitação ultrassônica (Figura 28). Como o pKa da QT é de 6,5, um ajuste no pH do colóide é necessário para evitar a precipitação do polímero (Saini et al., 2011). Esse ajuste foi feito com adição de 0,5 mL de ácido acético glacial 0,1 mol/L.

Figura 28 – Síntese das nanopartículas de prata/quitosana



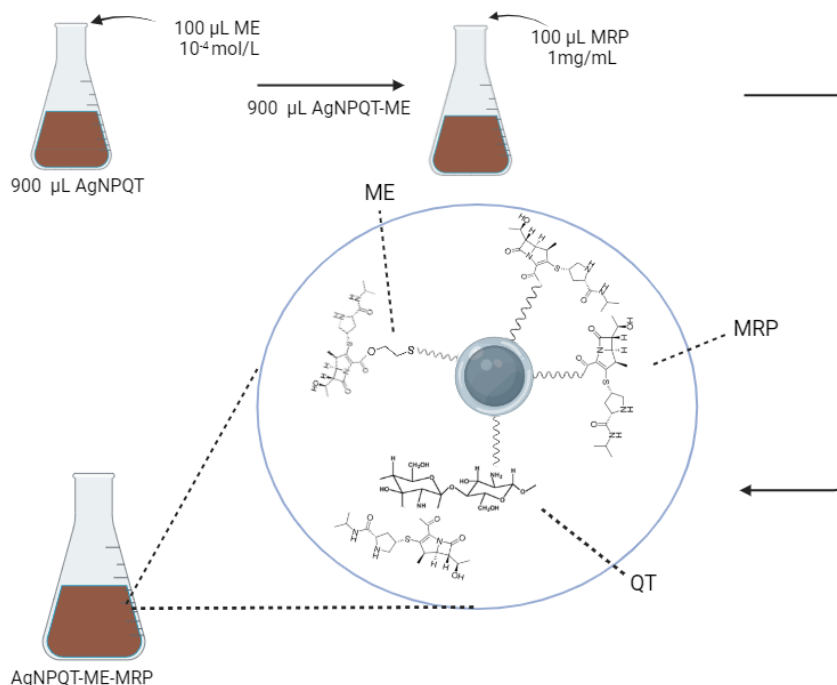
Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Foram preparadas amostras com e sem o modificador de superfície 2-mercaptoetanol (ME), no intuito de avaliar o impacto do mesmo na adsorção do MRP à superfície das NPs. O 2-mercaptoetanol é um composto orgânico contendo um grupo tiol ($-\text{SH}$) e é frequentemente usado para funcionalizar superfícies de NPs metálicas, como as de prata, devido à sua capacidade de formar fortes ligações com metais através da quimissorção. O grupo tiol interage diretamente com a superfície da prata, formando uma

ligação estável Ag-S, o que pode aumentar a eficiência de adsorção de outras moléculas ou agentes funcionais à superfície da NP, devido a presença do grupo hidroxila polar na outra ponta da cadeia (Filgueiras, 2016).

A solução de MRP (10mg/mL) e ME (10^{-6} mol/L) foram adicionadas no momento do uso das NPs, conforme Figura 29.

Figura 29 – Síntese das nanopartículas de prata/quitosana e 2-mercaptopetanol e meropenem.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

III. 1.3.2. Caracterização das nanopartículas

III. 1.3.2.1. Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), índice de polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta (PZ)

O DHm e o Pdl foram avaliados por meio da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (do inglês - *Dynamic Light Scattering - DLS*) utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°.

O potencial Zeta foi determinado pela avaliação da mobilidade eletroforética. As determinações foram realizadas em triplicata e à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) pertencente ao Centro de Pesquisas da FF/UFJF. Os dados e figuras foram obtidas através do Zetasizer software versão 7.13. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

III. 1.3.2.2. Espectroscopia Raman e Espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS)

Os espectros Raman foram obtidos utilizando um espectrômetro Raman Bruker-Senterra dispersivo, equipado com um detector CCD (do inglês - *Charge Coupled Device*) refrigerado termoeletricamente, acoplado a um microscópio Olympus com lentes objetivas de magnificação de curto alcance de 50 e 100 vezes, com linha de excitação do laser com comprimentos de onda de 632,8 e 787 nm, potência variando de 10mW a 20mW, e tempo de integração de 90 a 500 segundos; e um espectrômetro FT-Raman Bruker-RFS-100, equipado com um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido, acoplado a um microscópio Olympus com lente objetiva de magnificação de longo alcance de 40 vezes com linha de excitação do laser Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 1000mW. Os dados espectrais e figuras de mapeamento foram obtidas através do software Origin 2018.

As amostras para espectroscopia Raman de QT e MRP foram previamente liofilizadas por 24h, em temperatura de -51,3°C a 110 mmHg, no equipamento Liofilizador LJJ04 (Científica) para obtenção de pó seco. As amostras foram colocadas em suporte para amostra e os espectros foram registrados na região espectral de 4000–100 cm^{-1} .

III. 1.3.2.2.1. Preparo de amostras para espectroscopia SERS

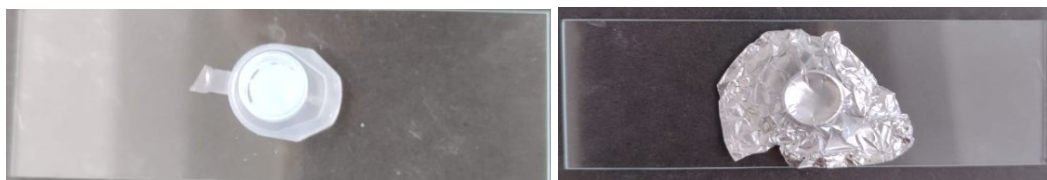
Na espectroscopia Raman, o feixe de laser é focado em uma amostra para gerar uma impressão digital única da molécula. O sinal Raman é muito fraco. Para a otimização

dos espectros SERS e superação deste problema, utilizamos um aparato para as amostras suficientemente eficiente e de baixa complexidade, condizente com a infraestrutura do laboratório. Utilizamos um pequeno anel com diâmetro de 5 mm revestido com filme de alumínio como suporte para as amostras. Os filmes de alumínio tratados foram adequados para obter-se essas nanoestruturas requeridas para a observação do efeito SERS (Lanferini, 2022).

O filme de alumínio de uso doméstico possui uma pureza de 98,5% a 99,9% e baixo custo. Além disso, é um material de fácil acesso e que pode facilmente sofrer abrasão química. Com esse processo é gerada sobre o alumínio uma superfície áspera, aumentando a superfície de contato do alumínio, intensificando o sinal SERS (Basu, 2017). Os filmes de alumínio foram submetidos à abrasão química da seguinte forma: pedaços de aproximadamente 5 x 5 cm de papel alumínio foram limpos com acetona, a fim de retirar resíduos de gordura. Em seguida foram lavados com água deionizada e secos na estufa. Após a secagem, foram tratados, com agitação, em solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH), por 60 segundos, lavados com água deionizada e secos em estufa novamente.

O filme de alumínio tratado foi então usado para revestir o porta-amostras de plástico, que foi usado como suporte para as amostras líquidas de coloide de AgNPs associadas ao MRP, conforme Fotografia 2.

Fotografia 2 – Porta amostras para análises de AgNP por SERS



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

III. 1.3.2.3. Caracterização morfológica – Microscopia de Força Atômica - AFM

A avaliação morfológica das AgNPQT, AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM – Nanosurf easyScan 2, Nanosurf

Instruments, Liestal, Suíça) pertencente ao Laboratório de Inovação em Nanobiotecnologia e Materiais Avançados para Pecuária - Embrapa Gado de leite (Juiz de Fora, MG). As imagens de AFM foram obtidas via modo intermitente, à temperatura ambiente, empregando-se sonda de silício (Tap 190 A1-G, Budge Sensors). A resolução do AFM foi de 512x512 pixels. Para a análise das amostras, adicionou-se 10 µL de AgNPQT, AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP sobre a superfície da mica, permanecendo por 24h em dessecador. Posteriormente, realizou-se a secagem final com jato de nitrogênio. As imagens foram avaliadas utilizando o programa de análise de dados *Gwyddion* versão 2.66.

III. 1.3.2.4. Avaliação do potencial antibacteriano *in vitro* das nanopartículas

Os ensaios para avaliação do potencial antibacteriano *in vitro* foram realizados no Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular, localizado no Centro de Pesquisas Farmacêuticas da FF/UFJF, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Maria Silvana Alves e a tutoria do doutorando Ygor Ferreira Garcia da Costa. Os métodos utilizados para o armazenamento das cepas bacterianas selecionadas e para os ensaios microbiológicos seguiram as mesmas condições aplicadas aos lipossomas; por essa razão, optou-se por não repetir a descrição detalhada neste momento.

III. 1.3.2.4.1. Cepas bacterianas e condições de cultura

Com o objetivo de aprofundar a pesquisa sobre a atividade antibacteriana *in vitro* de NPs e contribuir para o desenvolvimento de novos ANT's voltados para bactérias consideradas prioritárias pela OMS (WHO, 2024), como as cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, foram realizados ensaios microbiológicos adicionais. Para tanto, além das cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC®) *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922) e do *National Collection of Type Cultures* (NCTC®) *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13438), produtora de carbapenemase do tipo KPC-3 (Woodford et al., 2008), e *Klebsiella pneumoniae* (NCTC 13443), produtora de metalo-β-lactamase do tipo NDM-1 (<https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/klebsiella-pneumoniae-90>, acesso em 22 out. 2024), foram testadas duas cepas bacterianas clínicas, *Klebsiella pneumoniae*

KPC 495i e *Klebsiella pneumoniae* NDM 371i, isoladas de aspirado traqueal de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora/Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (HU-UFJF/EBSERH). Com exceção da *E. coli* (ATCC 25922), estas cepas foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia desta Instituição, em parceria com as pesquisas desenvolvidas pela Profa. Dra. Patrícia Guedes Garcia, no Laboratório de Microbiologia da FF/UFJF.

O serviço de microbiologia do HU-UFJF/EBSERH, após identificação fenotípica das bactérias isoladas de amostras clínicas, mantém armazenadas todas as cepas bacterianas com mecanismos de resistência. Deste arsenal, foram selecionadas as cepas deste estudo, que foi constituída de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos com testes fenotípicos positivos para carbapenemases.

A identificação fenotípica das espécies bacterianas isoladas de amostras clínicas foi confirmada pela técnica de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF). Os perfis de massas foram adquiridos com espectrômetro - MALDI-TOF MTB - Smart (Brucker®) e os espectros brutos foram processados utilizando o programa MalDI Biotyper (Bruker Daltonics), sendo essa etapa executada no Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo (São Paulo - SP, Brasil).

A obtenção do material genético das cepas bacterianas selecionadas para este estudo e a subsequente realização de testes moleculares visando à detecção específica e diferenciação dos genes codificadores de carbapenemases (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*) foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora - MG, Brasil) (Fochat et al., 2024).

As matrizes das cepas bacterianas a serem testadas foram preparadas, seguindo o mesmo procedimento utilizado no teste com lipossomas.

Este estudo seguiu rigorosamente os padrões éticos estabelecidos pela Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que define as normas e diretrizes regulamentadoras para pesquisas envolvendo seres humanos. Com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário de Juiz de Fora, com o parecer número: 6.008.128, registrado no comitê com Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 62059822.2.0000.5133. (Anexo A).

III. 1.3.2.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos estabelecidos pelo CLSI, descritos nos documentos CLSI M07-Ed12 e CLSI M100-Ed34 (CLSI, 2024_{a,b}).

As SEs das amostras a serem testadas com seus respectivos solventes/diluentes (Sol/Dil) foram preparadas conforme recomendado no documento CLSI M100-Ed34 (CLSI, 2024_b) (Tabela 7). As SEs das NPs (AgNPQT, AgNPQT-MRP, AgNPQT-ME-MRP) e dos ANTs foram preparadas nas concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente. Também foram avaliadas as soluções de QT e AgNP, sendo as duas preparadas na concentração de 1 mg/mL.

Foram utilizados como ANTs IPM e MRP devido à sua relevância, conforme descrito anteriormente.

Tabela 7 - Composição das soluções estoque (SEs) das amostras e ANTs preparadas e utilizadas na determinação da Concentração Inibitória Mínima por meio do método de microdiluição em caldo

Amostra	Volume (µL)	Solvente	Diluyente	Concentração Final SEs (mg/mL)
	Massa (mg)			
AgNPQT	900 µL 0,316 mg	100 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
AgNPQT-MRP	900 µL 10mg	100 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
AgNPQT-ME-MRP	900 µL 10mg	100 µL H ₂ O _d	100 µL H ₂ O _d	1,0
MRP	10,0	1000 µL H ₂ O _d	900 µL H ₂ O _d	10,0
IPM	10,0	1000 µL Tampão fosfato 0,1 M pH 7,2	900 µL Tampão fosfato 0,1 M pH 7,2	10,0

AgNPQT: nanopartícula de prata/quitosana; AgNPQT-MRP: nanopartícula de prata/quitosana e meropenem; AgNPQT-ME-MRP: nanopartícula de prata/quitosana e meropenem e 2-mercaptoetanol; IPM: imipenem; MRP: meropenem; H₂O_d: água destilada estéril.
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Inicialmente as AgNPQT foram sintetizadas conforme descrito no item III- 1.3.1. A solução de MRP foi adicionada no momento de preparo das amostras. Portanto, para o

preparo de AgNPQT-MRP foram fracionados 900 µL de AgNPQT e 100 µL de solução de MRP a 10mg/mL, assim AgNPQT-MRP teve concentração final de 1 mg/mL. Para o preparo da AgNPQT-ME-MRP, previamente foi feita a síntese com ME, com 900 µL de AgNPQT e 100 µL da solução de ME (10^{-6} mol/L), logo após fracionados 900 µL dessa solução anterior e adicionados 100 µL da solução de MRP a 10mg/mL, assim a AgNPQT-ME-MRP tem concentração final de 1 mg/mL.

Conforme se observa na Tabela 7, para preparo das SEs das NPs, foi escolhida água destilada estéril, devido a ser um solvente polar que proporciona boa solubilidade (CLSI, 2024_b), evitando a presença de interferentes.

Para a determinação da CIM, as matrizes das cepas bacterianas a serem testadas foram descongeladas e ambientadas, seguindo o mesmo procedimento utilizado no teste com lipossomas. A CIM foi estabelecida como a menor concentração capaz de inibir visualmente a cepa testada, conforme o conceito descrito no documento CLSI M07-A10 (CLSI, 2024_a).

III. 1.3.2.4.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e classificação do efeito antibacteriano como bactericida ou bacteriostático

Para a determinação da CBM e a classificação do efeito antibacteriano, seguiu-se o procedimento descrito por Andrews (2001), com pequenos ajustes, conforme mencionado no capítulo II sobre lipossomas.

III. 1.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Prism (versão 8.0.1) (GraphPad Software, Califórnia, Estados Unidos da América). Os dados experimentais foram submetidos a uma avaliação estatística por meio da análise de comparação múltipla por ANOVA (dados paramétricos) com post hoc de Tukey. Para todos os testes, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

III.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As AgNPs destacam-se como uma promissora plataforma no combate a infecções devido às suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro, elevada estabilidade e capacidade de atuar contra microrganismos resistentes a múltiplos fármacos (Allend et al., 2024; Rashki et al., 2021; Vishwanath; Negi, 2021). Essas propriedades podem ser potencializadas quando as AgNPs são associadas à QT, um polímero natural biocompatível, biodegradável e dotado de atividade antimicrobiana intrínseca (Chicea et al., 2023). A interação entre as AgNPs e a QT pode levar à formação de sistemas sinérgicos que aumentam a eficácia antimicrobiana, promovendo uma ação mais eficaz. Essa associação também pode favorecer a estabilidade coloidal e prolongar a liberação controlada de íons prata, maximizando sua eficácia terapêutica enquanto minimiza a toxicidade sistêmica (Campo-Beleño et al., 2022; Kalaivani et al., 2018). Em um cenário de crescente RAM, o desenvolvimento de sistemas híbridos baseados em AgNPs e QT apresenta-se como uma estratégia inovadora e altamente relevante para enfrentar esse desafio global, oferecendo novas possibilidades para o tratamento de infecções resistentes.

Abaixo estão descritos os resultados referentes ao desenvolvimento e caracterização das AgNPsQT contendo MRP.

III.2.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

No método de redução química, o sal iônico foi reduzido na presença de borohidreto de sódio e citrato de sódio. A QT foi utilizada como agente estabilizador, buscando também aprimorar a atividade biológica. O ME foi adicionado à suspensão de AgNPQT-MRP com o intuito de aumentar a interação do metal com o MRP, tendo a função de modificador de superfície, promotor de ligação de hidrogênio (Filgueiras, 2016). As formulações desenvolvidas apresentaram característica macroscópica homogênea e cor âmbar típico de coloides de prata (Fotografia 3) e foram avaliadas em relação às suas propriedades físico-químicas, morfológicas e biológicas *in vitro*.

Fotografia 3 – Colóide de nanopartículas de prata sem quitosana (à esquerda) com quitosana (à direita)



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

III. 2.1.1. Diâmetro hidrodinâmico médio (DHm), Índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta (PZ)

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de DHm, Pdl e PZ das NPs “brancas” (sem a presença do MRP - AgNPQT), daquelas contendo o MRP (AgNPQT-MRP), assim como das AgNPQT-ME-MRP, com a adição de ME (agente adsorvente).

Tabela 8 - Valores* de Diâmetro Hidrodinâmico médio, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta para as AgNPQT e AgNPQT-MRP

	DHm (nm)	Pdl	PZ (mV)
AgNPQT	90,05 ± 3,10 ^a	0,518 ± 0,03 ^c	+40,17 ± 1,33 ^d
AgNPQT-MRP	81,35 ± 2,49 ^{a,b}	0,527 ± 0,02 ^c	+41,40 ± 1,00 ^d
AgNPQT-ME-MRP	75,21 ± 6,06 ^b	0,542 ± 0,02 ^c	+41,60 ± 1,13 ^d

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n=3)

**Letras iguais representam valores sem diferença estatisticamente significativa (ANOVA seguida de teste de Tukey)

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

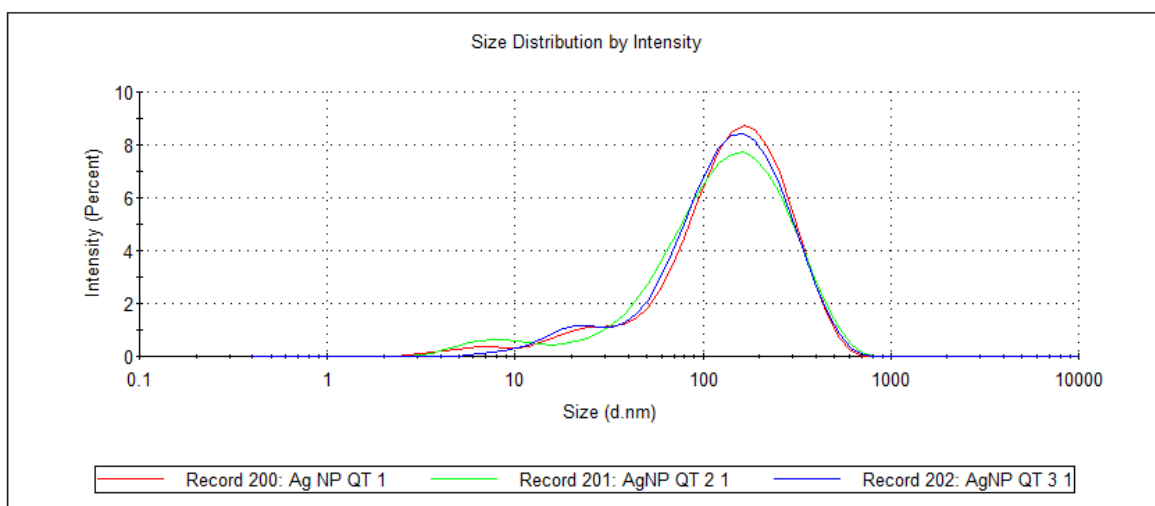
O DHm das NPs foi consistente com os valores reportados na literatura (Allend et al., 2024; Honary et al., 2011). A adsorção do MRP à superfície das partículas não alterou significativamente o diâmetro médio, possivelmente devido ao fato de o MRP ser uma molécula pequena, com baixa massa molar (Honeycutt et al., 2023). Além disso, a

presença da QT, que já atua como uma camada externa estabilizadora, pode limitar a capacidade do MRP de influenciar as dimensões das partículas.

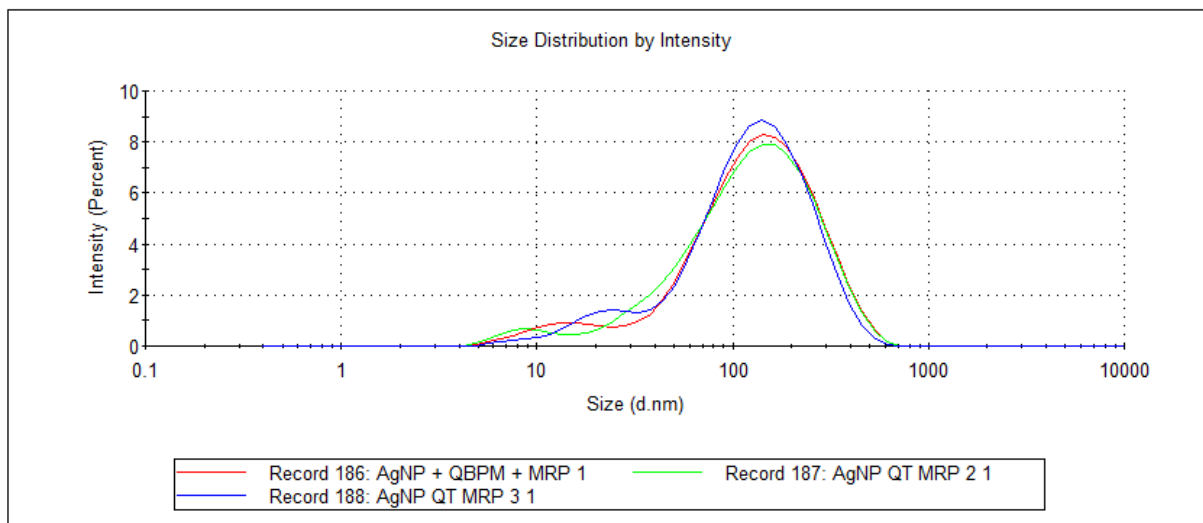
Por outro lado, a adição de ME resultou em uma redução significativa no DHm das NPs (Tabela 8). Uma possível explicação pode estar atrelada à capacidade desse adsorvente, por meio de seus grupos tiol altamente reativos, de formar ligações de hidrogênio com a superfície das AgNPs, promovendo uma reorganização estrutural de sua camada superficial (Filgueiras, 2013). Além disso, estudos apontam que o ME em menor concentração promove uma cinética de agregação bem mais lenta, mostrando uma distribuição de tamanhos mais estreita (Filgueiras, 2013). Esse perfil pode ser visualizado na Figura 30, que traz a distribuição de tamanho das NPs por intensidade.

Figura 30 – Distribuição de tamanho das AgNPQT (a), AgNPQT-MRP (b) e AgNPQT-ME- MRP (c) por intensidade (n=3)

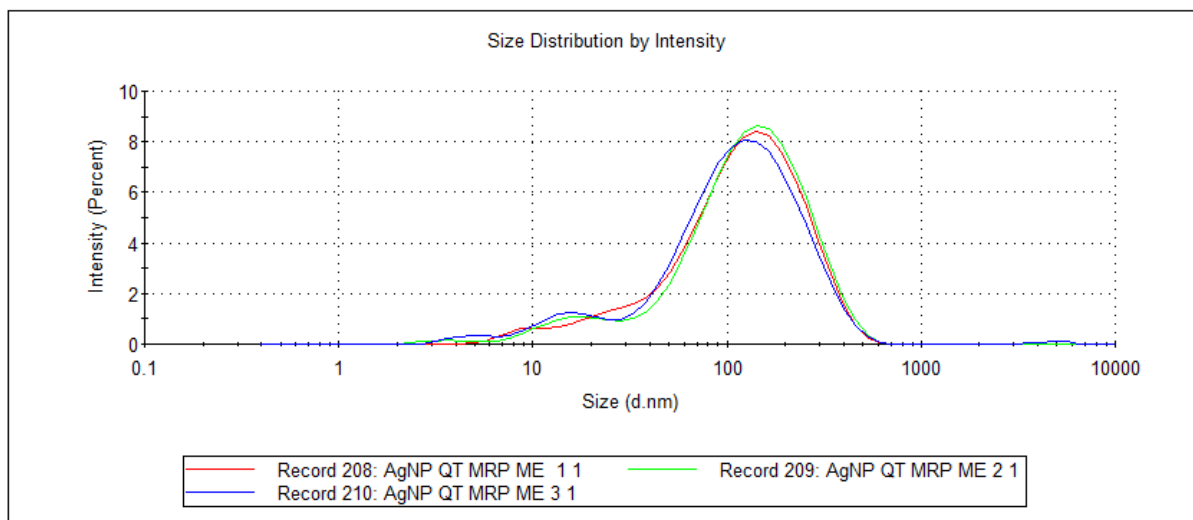
(a)



(b)



(c)



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Em relação ao Pdl, foram obtidos valores em torno de 0,5 (Tabela 8). Embora esses valores estejam em concordância com dados reportados na literatura (Kango et al., 2013), eles indicam uma considerável heterogeneidade na distribuição de tamanho das NPs, o que pode afetar negativamente a estabilidade coloidal e a performance biológica. Essa elevada dispersão pode ser atribuída ao processo de amadurecimento de Ostwald, no qual algumas partículas permanecem em formação durante a etapa de

nucleação, enquanto outras já estão completamente formadas, resultando na coexistência de partículas de diferentes tamanhos. Além disso, estudos destacam que o uso de NaBH_4 , um agente redutor potente, pode intensificar a polidispersão das AgNPs ao acelerar a taxa de nucleação durante a síntese, contribuindo para uma maior variabilidade no tamanho das partículas (Quintero-Quiroz et al., 2019).

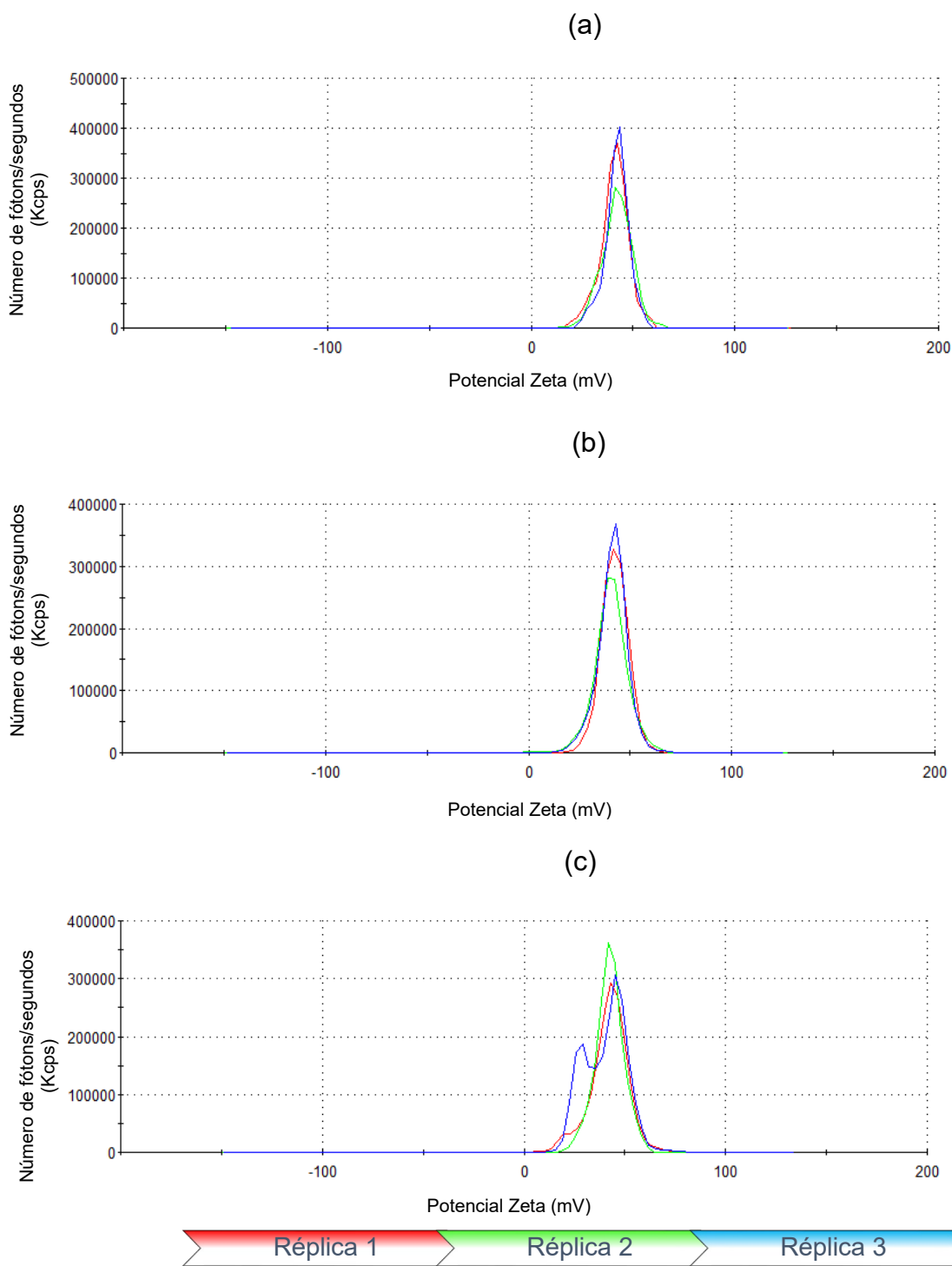
Em relação ao PZ, foram observados valores positivos, refletindo a presença da QT na superfície das partículas. Esses valores resultam das interações eletrostáticas entre os grupos catiônicos protonados da QT ($-\text{NH}_3^+$) e a superfície das AgNPs recém-formadas, o que contribui para sua estabilização e impede a agregação das partículas (Brasil, 2017).

Quanto ao PZ, é importante destacar que um dos principais mecanismos de ação antibacteriana das AgNPQT está relacionado à interação eletrostática com a membrana celular dos microrganismos. A carga positiva das partículas desempenha um papel crucial nesse processo, favorecendo a adesão às células bacterianas e potencializando a atividade antimicrobiana. Estudos indicam que, quanto maior o valor do PZ, maior é a eficácia antibacteriana das NPs (Mirda et al., 2021).

É interessante ressaltar ainda que não houve diferença significativa entre os valores de PZ das diferentes amostras. O fato de o ME não ter contribuído para a alteração do PZ pode ser atribuído à manutenção das interações eletrostáticas entre os grupos catiônicos da QT e a superfície das NPs, mesmo na presença desse adsorvente. Nesse contexto, o ME atua principalmente formando ligações de hidrogênio com a superfície das NPs, sem alterar significativamente a carga global das partículas (Filgueiras, 2015). Dessa forma, a carga positiva associada à QT prevalece, mantendo o PZ positivo. Os gráficos de distribuição do PZ das amostras estão apresentados na Figura 31.

Figura 31- Gráfico de distribuição do potencial Zeta das nanopartículas (n=3)

a) AgNPQT; b) AgNPQT-MRP; c) AgNPQT-ME-MRP



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

III. 2.1.2. Espectroscopia RAMAN

A espectroscopia Raman baseia-se no efeito Raman, que está relacionado ao espalhamento da luz. Esse processo pode ser interpretado como uma transferência de energia entre os fótons envolvidos no espalhamento inelástico e a molécula. Assim, as propriedades estruturais de cada molécula podem ser identificadas por meio da detecção da mudança de energia do fóton, ou seja, a frequência do modo vibracional que sofreu transição, já que cada molécula possui um espectro Raman único.

Os picos característicos do MRP foram claramente identificados. A banda associada ao estiramento da ligação C=C nos anéis bicíclicos fundidos β -lactâmico e pirrolidínico foi localizada em 1551 cm^{-1} (Cielecka-Piontek et al., 2013). As bandas relacionadas às vibrações de tesoura e oscilação das ligações CH no grupo dimetilcarbamoil apareceram em torno de 1460 cm^{-1} , enquanto as vibrações de estiramento da ligação CN no anel β -lactâmico foram detectadas em 1390 cm^{-1} . Além disso, as vibrações de estiramento da ligação CN entre o átomo de nitrogênio e o grupo metil foram identificadas em 1262 cm^{-1} (Abdelkader et al., 2017), e a banda referente à ligação CC no anel β -lactâmico foi observada em 1057 cm^{-1} . A banda em 987 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de estiramento da ligação CC do anel β -lactâmico, e as vibrações de estiramento da ligação CN entre o átomo de nitrogênio e os grupos metila foram observadas na banda de 809 cm^{-1} . Finalmente, as vibrações de flexão das ligações CO-H do grupo carboxílico foram registradas em 660 cm^{-1} (Cielecka-Piontek et al., 2013) (Figura 32).

O espectro Raman da QT exibiu várias bandas características, destacando-se o alongamento da ligação C-N a 900 cm^{-1} , o alongamento da ligação C-C entre $1050 - 1200\text{ cm}^{-1}$, a flexão da ligação C-N-H entre $1290 - 1350\text{ cm}^{-1}$, e a banda amida-III em 1457 cm^{-1} (Figura 32).

Os espectros dos materiais puros de partida — MRP e QT — estão em concordância com a literatura, permitindo a identificação dos picos característicos em ambos (Cielecka-Piontek et al., 2013; Nirmala et al., 2011).

III. 2.1.3. Espectroscopia SERS

A espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS – do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*) foi descoberta em um estudo que utilizou um eletrodo de prata quimicamente ativado por ciclos de oxidação e redução do metal, criando uma superfície rugosa capaz de amplificar significativamente o sinal Raman da piridina quando em contato com esse analito (Fleischmann et al., 1974). Posteriormente, observou-se que o uso de AgNPs leva a uma amplificação extrema do sinal Raman, até mesmo na detecção de uma única molécula. Essa intensificação, no entanto, não decorre apenas do aumento da área superficial do metal, mas é atribuída a um novo fenômeno, denominado SERS. Este efeito pode ser explicado pelo efeito eletromagnético, que descreve a oscilação coletiva dos elétrons de condução na superfície dos metais, como a prata, induzida pela radiação eletromagnética quando os fótons estão em ressonância com a transição eletrônica da superfície metálica (Filgueiras et al., 2015).

Cada vez mais utilizada na pesquisa biológica (Zong et al., 2018), a espectroscopia SERS é uma técnica poderosa de análise de superfícies que preserva as informações únicas da espectroscopia Raman. Neste estudo, ela é relevante para determinar a identidade e a orientação dos sítios de interação do MRP com as AgNPs.

Os resultados indicam uma interação eletrostática entre o MRP e a NP. Observou-se, em 1551 cm^{-1} , uma banda associada ao estiramento da ligação C=C nos anéis bicíclicos fundidos β -lactâmico e pirrolidínico, característica do MRP (Cielecka-Piontek et al., 2013). Além disso, a banda em 987 cm^{-1} , relacionada às vibrações de estiramento da ligação CC do anel β -lactâmico, aparece na AgNPQT-MRP, mas não na AgNPQT. Da mesma forma, a intensidade da banda em 660 cm^{-1} , referente ao grupo carboxílico (Cielecka-Piontek et al., 2013), surge na AgNPQT-MRP, mas está ausente na AgNPQT. Esses achados sugerem que, seguindo o protocolo de preparação das NPs, houve uma interação entre o MRP e as AgNPQT (Figura 32).

Os espectros SERS das AgNPQT-MRP com e sem o modificador de superfície (ME) apresentam diferenças, no entanto, há coincidência entre algumas bandas, tais como, 1750 , 1551 e 1057 cm^{-1} . Além disso, a intensificação das bandas 1262 e 1390 cm^{-1} com ME está associada à adsorção, que ocorre devido à maior proximidade com a superfície metálica. A presença dessas bandas na AgNPQT-ME-MRP, atribuídas a modos normais envolvendo estiramento de ligações C-N do anel β -lactâmico, sugere que

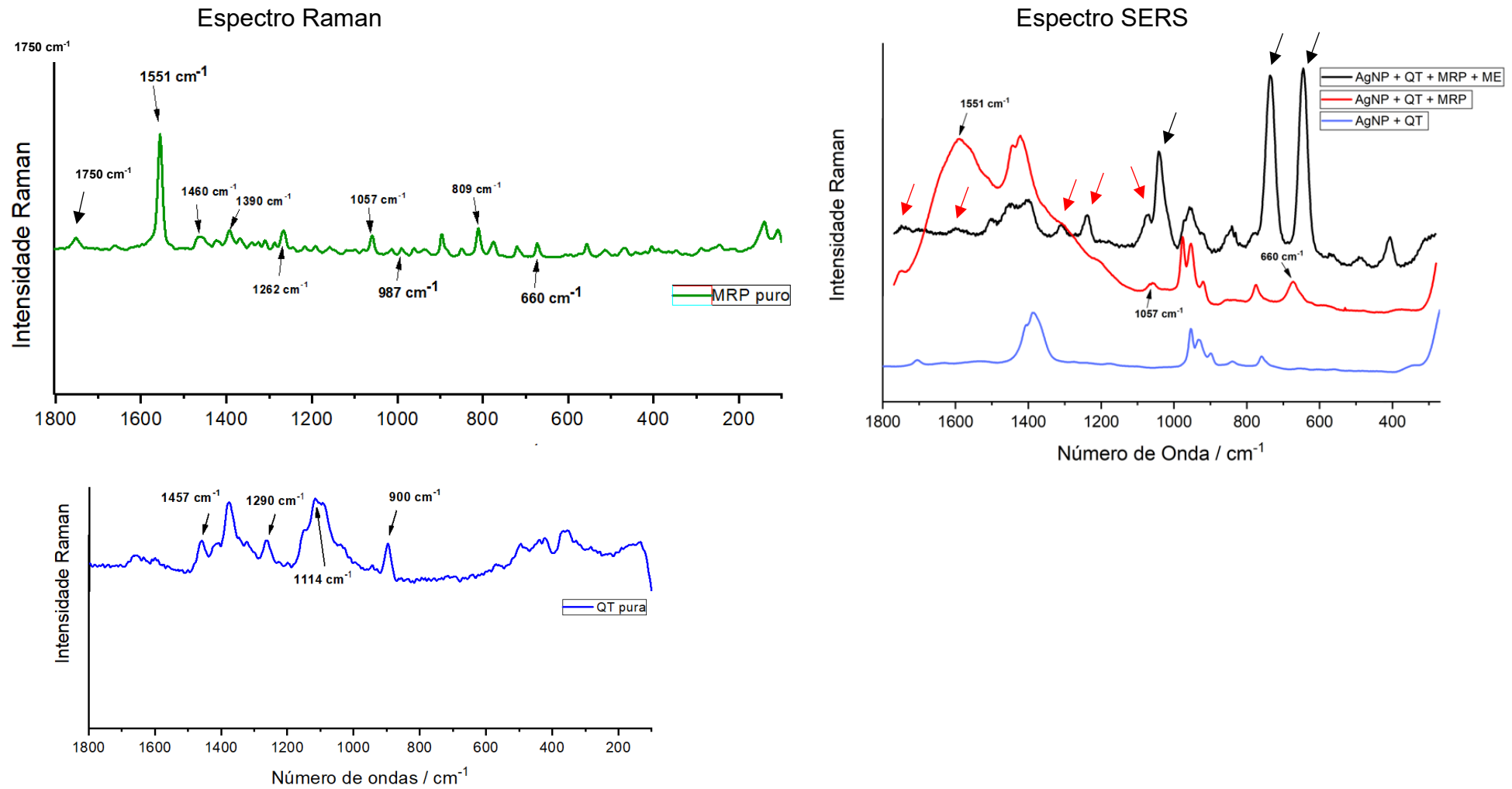
ligações de hidrogênio entre a hidroxila do modificador de superfície e os grupos amina do adsorbato resultaram em uma maior proximidade entre o MRP e a superfície metálica.

Foi possível observar que o MRP tem afinidade pela prata, foi adsorvido à superfície da AgNP e como foi possível observar bandas características dele na presença do ME, possivelmente ele foi adsorvido também em sítios de ancoragem do modificador de superfície, conforme Figura 32.

Na AgNPQT-ME-MRP, surgem duas bandas C-S em 629 cm^{-1} e 718 cm^{-1} , características do ME, que acabam obscurecendo os sinais do MRP. Além disso, em 1016 cm^{-1} , aparece uma banda distintiva do ME (Belgo et al., 2022), em destaque na Figura 32. Como o ME foi utilizado em uma concentração de 10^{-4} , sua alta afinidade pela prata pode estar competindo com o MRP, possivelmente deslocando-o da superfície da NP. Seria importante testar a redução da concentração de ME, o que poderia favorecer a adsorção do MRP, mas esse teste não foi realizado. Parece que o MRP atingiu o limite de saturação de adsorção, e a competição com o ME pode estar reduzindo essa adsorção. A diminuição da concentração de ME poderia alterar esse equilíbrio, favorecendo uma maior adsorção do MRP, já que o ME também auxilia na ancoragem do MRP à superfície da nanopartícula.

Os espectros resultantes dessas análises estão apresentados na Figura 32.

Figura 32 - Espectro Raman de meropenem puro e Espectro Raman de superfície modificada - SERS das nanopartículas de prata/quitosana



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

III. 2.1.4. Avaliação Morfológica - Microscopia de Força Atômica – AFM

A avaliação morfológica das amostras AgNPQT, AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP foi realizada utilizando Microscopia de Força Atômica (AFM – do inglês *Atomic Force Microscopy*). Essa técnica fornece informações topográficas detalhadas da amostra com alta resolução tridimensional na escala nanométrica, permitindo a obtenção de imagens e a caracterização da superfície das nanopartículas, pela técnica de varredura por sonda. Uma de suas principais vantagens é a capacidade de visualizar NPs individuais, fornecendo dados valiosos sobre seu tamanho, forma e distribuição. Além disso, a AFM permite a análise de processos dinâmicos, como a agregação de partículas (Chicea et al., 2023).

O princípio básico do AFM está nas forças de interação entre a ponta da sonda e a superfície da amostra, como as forças de Van der Waals, eletrostáticas, magnéticas e de ligação química, entre outras. Quando a ponta se aproxima da superfície da amostra, essas forças provocam uma deflexão no cantilever, que geralmente é medida por um procedimento de deflexão de feixe de laser. A deflexão é determinada pela diferença na intensidade do feixe registrada por um fotodiodo de quatro quadrantes. Essa deflexão é então utilizada para controlar a posição da ponta na direção vertical, mantendo uma distância constante entre a ponta e a superfície da amostra, definida como "setpoint" (Giessibl, 2003).

Neste trabalho, utilizamos um microscópio de força atômica EasyScan 2 FlexAFM Sample Stage, com a amostra fixada em um substrato e o scanner movendo-se sobre a amostra. O substrato utilizado foi a mica, que foi limpa logo antes da deposição da amostra para garantir que a superfície estivesse livre de contaminação por macromoléculas ou partículas finas de poeira presentes no ar do laboratório. As suspensões de AgNPQT, AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP, preparadas conforme descrito na subseção que apresenta o procedimento de síntese, foram depositadas, cuidadosamente, como uma pequena gota com o auxílio de um pipetador. A solução foi deixada evaporar lentamente, e as nanopartículas permaneceram aderidas ao substrato.

O scanner AFM e o conjunto do suporte de amostra estavam localizados em uma laje de granito maciça e espessa, suspensa em uma caixa personalizada, para garantir o

isolamento de possíveis vibrações no edifício. O cantilever utilizado contava com uma ponta não muito afiada, podendo apresentar medidas de largura superestimadas devido a artefatos de escaneamento causados pelo raio da ponta, pois a ponta maior pode fazer com que as nanopartículas aparentem ter tamanhos maiores do que realmente são. Assim, para evitar essa incerteza, avaliamos os dados de altura, por cortes de seção transversal.

A avaliação topográfica indica que as partículas possuem formato esférico e tamanho nanométrico, com gráficos representando uma área de 5 μm x 5 μm (Figura 33). Apesar da homogeneidade observada, algumas variações foram identificadas entre as amostras. Na análise da imagem da AgNPQT (Fig. 33 - a), são visíveis diferenças de altura, onde as cores mais claras correspondem a áreas elevadas e as mais escuras a regiões mais baixas. A altura máxima ao longo da linha de corte transversal foi de 116 nm (imagem superior) e 82 nm (imagem inferior), sugerindo que as estruturas na superfície atingem essa altura em relação ao ponto mais baixo. A presença de partículas aglomeradas pode estar relacionada à síntese das nanopartículas ou ao processamento prévio da amostra.

Em contraste, a imagem das AgNPQT-MRP (Fig. 33 - b) revela uma distribuição mais uniforme das partículas, com diversos pontos claros, indicando uma maior dispersão em comparação com as AgNPQT (a), que apresentavam áreas mais concentradas. A altura máxima registrada nesta amostra foi de 55 nm (imagem superior) e 42 nm (imagem inferior), sugerindo nanopartículas menores nesse campo específico. Embora a distribuição pareça mais homogênea, algumas regiões exibem sombras ao redor das partículas mais brilhantes, indicando um possível arraste durante o processo de secagem.

Ao analisar as AgNPQT-ME-MRP (Fig. 33 - c), observa-se uma maior aglomeração de partículas, com áreas de brilho intenso que representam elevações acentuadas. Essas regiões podem indicar a formação de conglomerados densos, possivelmente decorrentes do processo de preparação da amostra. A altura máxima registrada nesta amostra foi de 98 nm (imagem superior) e 58 nm (imagem inferior). Essas variações sugerem que, nesta amostra, as partículas apresentam alturas polidispersas. Além disso, sombras e faixas ao redor das áreas mais brilhantes podem indicar a presença de um filme ou camada

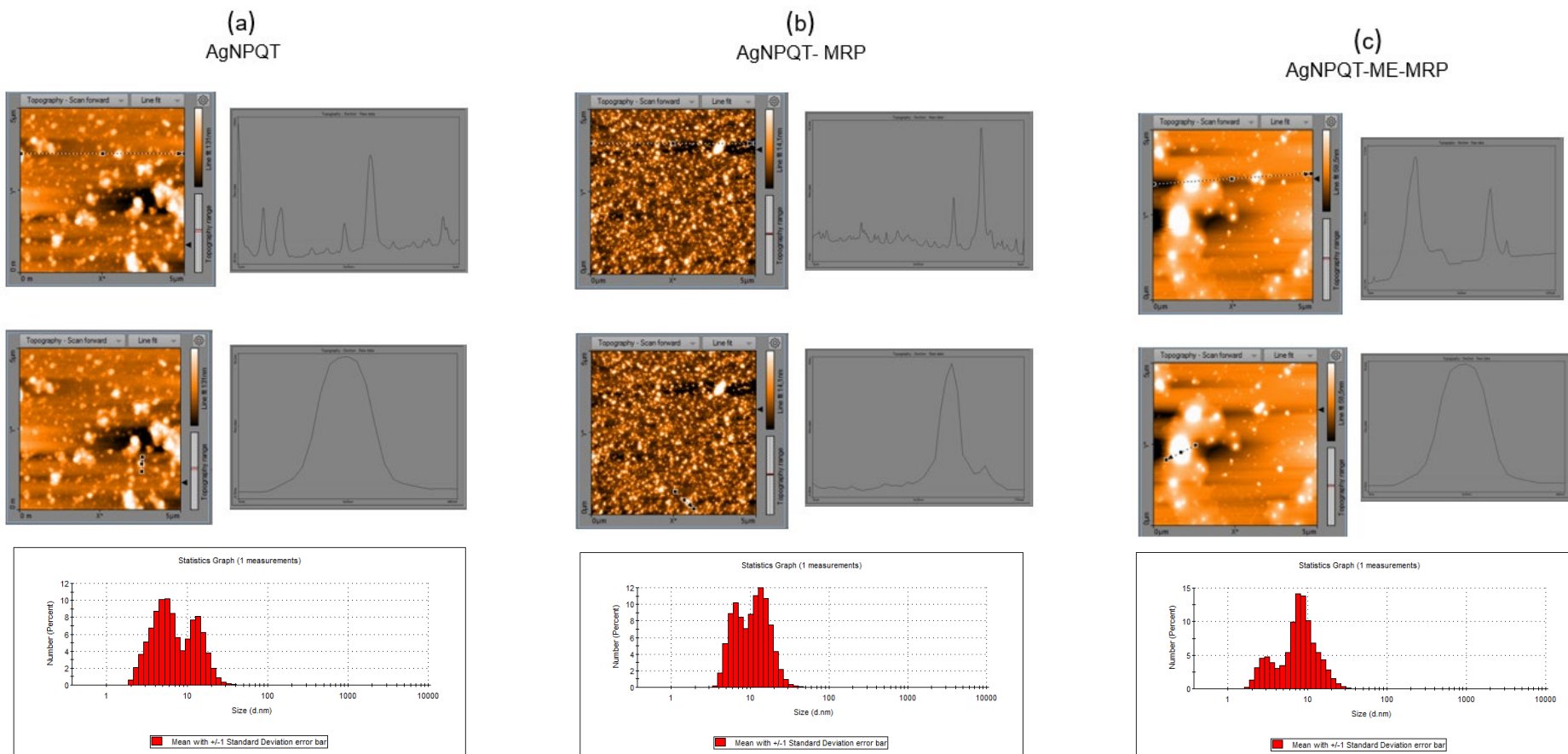
polimérica envolvendo as nanopartículas, resultando em deformações visíveis. Embora existam regiões com nanopartículas mais altas e mais baixas, as áreas de maior altura estão concentradas em locais específicos, indicando uma certa heterogeneidade na distribuição das partículas.

As seções transversais das nanopartículas de prata revelaram contornos bem definidos. A análise topográfica indica que as partículas possuem uma forma esférica, com picos suaves e sem ombros, sugerindo um movimento regular do cantiléver ao subir e descer (Figura 33).

O formato das nanopartículas desempenha um papel essencial na atividade antibacteriana, especialmente geometrias isotrópicas, como partículas esféricas. Essas nanopartículas esféricas demonstraram alta eficácia antibacteriana, possivelmente devido à grande relação superfície-volume, que fornecem a reatividade máxima para obter a maior atividade antibacteriana (Adeniji et al., 2022).

O tamanho das partículas está em conformidade com a distribuição medida pelo DLS. Algumas áreas apresentam partículas de tamanhos mais uniformes, enquanto outras exibem uma maior variabilidade (Figura 33). A análise de AFM é realizada diretamente nas imagens obtidas e as amostras são desidratadas, o que pode induzir a agregação ou deformação após sua deposição sobre a superfície da mica, além da possibilidade de interação com a sonda ocasionar alterações na mesma. Ao passo que, na técnica espectroscópica, mede-se o raio hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão e, portanto, não há quaisquer alterações na amostra. No entanto, a partir da avaliação dos gráficos de distribuição de tamanho por número das AgNPQT: AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP (Figura 33a, 33b e 33c), obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, pode-se constatar faixas de distribuição compatíveis com os valores observados quando da determinação do diâmetro, nos campos avaliados por AFM.

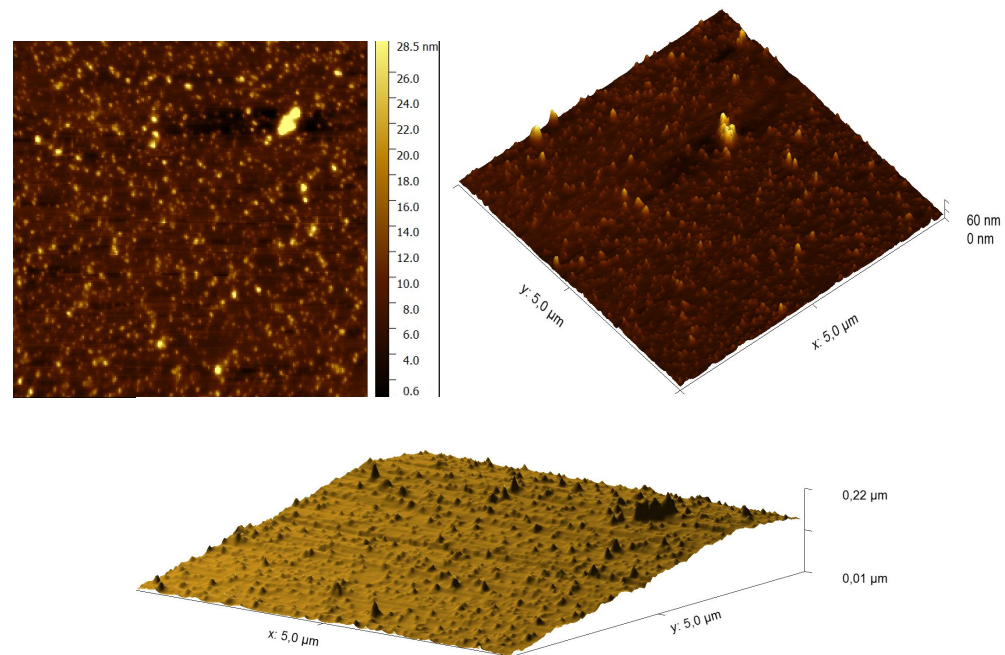
Figura 33 – Microscopia de Força Atômica para as nanopartículas de prata/quitosana.



AgNPQT: nanopartículas de prata/quitosana; AgNPQT-MRP: nanopartículas de prata/quitosana com Meropenem; AgNPQT-ME-MRP: nanopartículas de prata/quitosana com 2-mercaptoetanol e meropenem.

Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Figura 34 – Microscopia de Força Atômica em 3D para as AgNPQT-MRP.



AgNPQT-MRP: nanopartículas de prata/quitosana com meropenem

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

III. 2.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO *IN VITRO*

III. 2.2.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima seguida da classificação do efeito antibacteriano em bactericida ou bacteriostático

Considerando que: i) o MRP é um ANT carbapenêmico de última linha contra infecções bacterianas graves e que a resistência a ele é uma ameaça crescente na terapia antibacteriana (Doi, 2019); ii) que a *K. pneumoniae* representa uma grande ameaça por causar infecções graves (Pesesky et al., 2015); iii) e que as carbapenemases de classe A, do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), e de classe B, do tipo NDM (*New Delhi* metalo-beta-lactamase), são extremamente relevantes (Pesesky et al., 2015), foram adicionadas, para esta etapa do estudo, duas cepas clínicas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos (*K. pneumoniae* KPC 495i e *K. pneumoniae* NDM 371i), conforme descrito anteriormente.

A associação de AgNPs com diferentes ANTs, entre eles Ceftazidima, IMP, MRP e Gentamicina foi estudada por Malawong et al. (2021), frente a cepas de *Burkholderia pseudomallei*, bactéria Gram-negativa. Os resultados deste estudo sugerem reduções nas doses dos ANTs e combinações com efeito sinérgico (Malawong et al., 2021). AgNPs associadas com IMP apresentaram interação sinérgica com redução na concentração do ANT em diferentes cepas de *K. pneumoniae*, tanto nas formas planctônicas quanto no biofilme. Esse resultado sugere uma possível redução na viabilidade de cepas bacterianas em concentrações mais baixas de ANTs (Fontoura et al., 2023). No estudo de Allend et al. (2024) feito com AgNPs frente a cepas resistentes e de referência de *A. baumannii*, a atividade antibacteriana foi avaliada e mostrou efeito sinérgico e aditivo. O aumento de células inviáveis no biofilme também foi observado, após tratamento com AgNPs em cepas resistente a carbapenêmicos (Allend et al., 2024).

A Tabela 9 apresenta os valores de CIM e CBM obtidos com a QT, AgNP, AgNPQT, AgNPQT-MRP, AgNPQT-ME-MRP, IPM e MRP frente às cepas de *K. Pneumoniae* testadas. Pela análise desta tabela, as AgNPQT-MRP foram mais efetivas que as AgNPQT, sendo capazes de inibir as cepas testadas com valores de CIM variando de 31,3 a 125 µg/mL. Tal resultado era esperado, mostrando que houve a funcionalização

das NPs através de uma ligação amida entre o grupo COO^- do MRP e o NH_2^+ presente na superfície da AgNPQT. Sugerimos aqui que a QT provavelmente facilita a ancoragem das NPs na membrana bacteriana mais externa. A ancoragem provavelmente resulta na penetração das NPs na membrana bacteriana causando a morte do microrganismo.

Em relação à CBM, as amostras de QT, AgNPQT, AgNPQT-MRP, AgNPQT-ME-MRP apresentaram valores até duas concentrações acima da CIM, sugerindo que concentrações mais altas dessas NPs são necessárias para matar as bactérias, em comparação com a quantidade necessária para apenas inibir o crescimento (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) obtidos com a solução de QT, AgNP, AgNPQT, AgNPQT-MRP, AgNPQT-ME-MRP, Imipenem (IPM) e Meropenem (MRP) frente às cepas bacterianas clínicas e de referência.

Cepa bacteriana	CIM (µg/mL)							CBM(µg/mL)			
	QT	AgNP	AgNP QT	AgNP QT-MRP	AgNPQT ME-MRP	IPM	MRP	QT	AgNP QT	AgNP QT-MRP	AgNPQT ME-MRP
Ej.coli ATCC 25922	500 ¹	> 500	125 ²	<0,25	<0,25	0,5	<0,25	500	250	0,25	0,25
kj.pneumoniae.NDM 371i	500 ²	> 500	125 ²	62,5 ²	62,5 ²	>500	500	>500	250	125	125
kj.pneumoniae KPC 495i	500 ¹	> 500	125 ²	31,3 ²	31,3 ²	250	62,5	500	250	125	125
kj.pneumoniae (NCTC 13443)	500 ²	> 500	125 ²	62,5 ²	125 ²	>500	>500	>500	250	250	500
kj.pneumoniae (NCTC 13438)	500 ¹	> 500	125 ²	125 ²	125 ²	500	>500	500	500	500	500

QT: suspensão de quitosana; AgNP: nanopartículas de prata; AgNPQT: nanopartículas de prata/quitosana; AgNPQT-MRP: nanopartículas de prata/quitosana e meropenem; AgNPQT-ME-MRP: nanopartículas de prata/quitosana, 2-mercaptoetanol e meropenem; IPM: imipenem; MRP: Meropenem; ATCC: *American Type Culture Collection*; NCTC: *National Collection of Type Cultures*; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM: *New Delhi metallo-beta-lactamase*; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; ¹ : Bactericida; ² : Bacteriostático.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os valores de CIM obtidos para *E. coli* (ATCC 25922), com 0,5 µg/mL para IPM e <0,25 µg/mL para MRP (Tabela 9), corroboram os critérios do CLSI M100-Ed34 (CLSI 2024_b). Segundo este documento, CIMs entre 0,06 e 0,5 µg/mL para IPM confirmam a qualidade do teste realizado, evidenciando a sensibilidade esperada da cepa. Por outro lado, CIMs abaixo de 0,25 µg/mL para MRP não foram avaliados, uma vez que a menor concentração testada foi de 0,25 µg/mL, limitando a avaliação dentro da faixa prevista pelo CLSI. A CIM obtida para IMP está alinhada com os padrões de sensibilidade esperados para *E. coli* (ATCC 25922), reforçando a adequação do método, conforme descrito no capítulo II.

Analizando os resultados, foi possível observar que a suspensão de QT isolada, mesmo sem a presença de MRP apresentou inibição dentro do gradiente de concentração utilizado (500 µg/mL), frente a todas as cepas e efeito bacteriostático para *K. pneumoniae* NDM 371i e *K. pneumoniae* (NCTC 13443) que são produtoras de metalobetalactamases, e efeito bactericida para *K. pneumoniae* (NCTC 13438) e *K. pneumoniae* KPC 495i, ambas produtoras de serinobetalactamases. Extensas pesquisas abrangendo estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo QT em várias formas com diferentes pesos moleculares, explora seu potencial antimicrobiano contra uma variedade de microrganismos, incluindo fungos e bactérias. Shanmugam et al. (2016) investigaram a atividade antibacteriana da QT contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inclusive *K. pneumoniae*, usando o método de difusão em ágar e determinação da CIM; a QT mostrou boa atividade antibacteriana contra ambas as classes de bactérias (Shanmugam et al., 2016). Estudo conduzido por Ardean et al. (2021) indica que, devido à composição química das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, a interação da QT é diferente para cada uma delas. O efeito bactericida em bactérias Gram-negativas, ocorre devido à maior afinidade dos grupos amino pelos radicais aniônicos presentes na parede celular e, também à hidrofiliidade significativamente maior dessas bactérias em comparação com as bactérias Gram-positivas. A QT, principalmente de maior peso molecular, também apresenta efeito bactericida em bactérias Gram-positivas pela capacidade de bloqueio direto impedindo que nutrientes e oxigênio entrem no espaço intracelular bacteriano (Ardean et al., 2021).

Como mencionado anteriormente, há muitos relatos sobre a atividade antibacteriana das AgNPs. No entanto, os resultados obtidos com as AgNPs isoladas não corroboram esses dados, pois, em todos os ensaios realizados, não foi possível determinar a CIM, sendo inativa frente a todas as cepas testadas no gradiente de concentração estabelecido. Durante o experimento, observamos uma mudança na coloração das amostras em concentrações mais elevadas, o que acreditamos ter interferido nos resultados da análise. A literatura sugere que as características físico-químicas dos meios de cultura podem influenciar tanto a estabilidade quanto a atividade antibacteriana das AgNPs. A composição desses meios afeta aspectos importantes das AgNPs, como DHm, PZ, a agregação e liberação de íons de prata. Meios de cultura considerados complexos, como o CMH, podem reduzir a eficácia antibacteriana das AgNPs ao promover a agregação, especialmente em meios com maior complexidade química (Vazquez-Muñoz et al., 2020).

Millour et al. (2015) demonstraram que a presença de sais, como NaCl, CaCl₂ ou MgCl₂, comumente encontrados em meios de cultura cátion ajustado, provoca a agregação das AgNPs. Além disso, a matéria orgânica presente em meios complexos, como triptona ou extrato de levedura, também altera a taxa de agregação nesse ambiente (Millour et al., 2015). Meios de cultura com diferentes composições, como o CMH, influenciam o tamanho hidrodinâmico das AgNPs, favorecendo interações que promovem a agregação (Gimenez-Ingalaturre et al., 2022). Em contraste, nas amostras sintetizadas com QT, não foi observada essa mudança de coloração, o que sugere que a QT protege a formulação (Zienkiewicz-Strzałka et al., 2019). Ademais, Loza et al. (2014) concluíram que compostos contendo grupos tiol, como o ME, podem bloquear a superfície das partículas, impedindo sua agregação (Loza et al., 2014).

As suspensões aquosas de QT e AgNPs apresentaram separadamente baixos efeitos antibacterianos, mas foi observada sinergia quando ambos os componentes foram combinados como a mistura binária AgNPQT, promovendo uma redução na CIM (Archana et al., 2015). As diferentes afinidades químicas da prata metálica e da QT para locais específicos da parede celular da bactéria podem ser uma explicação para tal ação antibacteriana intensificada (Brasil et al., 2018). Em todas as amostras testadas, a CIM foi de 125 µg/mL e efeito bacteriostático, este valor quatro vezes menor em comparação

com as amostras contendo apenas AgNPs isoladas. Embora essa redução tenha ocorrido, ainda não foi significativa a ponto de retornar à sensibilidade dessas bactérias. Estudo realizado com AgNPs em tamanhos similares ao que encontramos foram realizados, e os resultados foram correspondentes (Bruna et al., 2021). Em relação ao MRP puro, estes resultados também foram favoráveis, especialmente no comparativo entre as cepas de referência testadas.

Esses achados estão em conformidade com dados da literatura, que destacam a vantagem promissora das AgNPs revestidas com QT. Em um estudo realizado por Santos et al. (2021), que avaliou a atividade de AgNPQT contra bactérias resistentes por diferentes métodos de síntese, todas as formulações desenvolvidas demonstraram atividade bactericida. Além disso, investigou-se se as AgNPs induziriam tolerância nas bactérias, e o estudo concluiu que, após 20 exposições bacterianas sucessivas às NPs, não houve aumento significativo na CIM (Santos et al., 2021).

Resultados promissores foram obtidos ao comparar as formulações AgNPQT-MRP com MRP isolado. A associação de QT com AgNP na presença do MRP, demonstrou eficácia superior em relação às outras formulações testadas. Para a cepa de *k. pneumoniae* NDM 371i, tanto as AgNPQT-MRP quanto as AgNPQT-ME-MRP apresentaram CIMs de 62,5 µg/mL. Já para a cepa de *K. pneumoniae* (NCTC 13443), as CIMs foram de 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente, com efeito bacteriostático para todas, demonstrando um potencial para inibir essa cepa resistente, dentro do gradiente testado. Para a cepa *K. pneumoniae* KPC 495i, as formulações AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP tiveram o melhor desempenho, com CIM de 31,3 µg/mL, sugerindo que essas formulações podem ser eficazes contra essa cepa. Em relação a *K. pneumoniae* (NCTC 13438), as AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP mostraram CIM de 125 µg/mL, com efeito bacteriostático, enquanto o MRP isolado apresentou uma CIM superior a 500 µg/mL, indicando que as NPs favoreceram a atividade do MRP.

Em relação à adição de ME nas formulações, para aumentar a adsorção do MRP, os resultados não mostraram diferença significativa entre AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP. Portanto, visando o uso de uma formulação com menor potencial citotóxico, consideramos mais adequado seguir com uma formulação que não contenha esse agente.

A combinação do MRP e AgNPQT pode aumentar a afinidade de ligação aos seus alvos, melhorar a penetração através da barreira da parede celular e, assim, aumentar a eficácia do fármaco contra a resistência bacteriana. Além disso, usar três agentes antibacterianos com diferentes mecanismos bactericidas ao mesmo tempo é importante porque se as bactérias se tornarem resistentes a um agente, o outro poderá inibir o patógeno (Haji et al., 2022).

III. 3. CONCLUSÃO

As NPs apresentaram propriedades físico-químicas alinhadas ao descrito na literatura. A avaliação do potencial antibacteriano das AgNPQT-MRP demonstrou eficácia contra cepas clínicas e de referência de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos. Foram analisadas diferentes formulações, incluindo QT isolada, AgNP, AgNPQT, AgNPQT-MRP e AgNPQT-ME-MRP, com as AgNPQT-MRP destacando-se como as mais eficazes. As CIMs observadas para essas amostras foram inferiores às do MRP puro, indicando uma possível sinergia entre as NPs e o ANT. Esses resultados reforçam que o desenvolvimento das AgNPQT-MRP representa uma abordagem promissora para o tratamento de infecções resistentes causadas por *K. pneumoniae*. Por fim, ressaltamos que a presença do ME não demonstrou relevância significativa na otimização da performance biológica e, portanto, sua inclusão não será mantida para a continuidade do estudo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A RAM permanece como uma das mais graves ameaças à saúde pública global, especialmente em relação a bactérias Gram-negativas críticas, como *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KpRC). Diante disso, este estudo investigou a nanotecnologia como alternativa promissora para enfrentar esse desafio, desenvolvendo e caracterizando, por meio de diversas técnicas, diferentes sistemas nanoestruturados, com o objetivo de elucidar uma alternativa terapêutica inovadora frente à KpRC.

As NPQT apresentaram propriedades físico-químicas adequadas, mas uma baixa EE, o que inviabilizou sua aplicação prática sem aprimoramentos. Em contrapartida, os lipossomas revestidos com QT demonstraram maior capacidade de encapsulação do MRP, embora também com baixa EE, limitando sua eficácia antibacteriana.

Dentre os sistemas avaliados, as AgNPQT-MRP destacaram-se por reunir características físico-químicas promissoras e maior eficácia antibacteriana. Essas NPs apresentaram CIMs inferiores às do MRP puro contra cepas clínicas e de referência de KpRC, sugerindo uma possível sinergia entre seus componentes e o ANT, consolidando-as como uma alternativa viável para combater infecções bacterianas resistentes.

No entanto, o aprimoramento dessa formulação, incluindo estratégias para aumentar a homogeneidade do tamanho das partículas, com posterior investigação de sua estabilidade coloidal, poderá ampliar seu potencial terapêutico. Além disso, estudos adicionais são necessários para validar a segurança e eficácia dessas formulações. Avaliações de toxicidade são cruciais para garantir sua biocompatibilidade e ausência de efeitos citotóxicos. Além disso, a investigação do efeito combinado dos constituintes das NPs, a cinética de morte bacteriana, o potencial antibiofilme e as alterações morfológicas nos microrganismos após exposição às NPs podem oferecer informações detalhadas sobre seus mecanismos de ação e viabilizar testes *in vivo*.

Por fim, ressaltamos que este estudo corroborou a relevância da nanotecnologia como ferramenta estratégica, seja como abordagem complementar ou substitutiva no tratamento de infecções resistentes, consolidando seu papel essencial na mitigação dos impactos da RAM e na ampliação do arsenal terapêutico disponível.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER A. et al. Ultrahigh antibacterial efficacy of meropenem-loaded chitosan nanoparticles in a septic animal model. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p.1041-1050, 2017.
- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5575-5599, 2016.
- ADENIJI O. O. et al. The potential of antibiotics and nanomaterial combinations as therapeutic strategies in the management of multidrug-resistant infections: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 15038, 2022.
- AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug Design Development and Therapy**, v. 10, p. 483-507, 2016.
- ALAVI, S.; HAERI, A.; DADASHZADEH, S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 991–1012, 2017.
- ALI, S.W.; JOSHI, M.; RAJENDRAN, S. Modulation of size, shape and surface charge of chitosan nanoparticles with reference to antimicrobial activity. **Advanced Science Letters**, v. 3, p. 452-460, 2010.
- ALLEND, S. O. et al. The synergic and additive activity of biogenic silver nanoparticle associated with meropenem against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of applied microbiology**, vol. 135, p. 1-13, 2024.
- AMBLER, R. P. The structure of β -Lactamases. **Biological Sciences**, v. 289, p. 321-331, 1980.
- AMIN, M.K.; BOATENG, J.S. Enhancing stability and mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles by surface modification with sodium alginate and polyethylene glycol for potential oral mucosa vaccine delivery. **Drugs**, v.20, p.156, 2022.
- ANDRA, V. V. S.N.L. et al. A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. **BioNanoScience**, v. 12, p. 274-291, 2022.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

- ARCHANA D. et al. Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 73, p. 49-57, 2015.
- ARDEAN C. et al. Factors Influencing the Antibacterial Activity of Chitosan and Chitosan Modified by Functionalization. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.7449, 2021.
- AURILIO, C. et al. Mechanisms of action of carbapenem resistance. **Antibiotics**, v. 11, p. 421, 2022.
- BASU S. **Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) substrates and probes**. 2017. Dissertations (Doctoral) Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Louisiana. US. 2017.
- BEGINES, B. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery: recent developments and future prospects. **Nanomaterials**, v. 10, n. 7, p. 1403, 2020.
- BELGO, H. C. **Adsorções de proteínas em superfícies nanoestruturadas de prata caracterizadas por espectroscopia SERS**. 2022. 93f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.
- BERNAL-CHÁVEZ A.S. et al. Insights into terminal sterilization processes of nanoparticles for biomedical applications. **molecules**, v. 3 p. 2068, 2021.
- BRASIL, M.S.L. **Atividade antimicrobiana da combinação de nanopartículas de prata, quitosana e antibióticos avaliada por ensaios de concentração inibitória mínima e espectroscopia SERS**. 2017. 115f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.
- BRASIL M.S.L. et al. Synergism in the antibacterial action of ternary mixtures involving silver nanoparticles, chitosan and antibiotics. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 2026-2033, 2018.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 298, de 12 de Ago de 2019. Brasília.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase inhibitors: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, p. 25247, 2016.
- BUSH, K. Past and present perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. e01076-18, 2018.

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

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, p.125–132, 1998.

CAMPO-BELEÑO C, et al. Biologically synthesized silver nanoparticles as potent antibacterial effective against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.75, p. 680-688, 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE)**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/index.html>>. Acesso em: 27 out. 2023.

CHICEA, D.; et al. Comparative synthesis of silver nanoparticles: evaluation of chemical reduction procedures, AFM and DLS Size Analysis. **Materials**, v.16, p. 5244, 2023.

CIELECKA-PIONTEK, J. et al. Solid-state stability study of meropenem – solutions based on spectrophotometric analysis. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 98, 2013.

CIRO, Y. et al. Production and characterization of chitosan-polyanion nanoparticles by polyelectrolyte complexation assisted by high-intensity sonication for the modified release of methotrexate. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 13, p.11, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 12th ed.** CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024_a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th ed.** CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024_b.

CONFEDERAT LG. et al. Preparation and antimicrobial activity of chitosan and its derivatives: a concise review. **Molecules**, v.26, p.3694, 2021.

COPPOLA, N.; et al. Epidemiology, mechanisms of resistance and treatment algorithm for infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an expert panel opinion. **Antibiotics**, v. 11, p. 1-28, 2022.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, p. 762-767, 2000.

COSTA, Y. F. G. ***Polygonum hydropiperoides* Michx. (Polygonaceae Juss.): perfil metabolômico e potenciais antibacteriano e antibiofilme *in vitro* frente a espécies de *Salmonella***. 2021. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2021.

CRAIG, W. A. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic. **Clinical infectious diseases**, v. 24, p. S266-S275, 1997.

DARAE, H. et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381–391, 2016.

DELATTRE C. Current opinion on chitosan and its derivatives: biological impact in antimicrobial applications. **Advances Biotechnology & Microbiology**, v. 6, p. 555684, 2017.

DESAI, K.G. Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: an overview of recent advances. **Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, pp. 107–158, 2016.

DOI Y. Treatment options for carbapenem-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, p.S565-S575, 2019.

DRAWZ S. M.; BONOMO R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p.160-201, 2010.

DRULIS-KAWA, Z. et al. A comparison of the *in vitro* antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 11, p. 360-375, 2006.

DUTESCU, I.A.; HILLIER, S.A. Encouraging the development of new antibiotics: are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 415–434, 2021.

ELOY J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345-363, 2014.

ESSA E.E. et al. The antibacterial activity of egyptian wasp chitosan-based nanoparticles against important antibiotic-resistant pathogens. **Molecules**, v. 24, p. 7189, 2022.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries, first update**. Feb 2024. Stockholm.

FAIR RJ, TOR Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FARFOUR E, et al. SARS-CoV-2 Hospital Foch study group. Carbapenemase-producing *Enterobacterales* outbreak: Another dark side of COVID-19. **American Journal of Infection Control**, v. 48, p.1533-1536, 2020.

- FELIPE LO. et al. Quitosana: da Química Básica à Bioengenharia. **Química e Sociedade**. N° 4. São Paulo-SP, BR. Química nova escolar, vol. 39, p. 312-320, 2017.
- FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 87, p. 272-276, 2008.
- FILGUEIRAS, A. L. **Estudo *in vitro* do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- FILGUEIRAS, A. L. Adsorption study of antibiotics on silver nanoparticle surfaces by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 979-985, 2015.
- FILGUEIRAS, A. L. The adsorption of rifampicin on gold or silver surfaces mediated by 2-mercaptoethanol investigated by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 75-80, 2016.
- FLEISCHMANN M. et al. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, p. 163-166, 1974.
- FLORIS, A. et al. Cavitation effect on chitosan nanoparticle size: a possible approach to protect drugs from ultrasonic stress. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 619-625, 2013.
- FOCHAT R.C. et al. Prevalence and molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacterales in patients from a public referral hospital in a non-metropolitan region of Brazil during and post the SARS-CoV-2 pandemic. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, 2024.
- FONTOURA, I. et al. Analysis of capped silver nanoparticles combined with imipenem against different susceptibility profiles of *Klebsiella pneumoniae*. **Antibiotics**, v.12, p.535, 2023.
- FOREST V. et al. Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells: A reductive theory. **Nanotoday**, v.10, p. 677-680, 2015.
- GANEWATTA, M. S.; RAHMAN, Md A.; CHUANBING, T. Emerging antimicrobial research against superbugs: perspectives from a polymer laboratory. **Journal of the South Carolina Academy of Science**, v. 15, p. 1-14, 2017.
- GHOSH S, BORNMAN C, ZAFER MM. Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, p. 555-560, 2021.

GIESSIBL F.J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of Modern Physics**, v.75, p.949–983, 2003.

GIMENEZ-INGALATURRE A. et al. Contribution to optimization and standardization of antibacterial assays with silver nanoparticles: the culture medium and their aggregation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 203, p. 106618, 2022.

GLOBAL AMR R&D HUB; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Incentivising the development of new antibacterial treatments 2023**. 2023. Disponível em: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-gcp-irc/incentivising-development-of-new-antibacterial-treatments-2023---progress-report.pdf?sfvrsn=72e4f738_3>. Acesso em: 15 set. 2024.

GOMES G. A. et al. Liposomal nanovesicles for efficient encapsulation of Staphylococcal Antibiotics. **ACS Omega**, v. 4, p. 10866-10876, 2019.

GUIMARÃES D. et al. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, p. 120571, 2021.

GUISADO-GIL A, INFANTE-DOMÍNGUEZ C, PENALVA G, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on antimicrobial consumption and hospital-acquired candidemia and multidrug-resistant bloodstream infections. **Antibiotics**, v. 9, p.816, 2020.

HAJI S.H. et al. Synergistic antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized by carbapenem-resistant Gram-negative bacilli. **Scientific Reports**, v. 12, p. 15254, 2022.

HAMED, R. B. et al. The enzymes of β -lactam biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 21-107, 2013.

HASANOVIC A. et al. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 148-153, 2010.

HASSO-AGOPSOWICZ M. et al. Identifying WHO global priority endemic pathogens for vaccine research and development (R&D) using multi-criteria decision analysis (MCDA): an objective of the Immunization Agenda 2030. **The Lancet - eBioMedicine**, v. 0, p. 105424, 2024.

HELMLINGER, J. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, p. 18490-18501, 2016.

HELMY YA. et al. Antimicrobial resistance and recent alternatives to antibiotics for the control of bacterial pathogens with an emphasis on foodborne pathogens. **Antibiotics (Basel)**, v. 30, p. 274, 2023.

HETTA H. F. et al. Nanotechnology as a promising approach to combat multidrug resistant bacteria: a comprehensive review and future perspectives. **Biomedicines**, v. 11, p. 413, Jan 2023.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. **Manual de Farmacologia Terapêutica de Goodman & Gilman**. 2^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 2295 p.

HONARY S. et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 67-74, 2011.

HONEYCUTT C. C. et al. Meropenem extraction by ex vivo extracorporeal life support circuits. **The Journal of ExtraCorporeal Technology**, v. 55, p. 159-166, 2023.

HSU J. How COVID-19 is accelerating the threat of antimicrobial resistance. **British Medical Journal**, v. 18, p. 369, 2020.

HUH, A. J., & KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, p. 128–145, 2011.

HUTCHINGS, M.I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: Past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019.

JAMKHANDE, P. G. et al. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 101174, 2019.

JANDA J.M, ABBOTT SL. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: "*Enterobacterales*"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, p. 1-45, 2021.

JEAN, S.-S. et al. Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 823684, 2022.

KALAIVANI R. et al. Synthesis of chitosan mediated silver nanoparticles (Ag NPs) for potential antimicrobial applications. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 2, p. 30-35, 2018.

KANG J. et al. Relative frequency of health care-associated pathogens by infection site at a university hospital from 1980 to 2008. **American Journal of Infection Control**, v. 40, p. 416-420, 2012.

KANGO S. et al. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1232-1261, 2013.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, p. 300-305, 2017.

KHANAL, S. et al. PH-Responsive PLGA nanoparticle for controlled payload delivery of diclofenac sodium. **Journal Of Functional Biomaterials**, v. 7, n. 3, p. 21, 2016.

KIFFER, C. R. V. et al. A 7-year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the Coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, p. S29–S37, 2023.

LANFERINI D. F. C. **Associação de nanopartículas de prata a medicamentos antifúngicos para inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.*** 2022. 75f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2022.

LAXMINARAYAN R. et al. Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. **Lancet**, v. 387, p.168-175, 2016.

LEE N.-Y. et al. Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1153, 2019.

LOK C.N. et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.12, p. 527–534, 2007.

LOZA K. et al. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. **Royal Society of Chemistry**, v. 2, p. 1634-1643, 2014.

MA, Z.: GARRIDO-MAESTU, A.: JEONG, K. C. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro-and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 257-265, 2017.

MA, J. et al. Global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. **Microbiological Research**, v. 266 (127249), p. 1-15, 2023.

MALAWONG, S. et al. Silver Nanoparticles Enhance Antimicrobial Efficacy of Antibiotics and Restore That Efficacy against the Melioidosis Pathogen. **Antibiotics**, v.10, p. 839, 2021.

MANCUSO, G. et al. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, p. 1310, 2021.

MARAVIESKI, S. P. (Organizadora). **Teorias e métodos da biofísica** [recurso eletrônico] /Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. ISBN 978-85-7247-189-3.

- MASSOVA, I.; MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.1-17, 1998.
- MEMAR M.Y. et al. Biocompatibility, cytotoxicity and antibacterial effects of meropenem-loaded mesoporous silica nanoparticles against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 48, p. 1354-1361, 2020.
- MENDEZ, A.S.L., STEPPE, M., SCHAPOVAL, E.E.S. Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 947-954, 2003.
- MILLOUR M. et al. Does the bacterial media culture chemistry affect the stability of nanoparticles in nanotoxicity assays? **Journal of Xenobiotics**, v.5, p. 34-36, 2015.
- MIRDA E., et al. Synthesis of chitosan-silver nanoparticle composite spheres and their antimicrobial activities. **Polymers**, v.13, p. 3990, 2021.
- MOHR J.F., Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. S41–S51, 2008.
- MURRAY C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. **Lancet**, v. 12, p. 629–655, 2022.
- NIRMALA R. et al. Preparation and characterizations of anisotropic chitosan nanofibers via electrospinning. **Macromolecular Research**, v. 19, p. 345-350, 2011.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Infection Diseases**, v. 69, p. S521-S528, 2019.
- NORDMANN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, p. 51-56, 2014.
- NORI P., et al. Bacterial and fungal coinfections in COVID-19 patients hospitalized during the New York City pandemic surge. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 42,p. 84-88, 2021.
- OLIVEIRA J.F.A. et al. Defeating bacterial resistance and preventing mammalian cells toxicity through rational design of antibiotic-functionalized nanoparticles. **Science Reporty**, v.7, p. 1326, 2017.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**. London: HM Government and Wellcometrust, 2016.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. A resistência aos antimicrobianos, fomentada pela pandemia de COVID-19. **Informe de política, Nov 2021**. Disponível em: www.paho.org/pt/juntos-combater-resistencia-antimicrobianos. Acesso em: 05 Out. 2024.

PAHO, Pan American Health Organization. Epidemiological Alert: Emergence and increase of new combinations of carbapenemases in *Enterobacterales* in Latin America and the Caribbean (2021 Oct 22). Washington, DC: **PAHO**; 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-alert-emergenceand-increase-new-combinations-carbapenemases>. Acesso em: 02 out. 2024.

PARMANIK et al. Current treatment strategies against multidrug-resistant bacteria: a review. **Current Microbiology**, v. 79, p. 388, 2022.

PATEL, A. et al. Rapid spread and control of multidrug-resistant gram-negative bacteria in COVID-19 patient care units. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, p. 1234–1237, 2021.

PELGRIFT RY, FRIEDMAN AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p.1803-1815, 2013.

PESESKY M. W. et al. KPC and NDM-1 genes in related *Enterobacteriaceae* strains and plasmids from Pakistan and the United States. **Emerging Infections Diseases**, v.21, p.1034-1037, 2015.

POMPILIO, A. et al. Bioactive compounds: a goldmine for defining new strategies against pathogenic bacterial biofilms? **Critical Reviews in Microbiology**, v. 49, p. 117-149, 2023.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Drug Resistance Updates**, v. 29, p. 30-46, 2016.

PROCOP, G. W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2018.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. *Klebsiella pneumoniae* 90. Disponível em: <https://www.culturecollections.org.uk/nop/product/klebsiella-pneumoniae-90>. Acesso em: 22 out. 2024.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 440-458, 2007.

QUINTERO-QUIROZ C. et al. Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity. **Biomaterials Research**, v. 23, p. 1-15, 2019.

RAI M, YADAV A, GADE A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 76-83, 2009.

RAJIVGANDHI G. et al. Physiochemical characterization and anti-carbapenemase activity of chitosan nanoparticles loaded Aegle marmelos essential oil against *K. pneumoniae* through DNA fragmentation assay. **Surfaces and Interfaces**, v. 23, p.100932, 2021.

RASHKI S. et al. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117108, 2021.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanism of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, p. 482-501, 2018.

RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, M. et al. COVID-19: Clouds over the antimicrobial resistance landscape. **Archives of Medical Research**, v. 52, p. 123–126, 2021.

SAINI R.K. et al. pH dependent reversible aggregation of Chitosan and glycol-Chitosan stabilized silver nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 511, p. 326-330, 2011.

SALAM et al. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. **Healthcare (Basel)**, v. 11, p. 1946, 2023.

SANTOS, E. M. P. et al. Silver nanoparticles–chitosan composites activity against resistant bacteria: tolerance and biofilm inhibition. **Journal of nanoparticle research**, v. 23, p. 196, 2021.

SARWAR, A., KATAS, H. & ZIN, N.M. Antibacterial effects of chitosan–tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. **Journal of Nanoparticle Research**, v.16, p. 2517, 2014.

SATLIN, M. J. et al. Impact of a rapid molecular test for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and ceftazidime-avibactam use on outcomes after bacteremia caused by carbapenem-resistant *Enterobacterales*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, p. 2066-2075, 2022.

SCHALLER, M. et al. Toxicity and antimicrobial activity of a hydrocolloid dressing containing silver particles in an ex vivo model of cutaneous infection. **Skin pharmacology and physiology**, vol. 17, p. 31-36. 2004.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (São Paulo)**, v. 12, p. 282-286, 2014.

SHAABAN, M.I., SHAKER, M.A.; MADY, F.M. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. **Journal of Nanobiotechnology**, v.15, p. 29, 2017.

- SHAHBANDEH, M. et al. Conjugation of imipenem to silver nanoparticles for enhancement of its antibacterial activity against multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biosciences**, v. 46, p. 26, 2021.
- SHANMUGAM A. et al. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885). **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 25-30, 2016.
- SHARMIN, S. et al. Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. **Heliyon**, v.7 (3), p.E06456, 2021.
- SHEHABELDINE A.M., et al. Multifunctional silver nanoparticles based on chitosan: Antibacterial, antibiofilm, antifungal, antioxidant, and wound-healing activities. **Journal of Fungi**, v. 8, p. 612, 2022.
- SMITH, H. Z.; HOLLINGSHEAD, C. M.; KENDALL, B. **Carbapenem-Resistant Enterobacterales**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/>>. Acesso em: 02 nov. 2024.
- SOTIRIOU G. A., PRATSINIS S. E. Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 1, p. 3-10, 2011.
- SOUSA F. et al. Current insights on antifungal therapy: novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. **Pharmaceuticals**, v.15, p.248, 2020.
- SOUZA F. et al. Ceftazidime and usnic acid encapsulated in chitosan-coated liposomes for oral administration against colorectal cancer-inducing *Escherichia coli*. **Pharmaceuticals**, v. 17, p. 802, 2024.
- STRUVE, C. et al. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **American Society for Microbiology**, v. 6, p. e00630, 2015.
- ZIENKIEWICZ-STRZAŁKA, M. et al. Silver nanoparticles on chitosan/silica nanofibers: characterization and antibacterial activity. **International Journal Molecular Sciences**, v.21, p.166, 2019.
- SU Z. et al. Chitosan/silver nanoparticle/graphene oxide nanocomposites with multi-drug release, antimicrobial, and photothermal conversion functions. **Materials**, v.14, p. 2351, 2021.
- SUÁREZ C, GUDIOL F. Antibióticos betalactámicos beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 27, p.116-129, 2009.

TAVARES, GD. et al. *N,N,N*-trimethylchitosan-poly (n-butylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles as a potential oral delivery system for acyclovir. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 196, p. 111336, 2020.

THEURETZBACHER, U.; OUTTERSON, K.; ENGEL, A.; KARLÉN, A. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 275-285, 2020.

TOLENTINO, S. et al. Targeted clindamycin delivery to pilosebaceous units by citosan or hyalurinic acid nanoparticles for improved topical treatment of acne vulgaris. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, p.117295, 2021.

TOMASELLO C. et al. *In vitro* stability evaluation of different pharmaceutical products containing meropenem. **Hospital Pharmacy**, v. 50, p. 296-303, 2015.

TOMPKINS, K.; VAN DUIN, D. Treatment for carbapenem-resistant *Enterobacteriales* infections: recent advances and future directions. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, p. 2053-2068, 2021.

TORRES I.M. et al. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 984-992, 2012.

VAZQUEZ-MUÑOZ R. et al. Beyond the Nanomaterials Approach: Influence of Culture Conditions on the Stability and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles. **ACS Omega**, v. 26, p. 28441-28451, 2020.

VERIATO T.S. et al. Nano-antibiotic based on silver nanoparticles functionalized to the vancomycin-cysteamine complex for treating *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. **Pharmacological Reports**, v.75, p. 951-961, 2023.

VISHWANATH R., NEGI B. Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, p. 100205, 2021.

VIVAS R. et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-8, 2020.

WIJESOORIYA C. et al. Optimization of liposomal encapsulation for ceftazidime for developing a potential eye drop formulation. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 4, p. 73-75, 2013.

WOODFORD, N. et al. *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 carbapenemase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1261-1264, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Policy Guidance on Integrated Antimicrobial stewardship activities**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240025530>>. Acesso em: 17 set. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva: WHO Press, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance**. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 15 set. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial Resistance, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - Global situation**. Jul 2024. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON527>. Acesso em: 12 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022**. Dec 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO report on surveillance of antibiotic consumption**. Geneva: WHO Press, 2019.

YANG, Z. et al. Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: characterizations and evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, p. 508–515, 2015.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

YU B. et al. Microfluidic Methods for Production of Liposomes. **Methods Enzymol**, v. 465, p. 129-141, 2009.

YUSUF, A. et al. Nanoparticles as drug delivery systems: a review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems. **Polymers**, v. 15, p.1596, 2023.

ZACARON, T.M. et al. Advances in chitosan-based nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Polymers**, v. 15, p. 3849, 2023.

ZAHRA, M.-J. et al. Evaluation and study of antimicrobial activity of nanoliposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, p. 975–980, 2017.

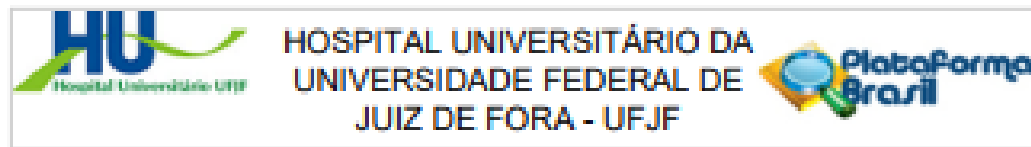
ZANGROSSI, H. J. Mecanismos de ação de drogas antimicrobianas. USP. Disponível em:
https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4139271/mod_resource/content/1/aula1%20quimioter%C3%A1picos-2017.pdf. Acesso em: 29 set. 2024.

ZHANG F. et al. Anti-bacterial activity of chitosan loaded plant essential oil against multi drug resistant *K. pneumoniae*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, p. 3449-3455, 2020.

ZHENG, X. et al. Ceftazidime-assisted synthesis of ultrasmall chitosan nanoparticles for biofilm penetration and eradication of *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, v. 13, p. 13481, 2023.

ZONG C. et al. Surface-enhanced raman spectroscopy for bioanalysis: reliability and challenges. **Chemical Reviews**, v. 118, p. 4946-4980, 2018.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos em linhagens bacterianas isoladas de amostras clínicas.

Pesquisador: Patricia Guedes Garcia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 62059822.2.0000.5133

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA UFJF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.008.128

Apresentação do Projeto:

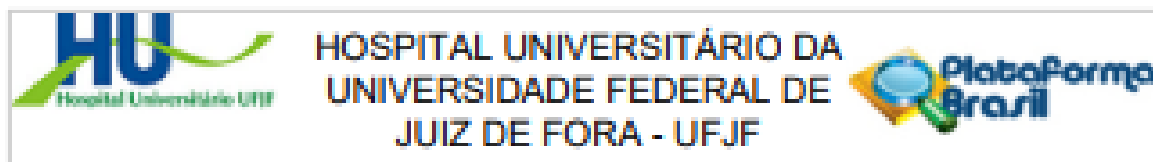
Esse parecer trata-se de uma emenda com a seguinte justificativa elencada no campo "Justificativa da Emenda" que foi retirada do arquivo Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2113190_E1.pdf":

Esta emenda traz as seguintes alterações, conforme apresentados na carta de encaminhamento: 1) Inclusão de pesquisador: Romário Costa Fochat 2) **Inclusão de metodologia: Teste de suscetibilidade de antimicrobianos associados a nanopartículas, nas linhagens bacterianas multidroga resistentes.** 3) Alteração do prazo de vigência do projeto (janeiro de 2019 a dezembro de 2024). 4) Adequação do cronograma. As alterações acima trarão resultados mais robustos para pesquisa, com o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de antibióticos associados a nanopartículas de quitosana, tendo em vista que a escassez de opções terapêuticas para tratar infecções por bactérias MDRL. Além disso, a extensão do prazo proporcionará a melhor execução das metodologias, além da análise mais precisa dos dados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rua Celso Breviglieri, s/n	CEP: 38.036-110
Bairro: Santa Catarina	
UF: MG	Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)4009-5167	E-mail: cep.hu@ufjf.br



Continuação do Formar: 6.008.128

Verificar a prevalência e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies bacterianas previamente isoladas de amostras clínicas de pacientes hospitalizados e ambulatoriais. Bem como realizar a pesquisa de genes de resistência nestas cepas.

Objetivo Secundário:

Analisar o resultado do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos de cepas bacteriana isoladas de amostras clínicas. Verificar os mecanismos de resistência bacteriana das cepas multiresistentes. Associar os isolados bacterianos aos espécimes clínicos.

Avaliar a presença de múltiplos mecanismos de resistência nas bactérias isoladas

Avaliar a prevalência de espécies bacterianas multiresistentes nos diversos setores do hospital. Avaliar a prevalência de espécies bacterianas multiresistentes em amostras clínicas de pacientes ambulatoriais.

Avaliar fatores epidemiológicos e de risco para infecções por bactérias multiresistentes produtoras de carbapenemases. Avaliar a presença de múltiplos genes de resistência. Testar nas linhagens bacterianas multiresistentes antimicrobianos associados ou não a nanopartículas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Tendo em vista que, toda pesquisa com seres humanos de forma direta ou indireta envolve riscos, uma vez que este trabalho será com coleta em bases de dados, análises de cepas bacterianas previamente identificadas e armazenadas no setor de microbiologia do HU-UFJF e em prontuários, não havendo, portanto, contato com os pacientes, nem com as amostras clínicas. Considera-se o risco mínimo. Para que não ocorra exposição do nome do paciente ou dados referentes ao mesmo, que torne possível sua identificação, as amostras serão codificadas por números nas planilhas de Excel, mantendo-se o anonimato e sigilo absoluto dos dados que possam levar a reconhecimento do paciente.

Benefícios:

Tendo em vista o aumento dos isolados de bactérias multiresistentes especialmente em amostras clínicas de pacientes hospitalizados, torna-se importante um estudo da prevalência destes microrganismos, bem como a caracterização dos genes de resistência envolvidos, com a finalidade

Endereço: Rua Celso Breviglieri, s/n

Bairro: Santa Catarina

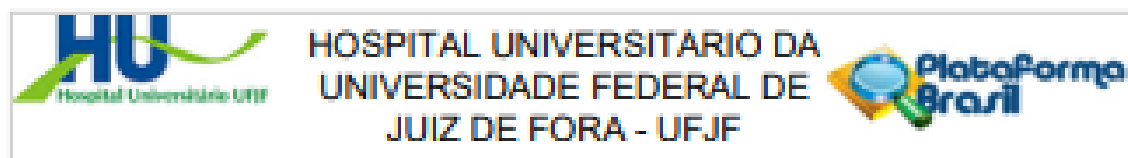
CEP: 36.038-110

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5167

E-mail: cep.hu@ufjf.br



Continuação do Parecer: 6.028.128

de compreender a epidemiologia das linhagens circulantes no ambiente hospitalar. Além disso, a correta identificação do tipo de carbapenemase produzida pelas bactérias, através de métodos moleculares, trará benefícios não apenas epidemiológicos, mas também para um melhor stewardship dos antimicrobianos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse parecer trata-se de uma emenda com a seguinte justificativa elencada no campo "Justificativa da Emenda" que foi retirada do arquivo Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2113190_E1.pdf":

Esta emenda traz as seguintes alterações, conforme apresentados na carta de encaminhamento: 1) Inclusão de pesquisador: Romário Costa Fochat 2) Inclusão de metodologia: Teste de suscetibilidade de antimicrobianos associados a nanopartículas, nas linhagens bacterianas multidroga resistentes. 3) Alteração do prazo de vigência do projeto (janeiro de 2019 a dezembro de 2024). 4) Adequação do cronograma. As alterações acima trarão resultados mais robustos para pesquisa, com o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de antibióticos associados a nanopartículas de quitosana, tendo em vista que a escassez de opções terapêuticas para tratar infecções por bactérias MDR. Além disso, a extensão do prazo proporcionará a melhor execução das metodologias, além da análise mais precisa dos dados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos neste protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO desta emenda proposta no protocolo de pesquisa.

Endereço: Rua Catulo Breviglieri, s/n

Bairro: Santa Catarina

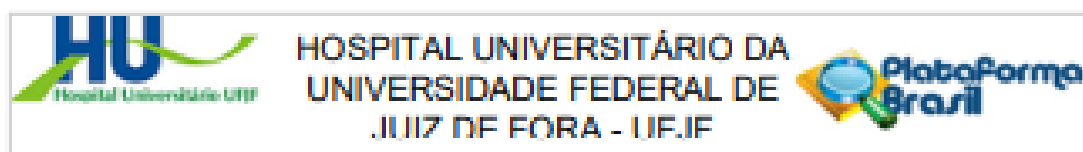
CEP: 36.036-110

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5167

E-mail: cep.hu@ufjf.br



Continuação do Parecer: 6.009.129

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_211319_0_E1.pdf	29/03/2023 16:24:08		Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_emenda.pdf	29/03/2023 16:17:39	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	Lattes_Romario.pdf	29/03/2023 16:17:22	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	carta_encaminhamento_emenda.pdf	29/03/2023 16:16:19	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisaCEPHUUFJF.pdf	22/08/2022 21:18:32	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	LattesMariaLourdesJunqueira.pdf	22/08/2022 21:16:41	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	LattesLauraLavoratoSoldati.pdf	22/08/2022 18:24:03	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	LattesMarceloSilvaSilveiro.pdf	22/08/2022 18:23:44	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	LattesClavadosSantosPereira.pdf	22/08/2022 18:23:12	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	LattesPatríciaGuedesGarcia.pdf	22/08/2022 18:22:37	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Declaração de concordância	DCIE_FF_UFJF.pdf	22/08/2022 18:13:58	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	TermoConfidencialidadeSigilo.pdf	22/08/2022 18:13:10	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Orçamento	planilhaOrcamentaria.pdf	22/08/2022 18:12:16	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCEmodeloHU.pdf	22/08/2022 18:11:53	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	CartaEncaminhamento.pdf	22/08/2022 18:11:24	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Outros	cartaAnuencia.pdf	22/08/2022 18:10:41	Patrícia Guedes Garcia	Aceito
Folha de Rosto	folhaRostoAssinada.pdf	22/08/2022 17:51:52	Patrícia Guedes Garcia	Aceito

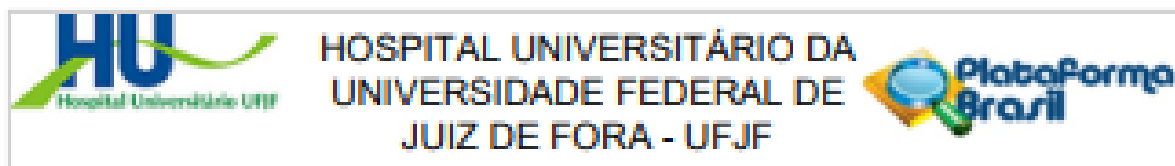
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Catulo Breviglieri, s/n
 Bairro: Santa Catarina CEP: 36.036-110
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA
 Telefone: (32)4009-5167 E-mail: cep.hu@ufjf.br



Continuação do Parecer: 6.008.126

JUIZ DE FORA, 17 de Abril de 2023

Assinado por:
Valquíria Pereira de Medeiros
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Catulo Breviglieri, s/n

Bairro: Santa Catarina

CEP: 36.036-110

UF: MG

Município: JUIZ DE FORA

Telefone: (32)4009-5167

E-mail: cep.hu@ufjf.br