

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mariana Silva Lopes Neves

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADAS OU NÃO A QUITOSANA E ÀS DROGAS
ANTIMICROBIANAS**

Juiz de Fora
2013

MARIANA SILVA LOPES NEVES

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADAS OU NÃO A QUITOSANA E ÀS DROGAS
ANTIMICROBIANAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Área: Genética e Biotecnologia, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia

ORIENTAÇÃO

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz (Orientador)
Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva (Co-orientadora)

Juiz de Fora
2013

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

NEVES, Mariana Silva Lopes .

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ASSOCIADAS OU NÃO A QUITOSANA E ÀS DROGAS ANTIMICROBIANAS / Mariana Silva Lopes NEVES. -- 2013.

77 f.

Orientador: Cláudio Galuppo DINIZ

Coorientadora: Vânia Lúcia da SILVA

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Resistência bacteriana. 2. nanopartículas de prata. 3. quitosana. 4. antimicrobianos. I. DINIZ, Cláudio Galuppo , orient. II. SILVA, Vânia Lúcia da , coorient. III. Título.

DESENVOLVIMENTO

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

COLABORAÇÃO

Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Anna
Aline Luciano Filgueiras (Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Química)
Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM)
Departamento de Química/ Universidade Federal de Juiz de Fora

APOIO FINANCEIRO:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

MARIANA SILVA LOPES NEVES

Potencial antibacteriano de nanopartículas de prata associadas ou não a quitosana e às drogas antimicrobianas

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

25 de abril de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade de Federal de Juiz Fora

Profa. Dra. Kênia Valéria dos Santos
Universidade de Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo
Universidade de Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, MG/2013

Dedico esse trabalho a Deus, pela perseverança em me levantar todas as vezes em que caí e por ter iluminado cada momento durante essa jornada.

E aos meus pais, Vera e Sebastião, por acreditarem mais em mim do que eu mesma e por serem meu porto-seguro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar uma nova chance de tentar todos os dias apesar de qualquer fracasso.

Agradeço aos meus orientadores, Cláudio e Vânia, pela paciência, perseverança de todos esses anos de orientação e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, pelo companheirismo, dedicação e descontração, mesmo quando o trabalho era árduo. Agradeço em especial à Marina Barros e Priscila Fernandes, pela ajuda durante os experimentos, pela amizade e pelos momentos de reflexão pós-experimento.

A Michele e ao Job, pessoas com as quais aprendi muito e que serão sempre especiais para mim.

As amigas Daniele Knupp e Renata, pela amizade e por compartilharem das mesmas aflições e angústias do que eu.

Aos técnicos Sidney Leandro e Angélica, que tanto me ensinaram, e aos novos, Felipe e Thais pelo apoio e nova amizade.

Às minhas famílias queridas Lopes, Silva e Gonçalves, por estarem presentes sempre, sendo solidários às minhas aflições, pelas orações e pela torcida pelo meu sucesso. Agradeço especialmente às minhas avós Zélia e Maria José e aos meus avôs Sebastião e Alberto, aonde quer que eles estejam.

As “cajazeiras”, amigas de longa data, por estarmos lado a lado nessa jornada, apoiando umas às outras, estando sempre por perto.

Aos amigos que torceram, me incentivaram e que acreditaram em mim, meu muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Anna e a colega Aline Luciano Filgueiras, pelas infinitas sínteses, enfim pela colaboração.

À equipe do Laboratório de Genética, em especial aos professores Marcelo e Lyderson, pelo apoio técnico durante a conclusão dos meus experimentos.

Aos colegas e professores da pós-graduação pelo aprendizado.

RESUMO

A prata é conhecida por sua atividade antibacteriana e tem se mostrado eficiente como alternativa no contexto da resistência bacteriana a drogas, sobretudo na forma de nanopartículas (AgNPs). Nossos objetivos foram a avaliação da susceptibilidade de bactérias representativas contra AgNPs e pesquisa de efeito sinérgico ou antagônico quando associadas a quitosana (QIT) e antimicrobianos de uso terapêutico humano. Foram utilizadas oito linhagens bacterianas de referência, representativas de: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis*. O perfil de susceptibilidade foi determinado através do método de microdiluição em caldo, de acordo com as recomendações do CLSI. A concentração inibitória mínima (CIM₉₀) das AgNPs para as amostras testadas foi de 64 µg/mL, enquanto que para a combinação AgNPs-QIT foi de 16 µg/mL. Considerando-se atividade antimicrobiana somente da QIT, a CIM₉₀ foi de 16 µg/mL. Entre os antimicrobianos testados (meropenem, amicacina, gentamicina, levofloxacina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetropim, tetraciclina, e oxacilina e vancomicina, estes apenas para Gram positivos), apesar de a CIM para cada linhagem bacteriana estar de acordo com os valores determinados pelo CLSI observou-se diminuição significativa para todas as drogas testadas quando combinadas com AgNPs-QIT. De modo geral, para todas as espécies bacterianas avaliadas, a associação de AgNPs com QIT ou drogas antimicrobianas apresentaram grande potencial inibitório que pode estar relacionado a estabilidade das AgNPs associadas ao polímero ou a interação positiva das nanopartículas com os antimicrobianos. O ensaio de *Checkerboard* foi realizado para estabelecer os efeitos sinérgicos ou antagônicos em cada combinação. A possibilidade da interação das AgNPs e da QIT com antimicrobianos já existentes é altamente relevante e reforça as recomendações da literatura acerca da reformulação de uso de antimicrobianos tradicionais, além da pesquisa de novas drogas e estratégias para sobrepujar o crescente fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana, nanopartículas de prata, quitosana, antimicrobianos.

ABSTRACT

Silver is known for its antibacterial activity and has been shown to be effective as a potential alternative in the context of bacterial resistance to drugs, particularly in the form of nanoparticles (AgNPs). Our objectives were to evaluate the susceptibility of bacteria against AgNPs and representative survey of synergistic or antagonistic when combined with chitosan (QIT) and antimicrobials for human therapeutic use. A total of eight reference strains were evaluated of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. The susceptibility patterns were determined by broth microdilution method, according to the CLSI guidelines. The minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of AgNPS to the samples tested was 64µg/mL, while for the combination AgNPs-QIT was 16µg/mL. Considering only antimicrobial activity of QIT, the MIC₉₀ was 16 mg / mL. Among the antimicrobials (meropenem, amikacin, gentamicin, levofloxacin, rifampicin, sulfamethoxazole- trimethoprim, tetracycline, and vancomycin and oxacillin, these only to Gram positive), while the MIC for each bacterial strain is in accordance to the reference CLSI, significant decrease was observed for all tested drugs when combined with AgNPs-QIT. In general, association of AgNPs with QIT or with antimicrobial drugs showed higher inhibitory potential, which may be related to the stability of the polymer associated AgNPs or positive interaction of nanoparticles with antibiotics. The *Checkerboard* assay was then performed to establish antagonistic or synergistic effects in each combination. The possibility of interaction of AgNPs and QIT with existing antimicrobials is highly relevant and reinforces the recommendations of the literature on the reformulation of traditional antimicrobial use, as well as research into new drugs and strategies to overcome the growing phenomenon of bacterial resistance to antimicrobials.

KEYWORDS: Antibacterial resistance, silver nanoparticles, chitosan, antimicrobials.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados.....	25
Tabela 1B. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados.....	25
Tabela 2. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias aos compostos químicos testados.....	27
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os grupos bacterianos frente aos compostos químicos testados e a quantidade de substância necessária para inibir 50 e 90% das linhagens bacterianas testadas.....	27
Tabela 4A. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata na concentração sub-inibitória (32µg/ml).....	29
Tabela 4B. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata na concentração sub-inibitória (32 µg/ml)	29
Tabela 5A. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com quitosana na concentração sub-inibitória (8 µg/ml)	30
Tabela 5B. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com quitosana na concentração sub-inibitória (8 µg/ml).....	30
Tabela 6A. Perfil de susceptibilidade de linhagens representativas do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata e quitosana (8 µg/ml).....	31
Tabela 6B. Perfil de susceptibilidade de linhagens representativas do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata e quitosana (8 µg/ml).....	31
Tabela 7A. CFI _{index} para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.....	33

Tabela 7B. CFI _{index} . para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.....	33
Tabela 8A. CFI _{index} . para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-QIT e interpretação dos valores encontrados.....	34
Tabela 8B. CFI _{index} . para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-QIT e interpretação dos valores encontrados.....	34
Tabela 9A. CFI _{index} . para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-QIT-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.....	36
Tabela 9B. CFI _{index} . para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-QIT-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag – Prata

Ag⁺ - Prata iônica

AgNO₃ – Nitrato de Prata

AgNPs – “Silver nanoparticles”- Nanopartículas de Prata

AgNPs-QIT – “Silver nanoparticles and chitosan” – Nanopartículas de Prata e Quitosana

AMI – Amicacina

ATBs – Antimicrobianos

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – “Brain Heart Infusion” – Infusão de cérebro e coração (ágar)

CFI - Concentração Inibitória Fracionada

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMH – Caldo Mueller-Hinton

CSI – Concentração Subinibitória Mínima

DNA – “deoxyribonucleic acid” – ácido desoxirribonucléico

DHFR - diidrofolato redutase

EGMs – Elementos Genéticos Móveis

GD – Grau de desacetilação

GEN – Gentamicina

HAc – Ácido acético glacial

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICE – Instituto de Ciências Exatas

IPAs – Ilhas de Patogenicidade

LBa – Luria-Bertani agar

LBc – Luria-Bertani caldo

LEV – Levofloxacina

LPS - Lipopolissacarídeo

MER – Meropenem

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

NEEM– Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular – UFJF

NPs- nanopartículas

OXA- Oxacilina

PABA – Ácido paraaminobenzóico

PLPs – Proteínas de ligação á penicilina

QIT- Quitosana

RIF- Rifampicina

RMD – Resistentes á múltiplas drogas (linhagens)

RNA – Ácido Ribonucléico

SXT – Sulfametoxazol-trimetropim

TET – Tetraciclina

TTC – “2,3,5-trifenil-tetrazolium chloride” - Cloreto de 2,3, 5-trifenil-tetrazolium

UFC – Unidades formadoras de colônias

UFJF– Universidade Federal de Juiz de Fora

VAN – Vancomicina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	03
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	05
2.1 Interação entre bactérias, seres humanos e outros animais.....	05
2.2 Antimicrobianos e a resistência bacteriana	07
2.3 Produção de novos antimicrobianos e novas abordagens terapêuticas.....	09
2.4 Considerações sobre a nanotecnologia.....	11
2.5 Nanopartículas de prata (AgNPs) e quitosana (QIT).....	13
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivos gerais.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Amostras bacterianas.....	19
4.2 Determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.(ATB).....	19
4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade ao nitrato de prata (AgNO ₃) nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e associação quitosana e nanopartículas (QIT-AgNPs).....	21
4.3.1 Obtenção de nanopartículas de prata (AgNPs) e da associação quitosana- nanopartículas de prata (QIT-AgNPs)	21
4.3.2 Ensaios biológicos de susceptibilidade bacteriana.....	22
4.4 Determinação do perfil de susceptibilidade as nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e suas associações com drogas antimicrobianas (ATBs-QIT e ATB-QIT-AgNPs).....	22
4.5 <i>Checkerboard</i>	23
5 RESULTADOS.....	25
5.1. Avaliação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	25
5.2 Avaliação dos perfis de susceptibilidade a AgNO ₃ , AgNPs, QIT e QIT-AgNPs.....	26

5.3 Avaliação dos perfis de susceptibilidade das combinações entre AgNPs, QIT e QIT-AgNPs com antimicrobianos (QIT-AgNPs-ATB).....	28
5.4 <i>Checkerboard</i>	32
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
8 CONCLUSÕES.....	49
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Bactérias patogênicas continuam sendo causa de morbidade e mortalidade até os dias atuais. Isso se deve, principalmente, devido a limitações no diagnóstico microbiológico e a capacidade microbiana em se adaptar aos mais diversos nichos, além da utilização indevida de agentes antimicrobianos desde o seu advento.

Essa capacidade com a qual as bactérias conseguem se adaptar a vários nichos, refletem as modificações frequentes em seu genoma, com vistas a permitir a sobrevivência a condições adversas do meio, possibilitando a colonização de novos ambientes. Esta habilidade vem garantindo às bactérias sua persistência no planeta e o desenvolvimento de novos mecanismos moleculares que contribuem para a resistência destes microrganismos aos agentes antimicrobianos.

O uso indevido destes compostos por décadas culminou com a evolução dos patógenos bacterianos pré-existentes e com o surgimento de novas linhagens bacterianas, que se tornaram resistentes aos agentes comumente utilizados na quimioterapia antimicrobiana. Em paralelo à evolução dos patógenos, a pesquisa por novos agentes não vem sendo suficientemente rápida e eficaz a ponto de desacelerar o fenômeno da resistência as drogas.

Assim, o tratamento das doenças infecciosas torna-se mais difícil, devido à restrição de drogas de uso terapêutico, ineficiência dos tratamentos, e os desdobramentos da resistência bacteriana em relação à interação bactéria-hospedeiro que envolvem interferência no diagnóstico microbiológico e eventual aumento da virulência microbiana.

Além disso, linhagens bacterianas resistentes a um só antimicrobiano envolvidas na etiologia de doenças infecciosas vêm sendo substituídas, rapidamente, por linhagens resistentes a múltiplas drogas, fato relacionado à facilidade com a qual as bactérias são capazes de disseminar e/ou adquirir novas informações genéticas relativas à resistência através de eventos relacionados à recombinação genética.

Surge, então, a necessidade de novas estratégias terapêuticas como introdução de novos análogos estruturais de drogas já existentes, introdução de novas moléculas com eficácia comprovada, novas abordagens de uso de drogas

existentes, ou ainda, proposições de associação de substâncias resultando em maior eficácia antimicrobiana. Considerando-se estas últimas abordagens, a prata vem sendo proposta como substância potencial como alternativa terapêutica, devido ao seu amplo espectro de ação e sua reconhecida atividade antimicrobiana, desde a antiguidade. Além disso, o domínio das tecnologias de manipulação de materiais na escala nanométrica com as mais variadas finalidades tem motivado, atualmente, o estudo de propriedades antimicrobianas de nanopartículas de prata como agente terapêutico, associadas ou não a outras substâncias.

Nanopartículas metálicas associadas a quitosana, polissacarídeo derivado da quitina, têm se mostrado promissoras quanto ao potencial antimicrobiano, considerando-se espectro de ação abrangente contra bactérias e fungos, em estudos *in vitro*. A quitosana possui propriedades biológicas já comprovadas que justificam a sua ampla utilização em aplicações farmacêuticas.

Do exposto, considerando a busca por novas estratégias de uso de agentes antimicrobianos já instituídos na terapêutica, frente ao fenômeno da resistência microbiana às drogas, e as propriedades antibacterianas potencialmente atribuídas as nanopartículas metálicas e a quitosana, este estudo tem como proposta contribuir com conhecimento científico sobre o uso de nanopartículas de prata e suas associações com quitosana e drogas comumente utilizadas no tratamento de doenças infecciosas humanas, com a finalidade de proposição de novas abordagens que possam remediar o fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Interação entre bactérias, seres humanos e outros animais

Os microrganismos encontrados nos diversos sítios anatômicos do corpo humano e de outros animais formam complexas comunidades microbianas, coletivamente chamadas de microbiota residente (MULDER et al., 2009). Estima-se que o corpo humano abrigue pelo menos 100 trilhões de microrganismos, o que corresponde a 10 vezes o número de células humanas, e que os mesmos, sejam capazes de codificar 100 vezes mais genes do que o genoma humano (HOOPER et al., 2002 ;QIN et al., 2010) .

A importância da microbiota residente se deve principalmente á funções como a degradação de componentes da dieta do hospedeiro, fornecimento de nutrientes provenientes do metabolismo microbiano, proteção contra patógenos e modulação do sistema imunológico (HOOPER et al., 2002; LEEBER et al., 2010). Algumas funções recentemente descobertas incluem a influência da microbiota residente em processos complexos como o metabolismo de lipídios do hospedeiro, predisposição a obesidade, homeostase, inflamação, reparo e angiogênese (BÄCKHED et al., 2004; LEY et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2006; KELLY et al., 2007; DURBAN et al., 2012).

Cada sítio anatômico representa um nicho ecológico, onde existem comunidades microbianas diversas que estabelecem relações ecológicas particulares. Dentre os microrganismos, as bactérias são aquelas que apresentam maior capacidade metabólica e diversidade em conteúdo genômico, o que as possibilita habitar nichos ecológicos distintos, justificando sua ubiquidade (TOFT & ANDERSSON, 2010).

O sítio anatômico de maior densidade populacional de microrganismos é o trato gastrointestinal, onde a microbiota tem influência direta na fisiologia e nutrição humanas, sendo fundamental para a manutenção da vida (LEY et al., 2006; QIN et al., 2010).

A interação bactéria-hospedeiro depende da capacidade de expressão e secreção de uma ampla variedade de proteínas, as quais apresentam grande diversidade mesmo entre espécies correlatas, devido á recombinação de genes

duplicados entre genomas. Os mecanismos que possibilitam a interação com os hospedeiros incluem sistemas complexos destas proteínas, podendo elas serem injetoras de substâncias nas células do hospedeiro ou excretoras de exotoxinas no meio extracelular (TOFT & ANDERSSON, 2010).

Os genes que codificam estes sistemas de secreção, sendo fundamentais para a adaptação ao hospedeiro, tendem a estarem localizados em ilhas genômicas ou próximos a elementos móveis, tais como plasmídeos e bacteriófagos (DOBRINDT et al., 2004; TOFT & ANDERSSON, 2010; BOYD, 2012). Os bacteriófagos são uma das mais efetivas formas de transmissão de DNA exógeno entre espécies bacterianas e tem um grande potencial para diversificação genômica e criação de sistemas de interação com o hospedeiro (DALE & MORAN; 2006; TOFT & ANDERSSON, 2010).

A facilidade de expansão dos elementos genéticos móveis (EGMs) tem papel crucial na aquisição de genes necessários á sobrevivência de um microrganismo em um novo hospedeiro, podendo explicar porque bactérias naturalmente adaptadas a determinados reservatórios podem se configurar como patógenos oportunistas em outros nichos (BOYD, 2012).

Uma vez que a bactéria tenha adquirido componentes necessários para a invasão de superfície de um hospedeiro mamífero, a infecção pode disseminar-se a uma nova espécie hospedeira, alterando o equilíbrio da microbiota residente, podendo levar tanto a uma infecção crônica quanto a uma infecção aguda e altamente virulenta (TOFT & ANDERSSON, 2010).

Além de genes essenciais a colonização de novos hospedeiros, os EGMs podem estar relacionados a genes de virulência, principalmente encontrados em ilhas de patogenicidade (IPAs), associados à plasmídeos ou integrados ao cromossomo bacteriano, tendo função fundamental no rearranjo de genomas bacterianos de patógenos e em sua patogênese (TOFT & ANDERSSON, 2010; BOYD, 2012).

2.2 Antimicrobianos e a resistência bacteriana

Um aspecto importante da biologia bacteriana não diretamente ligado à produção de doenças de natureza infecciosa, mas ligado à sua persistência, é a crescente resistência a drogas. Este crescente fenômeno, tido com um dos grandes desafios do século XXI para ciência e para a medicina (sua contenção), observado neste e em outros grupos microbianos apresenta algumas conseqüências já estabelecidas para a relação bactéria-hospedeiro (ASM 2009).

Por isso, bactérias patogênicas continuam sendo motivo de preocupação entre pesquisadores e a sociedade. Com o advento dos antimicrobianos, que ocorreu a partir da descoberta da penicilina em 1928 e mais tarde, com a produção destes em escala industrial, pensou-se que as barreiras que envolviam o tratamento de doenças infecciosas bacterianas haviam sido transpostas (HOUNDT & OCHMAN, 2000; NIKAIDO, 2009).

À medida que as drogas antimicrobianas são introduzidas no ambiente, os microrganismos respondem, tornando-se resistentes. Em regra, os mecanismos de resistência adquiridos resultam de alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações no padrão genético normal ou regulação da expressão de algumas habilidades já presentes no seu genoma (O'BRIEN, 2002; ASM, 2009). Várias evidências mostram que as drogas antimicrobianas podem interferir com a expressão de determinantes de virulência microbianos (DINIZ et al., 2003; DINIZ et al., 2004; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Desta forma, é aceito que o uso indevido e indiscriminado destas substâncias na medicina humana, animal ou na agricultura, ou ainda a carga de xenobióticos lançados no meio ambiente, além da falta de condições de higiene e saneamento, são fatores que contribuem para a ocorrência de pressão seletiva, o que suscita a persistência, disseminação e/ou desenvolvimento de mecanismos que permitam a sobrevivência de microrganismos resistentes (ASM, 2009; ALLEN et al., 2010).

O fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos não está associado somente à evolução de patógenos já conhecidos, mas também com a emergência de novos patógenos (JONES et al., 2008; JACKSON et al., 2011). Entre os fatores que contribuem para o fenômeno, citam-se a capacidade de adaptação e colonização de novos nichos, bem como mudanças na interação bactéria-hospedeiro, e alterações genéticas através de mecanismos como mutação,

recombinação, duplicação gênica e transferência horizontal (LIVERMORE et al., 2003; MIDLIN et al., 2006; ASM, 2009; JACKSON et al., 2011).

A evolução bacteriana do ponto de vista clínico pode se dar de diversas formas, o que inclui o surgimento de patógenos oportunistas, que em sua maioria, são resistentes a muitas classes de drogas antimicrobianas; a emergência de novos mecanismos de resistência adquirida; a ocorrência de mutações em genes localizados no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos; e a disseminação de genes de resistência anteriormente observados em determinadas espécies, que passam a ser observado em outras (COUVARLIN, 1994; ALLEN et al., 2010).

A origem dos genes de resistência parece ter acontecido a partir das linhagens produtoras de antibióticos, como os fungos actinomicetos, tendo mais tarde, sido associadas a elementos genéticos móveis (EGMs), tais como plasmídeos, transposons e integrons (MIDLIN et al., 2006). Desde o advento das substâncias antibacterianas, os plasmídeos se tornaram a forma de transferência ideal para a incorporação e disseminação dos genes de resistência, uma vez que dentro destes, os genes são freqüentemente carregados por transposons ou integrons (LIVERMORE et al., 2003).

Sob condições de estresse, tais como a exposição a antimicrobianos, os genes de resistência foram rapidamente disseminados, inicialmente entre bactérias Gram-positivas e posteriormente, através da transferência horizontal, para as bactérias Gram-negativas (MIDLIN et al, 2006). Segundo Hound e Ochman (2000), nas últimas décadas, mesmo bactérias que não sofreram exposição direta ou regular a antimicrobianos, apresentaram alterações em resposta a aumentos na aplicação de antibióticos. Baixas concentrações de droga são suficientes para exercer pressão seletiva e estimular a resposta bacteriana, podendo resultar em mobilização e transferência de genes, chegando a assegurar que uma comunidade microbiana inteira se torne protegida da ação antimicrobiana (JETERS et al., 2009; SCHIMIEDER & EDWARDS, 2012).

À medida que ocorre a adaptação destes patógenos à pressão seletiva exercida por diferentes classes de antimicrobianos, o tratamento de infecções torna-se mais difícil, visto que o número de antimicrobianos se torna restrito, enquanto as espécies bacterianas desenvolvem mecanismos para tornarem-se resistentes á uma gama diversa destas substâncias (MIDLIN et al., 2006; ALLEN et al., 2010).

Segundo Midlin et al. (2006), apenas nos primeiros 10 a 15 anos de uso extensivo de antimicrobianos, as linhagens bacterianas resistentes à somente um antibiótico, foram substituídas por outras, resistentes a um grande número destes. A frequência de ocorrência de cassetes gênicos relacionados à resistência a muitos antimicrobianos dentro de integrons e o tempo de introdução dos antimicrobianos na prática médica foram associados ao aumento da incidência destes microrganismos (ALANIS, 2005).

2.3 Produção de novos antimicrobianos e novas abordagens terapêuticas

Desde a introdução da benzilpenicilina na década de 1940 e a partir de então, sua utilização de forma empírica na terapia contra diversos patógenos, pouco se preocupava com o desenvolvimento de mecanismos de resistência (THEURETZBACHER, 2009).

Todavia, a descoberta de agentes antimicrobianos e a modificação daqueles pré-existentes, não foram capazes de conter a evolução tão rápida e inevitável destes patógenos, fenômeno este evidenciado pelo rápido surgimento de linhagens de *Staphylococcus aureus* produtoras de β -lactamase, enzima inibidora de antimicrobianos da classe das penicilinas (SPELLBERG, 2009; THEURETZBACHER, 2009; IOM, 2010).

O crescimento acelerado e a expansão global da resistência bacteriana tornaram necessária a emergência de novos agentes de combate (SPELLBERG, 2009; IOM, 2010). Um dos principais fatores associados a essa expansão foi a utilização indevida de antimicrobianos, a qual está correlacionada, ao surgimento de linhagens resistentes (GWYNN et al., 2010).

Impulsionada pela alta lucratividade e retorno á curto prazo, a indústria farmacêutica concentrou sua produção nas drogas *blockbuster* (ou de grande consumo global) – como aquelas utilizadas no tratamento de doenças crônicas como o câncer ou disfunções sexuais, por exemplo – ao invés de se preocupar com o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, utilizadas por curto prazo, no tratamento de doenças agudas. Esta estratégia estava relacionava apenas aos interesses econômicos, o que ia de encontro com os objetivos sociais e terapêuticos dos antimicrobianos (THEURETZBACHER, 2009).

As vantagens econômicas proporcionadas pelas drogas *blockbuster* aliadas ao alto custo produtivo, e principalmente, ao pouco retorno econômico dos antimicrobianos, em comparação a outras drogas, levaram à falta de investimento no desenvolvimento de novos agentes na década de 1990 (SPELLBERG, 2009; THEURETZBACHER, 2009).

A produção de novos antimicrobianos torna-se dispendiosa, devido ao longo período envolvendo as etapas de fabricação e testes pré-clínicos e clínicos, até sua inserção no mercado. A busca por novos agentes tem como objetivo sobrepor os mecanismos de resistência bacterianos, e por isso, se baseia na procura por novas rotas de administração, novos alvos ou mecanismos de ação em direção ao mesmo alvo, o que acaba limitando a produção efetiva de agentes em potencial (GWYNN et al.,2010).

Associadas a estes fatores, a disponibilidade de medicamentos genéricos e a utilização de novas substâncias somente no tratamento de quadros infecciosos de alta patogenicidade, contribuíram ainda mais para a redução do retorno financeiro dos antimicrobianos (GWYNN et al.,2010).

Além disso, a utilização de antimicrobianos de amplo espectro em larga escala, tornou ainda mais necessária a pesquisa e o desenvolvimento de novas substâncias, haja vista a emergência de linhagens resistentes a múltiplas drogas (RMD), assim como as linhagens de Gram negativos RMD, as quais são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (GWYNN et al.,2010; IOM,2010).

O declínio da produção de novos agentes foi agravado pela perda da eficácia dos antimicrobianos existentes não acompanhada pela substituição dos mesmos. Em um estudo realizado no ano de 2002, Shlaes e Moellering, alertaram a comunidade médica acerca deste declínio, quando foram capazes de concluir que o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos era menor do que àquele das drogas relacionadas a hiperatividade e disfunção erétil (SPELLBERG, 2009).

Com o quadro atual da crescente resistência bacteriana, no entanto, tornou-se necessária a retomada da produção de novos agentes antimicrobianos, ou discussão sobre novas estratégias de utilização das drogas disponíveis. Essa discussão tem motivado e incentivado a pesquisa científica sobre o tema, a fim de se diminuir o custo de produção dentro das grandes empresas farmacêuticas. Além disso, tem sido discutida proposições de novas formas de utilização das drogas já

conhecidas e estabelecidas, para as quais os microrganismos têm se mostrado resistentes (SPELLBERG, 2009).

Considerando-se, então, a evolução dos patógenos bacterianos associados às doenças infecciosas atuais, presume-se a necessidade do desenvolvimento de novos agentes para o controle de bactérias multirresistentes, ou a proposição de novas maneiras de utilização do arsenal antimicrobiano conhecido, objetivando-se a sobreposição da limitação existente na prescrição de antibióticos eficazes no tratamento clínico. Assim, se faz necessária a aplicação dos conhecimentos adquiridos acerca da evolução dos mecanismos de resistência, para a utilização ferramentas tecnológicas com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (RAI et al., 2009; SPELLBERG, 2009; IOM, 2010).

Neste contexto, a utilização da prata (Ag) e mais especificamente, das nanopartículas, se inserem a partir do investimento recente em métodos de incorporação da prata em diversos dispositivos, como em curativos para queimaduras e cateteres, além do crescente interesse da comunidade científica em explorar moléculas na escala nanométrica (CHOPRA, 2007; RAI et al., 2009).

2.4 Considerações sobre a nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência, engenharia e tecnologia relacionada a entender, controlar e aplicar as propriedades nanométricas dos materiais com as mais diversas finalidades, o que tem atraído progressivamente mais pesquisadores e investidores que buscam várias aplicações para este tipo de tecnologia (WAGNER et al., 2006; YOUTIE et al., 2011).

Não há consenso na literatura acerca do conceito de nanotecnologia. No entanto, para o presente estudo, consideraremos que a nanotecnologia (do grego “*nano*” que significa anão) seria a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas, através do controle da matéria na escala nanométrica (10^{-9} m), isto é, os materiais deveriam possuir tamanho de 1-1000nm em pelo menos uma das dimensões, o que inclui desde poucos átomos até tamanhos subcelulares (JAIN, 2008).

Apesar desta restrição de tamanho no conceito de nanotecnologia, esta comumente se refere a estruturas que são formadas por até centenas de

nanômetros em tamanho e que são desenvolvidas pela união de várias nanoestruturas individuais (RAI, et al., 2009).

Atualmente, a nanotecnologia tem sido um campo de pesquisa promissor e multifacetado, não oferecendo somente melhora no desempenho de técnicas anteriormente utilizadas, mas também contribuindo para o aparecimento de novas ferramentas e estratégias (WAGNER et al., 2006). Algumas técnicas e ferramentas na escala nanométrica têm surgido para melhorar a distribuição de drogas e o diagnóstico médico (CARUTHERS et al., 2007).

Além disso, o surgimento desta nova possibilidade tecnológica permite o desenvolvimento e posterior comercialização de novas classes de macromoléculas que necessitam de uma distribuição precisa para serem bioativas em seu local de ação (RAI, et al., 2009).

Dessa forma, as alterações nas propriedades físicas, podem levar a modificações na atividade biológica de materiais manipulados na escala nanométrica, o que significa que estas características não serão semelhantes àquelas previamente estabelecidas. Algumas das propriedades que possibilitam e tornam vantajosa a utilização desta tecnologia para os mais diversos fins são o aumento da área de superfície funcional por unidade de volume e a habilidade em atravessar barreiras, o que pode ser explorado de inúmeras formas (CARUTHERS et al., 2007).

Estas propriedades estão diretamente relacionadas à utilização da nanotecnologia para melhorar o desempenho de fármacos que exibem problemas tais como meia-vida de curta duração, pequena biodisponibilidade, efeitos colaterais intensos, insolubilidade e instabilidade em sistemas biológicos (RAWAT et al., 2006). Segundo a literatura, este tipo de aplicação da nanotecnologia, estaria incluído na *nanomedicina*, que seria uma das vertentes de utilização da tecnologia na escala nanométrica aplicada à medicina humana (CARUTHERS et al., 2007).

O termo nanomedicina surgiu no final dos anos 1990, e de forma geral, engloba a utilização da nanotecnologia como ferramenta para auxiliar o diagnóstico médico e o tratamento de doenças, baseando-se na utilização de materiais na interface entre o mundo molecular e macroscópico (WAGNER et al., 2006).

O objetivo desta tecnologia seria melhorar a qualidade do diagnóstico, fazendo a detecção prévia e de forma acurada de doenças, para que o tratamento ocorresse da forma mais efetiva possível, minimizando os efeitos colaterais, e

possibilitando a avaliação da eficácia do tratamento não-invasivo (CARUTHERS et al., 2007).

Atualmente, uma variedade infinita de produtos que utilizam da nanotecnologia estão no mercado, o que inclui produtos como cosméticos, equipamentos esportivos, sistemas de controle ambiental, entre outros. Existem ainda produtos médicos da ordem de 10^{-9} , com a maioria sendo fármacos que são formulados ou reformulados em estruturas nanométricas com vistas a manipular propriedades farmacodinâmicas, a biodistribuição e acima de tudo, a efetividade (WAGNER et al., 2006; RAI, et al., 2009; YOUTIE et al., 2011).

Todavia, a literatura já descreve inúmeros dispositivos que poderão ser utilizados na saúde humana baseados em materiais manipulados na escala nanométrica como, por exemplo, os cateteres urinários revestidos com nanopartículas de prata, o que pode contribuir de forma efetiva contra a formação de biofilmes bacterianos (SAMUEL & GUGGENBICHLER, 2004).

2.5 Nanopartículas de prata (AgNPs) e quitosana (QIT)

A prata é conhecida por sua atividade antibacteriana desde a antiguidade e por isto, era utilizada para os mais diversos fins, entre eles, no tratamento de queimaduras e, na forma de solução de sais de prata, na profilaxia de infecções oculares em recém-nascidos (LOK et al., 2007; PANÁCEK et al., 2006; KIM et al., 2007; LI et al., 2010).

Devido ao seu amplo espectro de ação antimicrobiano, a prata tem sido utilizada para purificação de água e ar, na produção de gêneros alimentícios, cosméticos, indústria têxtil, e em revestimentos de materiais biomédicos, tais como cateteres (LOK et al., 2007; LI et al., 2008; JONES & HOEK, 2010).

Os íons de prata (Ag^+) são associados a diversos mecanismos de ação na célula bacteriana, sendo conhecidos por agirem sobre estruturas e moléculas, levando a morte celular. Um dos mecanismos de ação destes íons inclui a reação com resíduos de aminoácidos nucleofílicos em proteínas, e a anexação a grupos carboxílicos na membrana ou enzimas, o que levará a desnaturação protéica (PERCIVAL et al., 2005).

Além deste mecanismo, a ação antibacteriana da prata é associada á diversos fenômenos, tais como a inibição de enzimas oxidativas, a captação de succinato da membrana de vesículas, o efluxo de metabólitos, a interferência na replicação do DNA; através da interação com o fosfato e enxofre presentes nesta molécula; e a ligação á componentes da parede celular e do citoplasma (PERCIVAL et al., 2005; PANÁCEK et al., 2006; LI et al, 2010).

No entanto, existe um consenso na literatura de que a formação de poros na parede celular e na membrana externa bacteriana, alterando a permeabilidade celular, seja o efeito causador de maior dano para a célula (CLEMENT & JARRETT, 1994; SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004; PERCIVAL et al., 2005).

Mecanismo de ação semelhante tem sido associado á nanopartículas de prata (AgNPs), amplamente utilizadas em diversos dispositivos, principalmente devido á potencialização da atividade antibacteriana, decorrente da dimensão nanométrica desta partícula, o que permite o aumento da superfície de contato da entre a prata iônica e a membrana celular bacteriana (PANÁCEK et al., 2006).

Foi demonstrado que a formação de poros na membrana externa de bactérias Gram-negativas, se deve ao esgotamento do metal, o que provoca a liberação de moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana, essencial para o efeito bactericida nas nanopartículas (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004). Outro fator que contribui para o melhor desempenho das nanopartículas de prata, em comparação á atividade do íon prata, é a atração eletrostática que se estabelece entre as nanopartículas positivamente carregadas e a as células bacterianas (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004).

As AgNPs se mostraram efetivas contra *Escherichia coli*, nas quais foi observado tanto o acúmulo destas partículas na membrana, quanto sua incorporação no citoplasma (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004). Em *E.coli*, a prata inibe a absorção de fósforo e leva ao efluxo de fosfato acumulado, assim como de manitol, succinato, glutamina, prolina, além da inibição da oxidação de vários compostos, como a glicose, glicerol, fumarato e succinato (SCHREURS & ROSENBERG,1982; LI et al., 2010).

Assim como o observado para *E.coli*, para a espécie *Staphylococcus aureus*, as AgNPs também mostraram-se efetivas, tendo condensado o DNA, resultando em perda da habilidade de replicação, além de redução da atividade enzimática da dehidrogenase da cadeia respiratória (LI et al.,2011). Ademais, a análise proteômica

feita por Li et al (2011), demonstrou a expressão abundante de algumas enzimas, como a formiato acetiltransferase, e redução de outras, como dehidrogenase e recombinase.

Em um estudo feito por Espinosa-Cristóbal et al. (2009), desafiando a espécie *Streptococcus mutans* com AgNPs, foi demonstrado que a membrana celular não sofreu alterações independente do tamanho da partícula utilizado, sendo importante apenas a área superficial da mesma. As partículas de menor tamanho liberam mais íons Ag^+ e seu efeito antibacteriano parece ser melhor (ESPINOSA-CRISTÓBAL et al., 2009).

Considerando que novas alternativas antimicrobianas devem conter atributos desejáveis tais como: eficácia antibacteriana, segurança ambiental, baixa toxicidade e fácil fabricação, inúmeros pesquisadores têm buscado formas de associar a quitosana biodegradável às AgNPs, potencializando seu efeito bactericida, uma vez que este polímero possui atributos desejáveis aos novos agentes de combate (RABEA et al., 2003).

Conhecida por diversas de aplicações potenciais, a quitosana (QIT) é derivada da desacetilação da quitina, polissacarídeo de ocorrência natural, presente no exoesqueleto de crustáceos, desempenhando nestes, função estrutural (AGNIHOTRI et al., 2004). Formada por monossacarídeos unidos através de ligações lineares do tipo β 1 \rightarrow 4, a QIT possui estrutura que se assemelha a da celulose, entretanto, é composta por 2-amino-2-deoxi- β -glicano em combinação com ligações glicosídicas (AGNIHOTRI et al., 2004; AIDER, 2010). Essa substância é formada como resultado da desacetilação em aproximadamente 50% da quitina (dependendo da origem do polímero), quando esta se torna solúvel em um meio ácido-aquoso. A sua solubilização ocorre através da protonação da função amino (NH_2) no C-2 da unidade de repetição de D-glicosamina. (RINAUDO, 2006; KONG et al., 2010).

As inúmeras possibilidades de modificações estruturais da QIT fazem dela um material de escolha para inúmeros fins, o que inclui, por exemplo, a reconstrução de tecidos, na qual ela é associada ao glicerofosfato, posteriormente misturada ao fosfato de cálcio e ácido cítrico, formando um sistema de enrijecimento injetável para reparo e preenchimento ósseo (KIM et al., 2005; YAMADA et al., 2005; KONG et al., 2010).

Sendo encontrado em uma variedade de tamanhos e graus de desacetilação (GD), este polímero tem sido utilizado em diversos produtos farmacêuticos, inclusive formando estruturas como fibras, filmes e hidrogéis (AGNIHOTRI et al., 2004; RINAUDO, 2006).

Atividade antimicrobiana tem sido sugerida e demonstrada em diversos estudos, inclusive evidenciando seu espectro de ação contra fungos, vírus e bactérias, o que tem atraído a atenção dos pesquisadores (KENDRA & HADWIGER, 1984; RABEA et al., 2003; LIU et al., 2004; AIDER, 2010).

Do exposto, considerando-se o potencial antimicrobiano das AgNPs; o custo benefício na sua produção; a necessidade de novas estratégias terapêuticas para infecções com patógenos resistentes a drogas; e dando continuidade a linha de pesquisa “Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos e características fisiológicas de bactérias resistentes a drogas de relevância clínica humana e ambiental” em desenvolvimento no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF; pretende-se contribuir com conhecimento sobre o uso de nanopartículas de prata associadas ou não a quitosana e drogas antimicrobianas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata associadas ou não a quitosana e drogas antimicrobianas de uso clínico frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas de relevância clínica-microbiológica.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de susceptibilidade de linhagens bacterianas representativas de Gram positivos e Gram negativos de interesse clínico-microbiológico (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*);
- Determinar o perfil de susceptibilidade a nanopartículas de prata (AgNPs) das linhagens bacterianas de Gram positivos e Gram negativos de interesse clínico-microbiológico;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a quitosana (QIT) e sua associação com as nanopartículas de prata (QIT-AgNPs) das linhagens bacterianas representativas de Gram positivos e Gram negativos de interesse clínico-microbiológico;
- Determinar o perfil de susceptibilidade frente às associações droga antimicrobiana-quitosana (ATB-QIT), droga antimicrobiana- nanopartículas de prata (ATB- AgNPs) e -droga antimicrobiana-quitosana-nanopartículas de prata (ATB-QIT-AgNPs) das linhagens bacterianas representativas de Gram positivos e Gram negativos de interesse clínico-microbiológico;
- Determinar as interações entre os compostos com propriedades antimicrobianas testados, classificando o efeito das combinações como sinérgico, aditivo,

indiferente ou antagonista, pela determinação da concentração inibitória fracionada usando-se o método do *Checkerboard*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas oito amostras bacterianas de referência (ATCC – American Type Culture Collection) pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF, entre as quais são encontradas espécies Gram negativas e Gram positivas de relevância clínica e microbiológica: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

Os microrganismos são mantidos em freezer a -80°C e freezer -20°C em meio de congelamento acrescido de 10% de glicerol. Durante os experimentos os microrganismos foram cultivados em ágar Brain Heart Infusion (BHI), por 24 horas, em estufa bacteriológica a 35,5°C para obtenção de massa celular.

4.2 Determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas (ATB)

Para a determinação do perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas, utilizou-se o método da microdiluição em caldo, de acordo com as orientações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). As concentrações testadas dos antimicrobianos variaram de 0,06µg/mL a 64µg/mL.

Foram testados diferentes antimicrobianos para cada grupo bacteriano, selecionados em função da sua utilização rotineira e recomendações do CLSI: (i) para os Gram positivos foram avaliados oxacilina (OXA), vancomicina (VAN), tetraciclina (TET), sulfametoxazol- trimetoprim (STX), levofloxacina (LEV) e rifamicina (RIF); (ii) para os Gram negativos foram avaliados tetraciclina (TET), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), sulfametoxazol- trimetoprim (SXT), levofloxacina (LEV), meropenem (MER). Concentrações crescentes (de 0,06 µg/mL a 64,0 µg/mL) dos antimicrobianos a partir de soluções estoque (0,4 mg/mL), obtidas

pela pesagem do sal em balança analítica, posterior diluição em diluente preconizado pelo CLSI e esterilização através de filtro com membrana (milipore) 0,22 µm, foram adicionadas aos poços em placas de microtitulação de poliestireno contendo caldo Mueller-Hinton (CMH) e processadas por diluição seriada em volume final de 0,15 mL, para realização do teste em duplicata.

As linhagens bacterianas foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 35,5°C, por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, com auxílio de alças bacteriológicas estéreis, foram obtidas suspensões bacterianas em CMH estéril, com turbidez ajustada a 0,5 na escala McFarland (~10⁸UFC/mL). As suspensões bacterianas foram adicionadas a placas contendo os antimicrobianos (0,15 mL), a fim de se obter volume final em cada poço de 0,3 mL e a concentração do antimicrobiano desejado ajustada para 1x. As placas foram tampadas e incubadas a 35,5°C, por 24 horas. Poços com meio de cultura sem adição do antimicrobiano também foram inoculados em cada sistema experimental, como controle de crescimento.

Além disso, as próprias amostras bacterianas de referencia foram utilizadas como controle de qualidade nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, pela determinação da concentração inibitória mínima de droga e comparação com as tabelas de referencia do CLSI (para as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603).

O crescimento microbiano foi verificado através da turvação do meio e com o auxílio dos indicadores cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) e solução de resazurina 0,01%, ambos marcadores químicos não enzimáticos de metabolismo celular baseado na oxidação de enzimas carreadoras de elétrons, agindo como aceptores (GABRIELSON et al., 2002). Os indicadores foram adicionados na concentração final de 0,01% em solução aquosa e após incubação por 45 minutos em estufa bacteriológica a 35,5°C. A menor concentração na qual não houve crescimento bacteriano foi detectada e considerada a concentração inibitória mínima (CIM) para cada composto testado.

O TTC, incolor, quando reduzido, é precipitado na forma de sal de tetrazolium de cor róseo-avermelhada, indicando o crescimento bacteriano (GABRIELSON et al., 2002).

A resazurina, não-fluorescente e não tóxica de cor original azul, se torna rosa e fluorescente quando reduzida a resorufina, através da ação de oxidoredutases, sem, no entanto, haver a precipitação deste indicador. A resorufina, por sua vez, é ainda mais reduzida a hidroresorufina, a qual é incolor e não-fluorescente (GABRIELSON et al., 2002; SARKER, et al., 2007).

4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade ao nitrato de prata (AgNO_3) nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e associação quitosana e nanopartículas (QIT-AgNPs)

4.3.1 Obtenção de nanopartículas de prata (AgNPs) e da associação quitosana-nanopartículas de prata (QIT-AgNPs)

As nanopartículas de prata foram sintetizadas no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM) pertencente ao Departamento de Química do ICE da UFJF.

As nanopartículas de prata foram utilizadas na forma de colóide de prata, preparado a partir da mistura formada pela adição de 10mL de uma solução de citrato de sódio $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L a 10mL de uma solução de AgNO_3 $2,9 \cdot 10^{-4}$ mol/L, posteriormente colocada em banho de gelo sob agitação vigorosa. 0,6ml de NaBH_4 0,1mol/L foram adicionados gota a gota nesta mistura, o que resultou na proporção molar de 0,86 AgNO_3 : 34 citrato de sódio. Para chegar à concentração de prata final de 0,2mg/mL foi preciso aumentar a concentração inicial de Ag^+ para $2,1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, mantendo-se a concentração e os volumes do citrato de sódio e NaBH_4 .

Para a obtenção da associação nanopartículas de prata e quitosana, em uma primeira etapa, foram adicionados 0,4mL de ácido acético glacial (HAc) a 3,5mL de solução de quitosana na concentração de 2g/L. À 40mL da solução estoque de nanopartículas de prata descrita acima foram incorporados 0,5mL da solução de quitosana 2g/L.

4.3.2 Ensaio biológicos de susceptibilidade bacteriana

Perfis de suscetibilidade bacteriana ao nitrato de prata (AgNO_3), ao colóide de nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e sua associação com quitosana (QIT-AgNPs) foram determinados, como descrito anteriormente, pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com as orientações do CLSI para determinação do perfil de susceptibilidade bacteriano a drogas antimicrobianas (CLSI, 2009).

Foram utilizados colóides de nanopartículas de prata, de quitosana e da associação de nanopartículas com quitosana como solução estoque na concentração de 0,2mg/mL.

O crescimento microbiano foi verificado, também como descrito acima, através da turvação do meio e com o auxílio dos indicadores TTC e solução de resazurina à 0,01%.

4.4 Determinação do perfil de susceptibilidade as nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e suas associações com drogas antimicrobianas (ATBs-QIT e ATB-QIT-AgNPs)

Após a determinação da CIM para os colóides de nanopartículas de prata associadas ou não a quitosana, valores correspondentes à $\frac{1}{2}$ CIM (concentração sub-inibitória) foram fixados nos sistemas experimentais a partir de soluções estoques dos colóides e novos experimentos de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados como descrito anteriormente, pelo método da microdiluição em caldo, de acordo com as orientações do CLSI (CLSI, 2009), utilizando-se os mesmos antimicrobianos anteriormente citados para cada grupo bacteriano.

O crescimento microbiano foi verificado, também como descrito através da turvação do meio e com o auxílio dos indicadores TTC e solução de resazurina à 0,01%. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.5 *Checkerboard*

O *Checkerboard* é um dos métodos de titulação mais utilizados para avaliar interações entre drogas com potencial antimicrobiano (TIN et al, 2009). Este ensaio foi realizado em placas de microtitulação de poliestireno, nas quais foram adicionadas as combinações: antimicrobianos e AgNPs (ATB-AgNPs); antimicrobianos e quitosana (ATB-QIT); e antimicrobianos-QIT-AgNPs (ATB-QIT-AgNPs); além das suspensões bacterianas e CMH.

A partir da incubação das amostras bacterianas em ágar BHI, a 35,5°C, por 24 horas em estufa bacteriológica, foram obtidas as suspensões através da adição de inóculo ao CMH, que teve sua turbidez ajustada para a escala de 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL).

Foram adicionados 0,15mL de suspensão bacteriana em cada poço, a fim de se obter 0,3mL de volume final. As placas foram tampadas e incubadas a 35,5°C, por 24 horas. Poços com meio e cultura sem adição de antimicrobianos ou colóides também foram inoculados em cada sistema experimental, como controle de crescimento.

Para o *Checkerboard* foram utilizadas as soluções estoque de AgNPs, QIT e QIT-AgNP nas concentrações de 0,2mg/mL e 0,02mg/mL obtidas a partir de síntese anteriormente citada.

Assim como nos ensaios anteriores, todos os antimicrobianos foram utilizados na concentração de 0,4mg/mL e 0,004mg/mL, com exceção da combinação sulfametoxazol-trimetoprim, para o qual a solução estoque utilizada foi de 10mg/mL.

Considerando a determinação da CIM para cada composto separadamente, foram adicionadas quantidades crescentes em sentido vertical de antimicrobianos em combinação com quantidades crescentes de cada colóide em sentido horizontal, resultando em concentrações diversificadas de cada composto em cada vértice.

Através do *Checkerboard* foi possível determinar quais interações ocorreram entre os compostos com propriedades antimicrobianas testados, classificando o efeito das combinações como sinérgico, aditivo, indiferente ou antagonista. Esta classificação se baseia na utilização do CFI (Concentração Fracionada Inibitória) para todas as combinações, de acordo com a fórmula $CFI_{index} = CFI_A + CFI_B$, onde: $CFI_A = CIM_A$ na combinação/ CIM_A sozinha; $CFI_B = CIM_B$ na combinação/ CIM_B sozinha.

Consideraremos como CIM_A , a concentração inibitória mínima para os compostos AgNPs, QIT ou AgNPs-QIT, de acordo com cada ensaio, e como CIM_B , a concentração inibitória mínima para os antimicrobianos, da mesma forma.

Para valores de $CFI_{index} \leq 0.5$ consideramos sinergismo, para um CFI_{index} variando entre > 0.5 e ≤ 1 , efeito aditivo, indiferente para valores de CFI_{index} entre > 1 e ≤ 2 , e efeito antagônico para $CFI_{index} > 4$ (TIN et al.,2009; JAYARAMAN et al., 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos

As concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos para as linhagens bacterianas de referência estão de acordo com os valores descritos pelo CLSI, validando os ensaios pelo método da microdiluição em placa (Tabelas 1A e 1B). O TTC e a solução de resazurina mostraram-se eficientes como indicadores de viabilidade celular nestes experimentos.

Tabela 1A. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados.

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIMµg/ml)					
	TET	AMI	GEN	STX	LEV	MER
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	4	4	4	1	0,5	4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	0,5	8	4	1	1	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	16	0,5	32	2	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	8	2	1	0,5	2	1

TET (tetraciclina); AMI (amicacina); GEN (gentamicina); STX (sulfametoxazol-trimetropin); LEV (levofloxacina); MER (meropenem)

Tabela 1B. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados.

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIMµg/ml)					
	OXA	VAN	TET	STX	LEV	RIF
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	32	4	16	8	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,25	0,5	16	0,25	8	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,25	1	1	0,25	8	1
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	0,5	32	4	1	1	16

OXA (oxacilina); VAN (vancomicina); TET (tetraciclina); SXT (sulfametoxazol-trimetropin); LEV (levofloxacina); RIF (rifamicina)

5.2 Avaliação dos perfis de susceptibilidade a AgNO₃, AgNPs, QIT e QIT-AgNPs

Os perfis de susceptibilidade bacteriana ao nitrato de prata (AgNO₃), as nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e associação nanopartículas e quitosana (QIT- AgNPs) são apresentados na Tabela 2. O cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazolium (TTC) e a resazurina mostraram-se eficientes como indicadores de viabilidade celular nestes experimentos.

Para os compostos químicos avaliados, observa-se que a associação quitosana e as nanopartículas de prata mostraram-se mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano, se comparados ao nitrato de prata e as nanopartículas. Não foram evidenciadas diferenças significativas entre as CIM da quitosana e da combinação QIT-AgNPs, com exceção, neste caso, dos valores observados para as linhagens *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para ambas as linhagens, as CIMs da associação nanopartículas de prata e quitosana foram menores do que o observado para as nanopartículas apenas. O mesmo ocorreu quando consideramos a quitosana, cujo CIM se mostrou o mesmo em todas as linhagens, sendo a CIM observada, em sua maioria, como menor do que aquela encontrada para a combinação QIT- AgNPs, exceto para as linhagens de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, como o ocorrido para nanopartículas de prata (Tabela 2).

De maneira geral, o comportamento dos dois grupos bacterianos avaliados (Gram negativos e Gram positivos) foi homogêneo, ao se considerar a CIM que inibiu 50% das amostras, embora tenha sido observado que para a associação nanopartículas de prata e quitosana o comportamento dos Gram negativos foi mais heterogêneo, com a CIM variando entre 8 e 32 µg/mL. Comparando-se os valores de CIM observados para as nanopartículas associadas ou não a quitosana, as CIM foram menores do que aquelas para as nanopartículas somente, indicando ação combinada na associação com quitosana (Tabela 3).

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade do grupo de bactérias aos compostos químicos testados.

Linhagem Bacteriana	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	AgNO ₃	AgNPs	QIT	QIT-AgNPs
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	32	64	16	16
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	32	64	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	64	64	16	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	16	32	16	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	32	>64	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	64	>64	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	64	>64	16	16
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	32	>64	16	16

AgNO₃ (nitrato de prata); AgNPs (nanopartículas de prata); QIT (quitosana); QIT-AgNPs (quitosana e nanopartículas de prata).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os grupos bacterianos frente aos compostos químicos testados e a quantidade de substância necessária para inibir 50 e 90% das linhagens bacterianas testadas.

Grupo Bacteriano	Substância Teste	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
		CIM _{50%}	CIM _{90%}	Varição
Gram negativos	AgNO ₃	32	32	32-64
	AgNPs	64	64	16-64
	QIT	16	16	-
	QIT- AgNPs	16	16	8-32
Gram positivos	AgNO ₃	32	64	16-64
	AgNPs	>64	>64	-
	QIT	16	16	-
	QIT- AgNPs	16	16	-

AgNO₃ (nitrato de prata); AgNPs (nanopartículas de prata); QIT (quitosana); QIT-AgNPs (quitosana e nanopartículas de prata).

5.3 Avaliação dos perfis de susceptibilidade das combinações entre AgNPs, QIT e QIT-AgNPs com antimicrobianos (QIT-AgNPs-ATB)

Para a determinação das CIM para as nanopartículas de prata combinadas com os antimicrobianos (ATB-AgNPs), antimicrobianos e quitosana (ATB-QIT), ou antimicrobianos e quitosana combinada com nanopartículas (ATB-QIT-AgNPs), foram utilizadas duas amostras representativas de Gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 35218 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603) e duas representativas de Gram positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299). A justificativa para redução do número de microrganismos é fundamentada na limitação de colóide e no comportamento semelhante dentro dos grupos bacterianos (Tabelas 4A e B; Tabelas 5A e B e Tabelas 6A e B). Para estes experimentos, a concentração dos colóides (AgNPs, QIT e QIT-AgNPs) foram fixadas em suas respectivas concentrações subinibitórias (CSI).

De modo geral, para todas as espécies bacterianas avaliadas, a associação ATB-QIT-AgNPs apresentaram grande potencial inibitório, que pode estar relacionado à estabilidade das AgNPs associadas à quitosana ou interação positiva das nanopartículas com os antimicrobianos. A observação da estabilidade do composto QIT-AgNPs e a possibilidade da sua interação com drogas já instituídas é altamente relevante e reforça as recomendações da literatura sobre a discussão acerca da reformulação de uso de antimicrobianos tradicionais, além da pesquisa de novas drogas e estratégias para sobrepujar o crescente fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Tabela 4A. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata na concentração subinibitória (32 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM µg/ml)					
	TET- AgNPs	AMI- AgNPs	GEN- AgNPs	STX- AgNPs	LEV- AgNPs	MER- AgNPs
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	2	0,03	0,03	1	0,5	0,03
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	0,5	0,03	0,03	1	0,125	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	4	0,03	0,03	2	1	0,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	2	0,03	0,03	2	0,25	0,03

TET-AgNPs (tetraciclina-nanopartículas de prata); AMI-AgNPs (amicacina-nanopartículas de prata); GEN-AgNPs (gentamicina-nanopartículas de prata); STX-AgNPs (sulfametoxazol-trimetropin-nanopartículas de prata); LEV--AgNPs (levofloxacina-nanopartículas de prata); MER--AgNPs (meropenem-nanopartículas de prata).

Tabela 4B. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata na concentração subinibitória (32 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM µg/ml)					
	OXA- AgNPs	VAN- AgNPs	TET- AgNPs	STX- AgNPs	LEV- AgNPs	RIF- AgNPs
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,03	0,03	2	0,03	0,03	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,03	4	16	0,03	0,03	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,03	8	0,125	0,03	0,25	1
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	0,03	4	4	0,03	0,12	16

OXA-AgNPs (oxacilina-nanopartículas de prata); VAN-AgNPs (vancomicina-nanopartículas de prata); TET-AgNPs (tetraciclina-nanopartículas de prata); STX-AgNPs (sulfametoxazol-trimetropin-nanopartículas de prata); LEV-AgNPs (levofloxacina-nanopartículas de prata); RIF-AgNPs (rifamicina-nanopartículas de prata).

Tabela 5A. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com quitosana na concentração sub-inibitória (8 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM µg/ml)					
	TET-QIT	AMI-QIT	GEN-QIT	STX-QIT	LEV-QIT	MER-QIT
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

TET-QIT (tetraciclina-quitosana); AMI-QIT (amicacina-quitosana); GEN-QIT (gentamicina-quitosana); STX-QIT (sulfametoxazol-trimetropin-quitosana); LEV-QIT (levofloxacina-quitosana); MER-QIT (meropenem-quitosana).

Tabela 5B. Perfil de susceptibilidade de linhagens do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com quitosana na concentração sub-inibitória (8 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM µg/ml)					
	OXA-QIT	VAN-QIT	TET-QIT	STX-QIT	LEV-QIT	RIF-QIT
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

OXA-QIT (oxacilina-quitosana); VAN-QIT (vancomicina-quitosana); TET-QIT (tetraciclina-quitosana); STX-QIT (sulfametoxazol-trimetropin-quitosana); LEV-QIT (levofloxacina-quitosana); RIF-QIT (rifamicina-quitosana).

Tabela 6A. Perfil de susceptibilidade de linhagens representativas do grupo de bactérias Gram negativas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata e quitosana (8 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (CIM µg/ml)					
	TET-	AMI-	GEN-	STX-	LEV-	MER-
	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

TET-QIT-AgNPs (tetraciclina-quitosana-nanopartículas de prata); AMI-QIT-AgNPs (amicacina-quitosana-nanopartículas de prata); GEN-QIT-AgNPs (gentamicina-quitosana-nanopartículas de prata); STX-QIT-AgNPs (sulfametoxazol-trimetropin-quitosana-nanopartículas de prata); LEV-QIT-AgNPs (levofloxacina-quitosana-nanopartículas de prata); MER- QIT-AgNPs (meropenem-quitosana-nanopartículas de prata).

Tabela 6B. Perfil de susceptibilidade de linhagens representativas do grupo de bactérias Gram positivas aos antimicrobianos testados em combinação com nanopartículas de prata e quitosana (8 µg/ml).

Linhagem Bacteriana	Drogas antimicrobianas (MIC µg/ml)					
	OXA-	VAN-	TET-	STX-	LEV-	RIF-
	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs	QIT- AgNPs
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

OXA (oxacilina-quitosana-nanopartículas de prata); VAN (vancomicina-quitosana-nanopartículas de prata); TET (tetraciclina-quitosana-nanopartículas de prata); STX (sulfametoxazol-trimetropin-quitosana-nanopartículas de prata); LEV (levofloxacina-quitosana-nanopartículas de prata); RIF (rifamicina-quitosana-nanopartículas de prata).

5.4 Checkerboard

Por limitações técnicas, neste ensaio a menor concentração de antimicrobiano considerada foi de 0,48µg/mL, e para AgNPs, QIT e QIT- AgNPs, foi de 0,06µg/mL. Em placas onde o crescimento do controle positivo após incubação foi o esperado e ainda assim, não foi observado crescimento mesmo na menor concentração de cada composto, foram levados em consideração os respectivos valores citados acima, para a determinação do CFI.

CIM_A na combinação = 0,06µg/mL

CIM_B na combinação = 0,48µg/mL

Utilizando como base os valores de CFI, foram estabelecidas as relações entre as combinações testadas.

Para as todas as combinações, o efeito resultante foi positivo, variando entre efeito sinérgico e aditivo, exceto para as combinações de LEV-AgNPs frente á ambas as linhagens Gram negativas, para a qual foi encontrado efeito indiferente. Efeito aditivo foi observado para as combinações TET-AgNPs e AMI-AgNPs, para ambas e *K.pneumoniae*, respectivamente. Sinergismo foi o efeito das demais combinações sobre as linhagens testadas (Tabela 7).

Em contrapartida, o efeito encontrado para as combinações OXA- AgNPs para *S.aureus* e *E.faecalis*, foi indiferente, enquanto para as demais combinações, foi encontrado efeito sinérgico, exceto para VAN-AgNPs, na qual observamos efeito aditivo.

Tabela 7A. CFI_{index} para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Escherichia coli</i>	Interpretação	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Interpretação
TET-AgNPs	0,1209	ADITIVO	0,625	ADITIVO
AMI-AgNPs	0,0609	SINÉRGICO	0,9609	ADITIVO
GEN-AgNPs	0,1209	SINÉRGICO	0,1563	SINÉRGICO
LEV-AgNPs	2,125	INDIFERENTE	1,001	INDIFERENTE
MER-AgNPs	0,2409	SINÉRGICO	0,2409	SINÉRGICO

TET-AgNPs (tetraciclina-nanopartículas de prata); AMI-AgNPs (amicacina-nanopartículas de prata); GEN-AgNPs (gentamicina-nanopartículas de prata); LEV-AgNPs (levofloxacina-nanopartículas de prata); MER-AgNPs (meropenem-nanopartículas de prata).

Tabela 7B. CFI_{index} para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Staphylococcus aureus</i>	Interpretação	<i>Enterococcus faecalis</i>	Interpretação
OXA-AgNPs	1,9209	INDIFERENTE	2,0009	INDIFERENTE
VAN-AgNPs	0,605	ADITIVO	0,0625	SINÉRGICO
TET-AgNPs	0,4809	SINÉRGICO	0,1209	SINÉRGICO
LEV-AgNPs	0,0609	SINÉRGICO	0,4809	SINÉRGICO

OXA-AgNPs (oxacilina-nanopartículas de prata); VAN-AgNPs (vancomicina-nanopartículas de prata); TET-AgNPs (tetraciclina-nanopartículas de prata); LEV-AgNPs (levofloxacina-nanopartículas de prata).

Quando expostas à combinação ATB-QIT, as linhagens de Gram negativas apresentaram efeito indiferente apenas para a combinação AMI-QIT frente a *K.pneumoniae*, enquanto as demais combinações mostraram efeito sinérgico para ambas (Tabela 8A).

Para as Gram positivas, foi observado efeito indiferente apenas para a combinação OXA-QIT, e um forte antagonismo para a combinação VAN-QIT, ao considerarmos a amostra de *S.aureus*. Para *E.faecalis*, todas as combinações testadas apresentaram efeito sinérgico, o mesmo ocorrendo para a espécie *S.aureus*, quando exposta á TET-QIT e á LEV-QIT (Tabela 8B).

Tabela 8A. CFI_{index} para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-QIT e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Escherichia coli</i>	Interpretação	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Interpretação
TET-QIT	0,1237	SINÉRGICO	0,0625	SINÉRGICO
AMI-QIT	0,2537	SINÉRGICO	1,0225	INDIFERENTE
GEN-QIT	0, 1218	SINÉRGICO	0,035	SINÉRGICO
LEV-QIT	<0,9637	ADITIVO	0,4815	SINÉRGICO
MER-QIT	0,245	SINÉRGICO	<0,2437	SINÉRGICO

TET-QIT (tetraciclina-quitosana); AMI-QIT (amicacina-quitosana); GEN-QIT (gentamicina- quitosana); LEV-QIT (levofloxacina- quitosana); MER-QIT (meropenem-quitosana).

Tabela 8B. CFI_{index} para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-QIT e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Staphylococcus aureus</i>	Interpretação	<i>Enterococcus faecalis</i>	Interpretação
OXA-QIT	1,9237	INDIFERENTE	0,0638	SINÉRGICO
VAN-QIT	17	ANTAGÔNICO	0,0187	SINÉRGICO
TET-QIT	0,4837	SINÉRGICO	0,1237	SINÉRGICO
LEV-QIT	0,637	SINÉRGICO	0,4837	SINÉRGICO

OXA-QIT (oxacilina-quitosana); VAN-QIT (vancomicina-quitosana); TET-QIT (tetraciclina- quitosana); LEV-QIT (levofloxacina-quitosana).

Ao utilizar a combinação ATB-QIT-AgNPs, as combinações que mostraram efeito sinérgico para ambas as linhagens Gram negativas, foram MER-QIT-AgNPs e GEN-QIT-AgNPs-. Este efeito também ocorreu para as combinações AMI-QIT-AgNPs e LEV-QIT-AgNPs-, todavia, apenas para *E.coli* e apenas *K.pneumoniae*, respectivamente (Tabela 9A).

Considerando as outras drogas, o efeito se mostrou aditivo para as combinações TET-QIT-AgNPs em *K.pneumoniae* e para LEV-QIT-AgNPs em *E.coli*. Em contrapartida, a combinação AMI-QIT-AgNPs- para *K.pneumoniae* se mostrou indiferente, o que também ocorreu para TET-QIT-AgNPs, quando em presença de *E.coli* (Tabela 9A).

Para ambas linhagens Gram positivas, o efeito sinérgico foi observado para a combinação TET-QIT-AgNPs, ocorrendo o mesmo para *S.aureus* exposta à LEV-QIT-AgNPs. Efeito aditivo foi observado em *E.faecalis* mediante exposição à LEV-QIT-AgNPs. Para as combinações OXA-QIT-AgNPs- e VAN- QIT-AgNPs o efeito encontrado foi indiferente, para *E.faecalis* e *S.aureus*, respectivamente. Antagonismo foi observado para OXA-QIT-AgNPs desafiando *S.aureus*, enquanto para *E.faecalis* o efeito variou entre indiferente e antagônico, quando consideramos a combinação VAN- QIT-AgNPs (Tabela 9B).

Tabela 9A. CFI_{index} para as linhagens Gram negativas quando expostas à combinação ATB-QIT-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Escherichia coli</i>	Interpretação	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Interpretação
TET-QIT-AgNPs	1,25	INDIFERENTE	0,625	ADITIVO
AMI-QIT-AgNPs	0,375	SINÉRGICO	1,2725	INDIFERENTE
GEN-QIT-AgNPs	0,5	SINÉRGICO	0,1875	SINÉRGICO
LEV-QIT-AgNPs	<0,9637	ADITIVO	<0,4818	SINÉRGICO
MER-QIT-AgNPs	<0,2437	SINÉRGICO	<0,1218	SINÉRGICO

TET-QIT-AgNPs (tetraciclina-quitosana-nanopartículas de prata); AMI-QIT-AgNPs (amicacina-quitosana-nanopartículas de prata); GEN-QIT-AgNPs (gentamicina-quitosana-nanopartículas de prata); LEV- QIT-AgNPs (levofloxacina- quitosana-nanopartículas de prata); MER- QIT-AgNPs (meropenem- quitosana-nanopartículas de prata).

Tabela 9B. CFI_{index} para as linhagens Gram positivas quando expostas à combinação ATB-QIT-AgNPs e interpretação dos valores encontrados.

Combinação	<i>Staphylococcus aureus</i>	Interpretação	<i>E.faecalis</i>	Interpretação
OXA-QIT-AgNPs	8,03	ANTAGÔNICO	1,9237	INDIFERENTE
VAN-QIT-AgNPs	1,5	INDIFERENTE	2,25	INDIFERENTE/ ANTAGÔNICO
TET-QIT-AgNPs	<0,4837	SINÉRGICO	0,2575	SINÉRGICO
LEV-QIT-AgNPs	<0,0637	SINÉRGICO	<0,9637	ADITIVO

OXA-QIT-AgNPs (oxacilina-quitosana-nanopartículas de prata); VAN-QIT-AgNPs (vancomicina- quitosana-nanopartículas de prata); TET-QIT-AgNPs (tetraciclina-quitosana-nanopartículas de prata); LEV-QIT-AgNPs (levofloxacina- quitosana-nanopartículas de prata).

6 DISCUSSÃO

Em termos populacionais, é válido supor que a sobrevivência bacteriana nos diversos sítios anatômicos dos seus hospedeiros esteja relacionada à sua capacidade de adaptação, incluindo a disseminação ou aquisição de genes como os que codificam, por exemplo, a produção de toxinas, ou resistência a antimicrobianos. Isso garante um reservatório de patógenos putativos de hospedeiros animais, visto que qualquer agente ou condição que possa alterar os padrões bioquímicos, fisiológicos e genéticos de indivíduos de uma população, poderia alterar os padrões de virulência da mesma (LORIAN & GEMMELL, 1994; WITTE, 2000; TOFT & ANDERSSON, 2010; BOYD, 2012).

Assim, no contexto da crescente resistência bacteriana e da falta de antimicrobianos capazes de conter este fenômeno, a busca por novas alternativas terapêuticas se tornou indispensável. Drogas de baixa toxicidade celular e alta efetividade contra patógenos têm sido as principais características consideradas na pesquisa por novos agentes de combate (RAI et al., 2009; SPELLBERG, 2009; IOM, 2010).

A procura por agentes antimicrobianos envolve tanto a descoberta de novas substâncias, quanto a modificação daquelas pré-existentes, com vistas a desenvolver drogas de amplo espectro de ação, capazes de sobrepujar o surgimento acelerado de linhagens resistentes a múltiplas drogas (GWYNN et al., 2010; IOM, 2010).

Já no início dos anos 2000, alertas para a comunidade médica acerca do declínio da produção de novos agentes antimicrobianos foram feitos. Nesta época, foi realizada uma pesquisa, na qual se pôde concluir que o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos era menor do que àquele das drogas relacionadas à hiperatividade, disfunção erétil e outras condições de agravo à saúde de maior apelo coletivo (SHLAES & MOELLERING, 2002).

Neste contexto, considerando-se que a prata (Ag^+) tem sido utilizada desde a antiguidade, se mostrando altamente tóxica a microrganismos, além de apresentar baixa capacidade de induzir resistência microbiana, diversos autores têm resgatado esse metal, à luz da necessidade de novas estratégias antimicrobianas, sobretudo

na forma de nanopartículas, em diferentes preparações (PANÁCEK et al., 2006; KIM et al., 2007; LI et al., 2008; SHARMA, et al., 2009; LI et al., 2010).

No presente estudo, inicialmente, foram avaliados os perfis de susceptibilidade para o nitrato de prata (AgNO_3), nanopartículas de prata (AgNPs), quitosana (QIT) e a associação nanopartículas de prata e quitosana (QIT-AgNPs).

O AgNO_3 foi utilizado com o objetivo de comparar sua atividade antibacteriana com a das AgNPs, uma vez que para ambos, a concentração da solução estoque foi de 0,2mg/mL, havendo assim, mesma quantidade de prata nas duas soluções. Dessa forma, é possível avaliar a atividade da prata iônica em relação ao metal estabilizado na forma de nanopartículas. De maneira inesperada, nossos resultados indicaram atividade do AgNO_3 superior à das NPs.

Considerando-se que as NPs podem ser sintetizadas em diferentes tamanhos, é aceito que as menores apresentam maior área disponível para contato, resultando em melhor atividade antibacteriana (PANÁCEK et al., 2006; MARTÍNEZ-CASTÁNÓN et al., 2008). Neste estudo, considerando-se que o tamanho das AgNPs nas sínteses químicas variou de 15 a 30 nanômetros, tamanho grande de NPs, se comparado à dados da literatura, pode ter contribuído para os valores de CIM relativamente altos para os microrganismos avaliados, comparando-se com o AgNO_3 .

Todavia, as AgNPs possuem maior área de superfície, onde se encontra uma grande fração de átomos, o que possibilita maior interação com a célula bacteriana, resultando em ação antimicrobiana elevada em comparação ao AgNO_3 . Assim, apesar da mesma quantidade de prata nos dois colóides, a disponibilidade da prata nas NPs é maior (CHO et al., 2005).

Já foi evidenciado que NPs de tamanho em torno de 7 nanômetros são mais eficientes na ação antimicrobiana, se comparadas às maiores, da ordem de 29 nanômetros (LOK et al., 2007; MARTÍNEZ-CASTÁNÓN et al., 2008). Além desses autores, Espinosa-Cristóbal (2009) em estudo com *Streptococcus mutans*, ao comparar NPs de diferentes tamanhos, concluiu que todas apresentaram o mesmo mecanismo de ação, potencializado pela existência de maior superfície de contato, como é o caso das partículas pequenas.

De qualquer forma, apesar de existirem vários trabalhos sugerindo atividade antimicrobiana de diferentes sínteses de AgNPs e outras nanopartículas, é difícil fazer comparações diretas com as publicações da literatura, devido a falta de

normas técnicas padronizadas, como: diversidade de meios de cultura, condições de incubação e principalmente, concentrações de NPs nos testes. Neste estudo, a avaliação do perfil de susceptibilidade às AgNPs foi realizada através da microdiluição em caldo, de acordo com o padronizado para avaliação da susceptibilidade de drogas antimicrobianas pelo CLSI (CLSI, 2009).

Além disso, já foi sugerido que testes de atividade antimicrobiana de NPs sofrem interferência do estado físico dos meios de cultura, se sólidos ou líquidos (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004). Estes autores sugerem que a CIMs em meio líquido são maiores do que aquelas observadas em meio sólido. Acredita-se que ocorram aglomerados de restos celulares e AgNPs nos sistemas líquidos, o que levaria a uma diminuição na concentração de células, mas não à completa inibição. Ao longo do tempo, a concentração de NPs disponíveis declinaria em função da interação destas com as células já mortas, tal como evidenciado por microscopia eletrônica (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004).

A limitação na síntese de grandes quantidades de AgNPs e sua disponibilidade para os testes biológicos justifica, neste estudo, a opção pela técnica da microdiluição em caldo, utilizada para determinação das CIMs das AgNPs em relação às linhagens bacteriana avaliadas. Assim, pode-se sugerir que além do tamanho das AgNPs, os ensaios em meio líquido puderam contribuir com os altos valores de CIM (32 a >64 µg/mL) observados.

Em relação ao espectro de atividade e as discrepâncias de valores de CIM observadas neste estudo para os microrganismos Gram negativos (32-64 µg/mL) e Gram positivos (>64 µg/mL), nossos resultados corroboram dados da literatura, que sugerem que os Gram negativos seriam mais susceptíveis à ação antimicrobiana das AgNPs.

Utilizando *E. coli* como modelo Gram negativo e microscopia eletrônica de transmissão, pesquisadores conseguiram observar a formação de poros na parede celular bacteriana, o que resultou em extravasamento do conteúdo celular, além da incorporação de AgNPs na membrana e posterior penetração intracelular de íons prata (Ag^+). Este processo, como evidenciado por outros autores, decorre da atração eletrolítica da célula bacteriana negativamente carregada com as AgNPs positivas (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004; MARTÍNEZ-CASTÁNÓN et al., 2008). Outros autores relacionaram anteriormente a formação de poros irregulares na membrana externa dos Gram negativos, ao esgotamento da prata, o que alteraria a

permeabilidade, através da liberação de moléculas de LPS e proteínas de membrana, incapacitando a célula de regular o transporte de substâncias (AMRO et al., 2000).

Sugere-se, ainda para Gram negativos, que apesar de lipídios e polissacarídeos serem unidos por ligações covalentes na membrana externa, esta associação origina uma estrutura que pode facilitar a interação com as AgNPs. Além disso, os lipopolissacarídeos, carregados negativamente, também atraem as AgNPs, que possuem carga positiva (SHRIVASTAVA et al., 2007).

Por outro lado, os Gram positivos possuem uma camada espessa de peptídeoglicano formada por cadeias polissacarídicas lineares ligadas por pequenos peptídeos, formando uma estrutura tridimensional, que dificulta a passagem das NPs devido á escassez de sítios de interação (BARON, 1996 apud SHRIVASTAVA et al., 2007). Estas observações justificariam as CIMs maiores observadas para os Gram positivos avaliados neste estudo (>64µg/mL).

Mesmo demonstrando-se mais eficaz, neste estudo, do que as AgNPs isoladamente, o AgNO₃ não poderia se configurar como alternativa na terapia antimicrobiana. Essa afirmação sustenta-se na baixa estabilidade do AgNO₃, sua elevada toxicidade ao tecidos humanos, relacionada á liberação contínua de íons Ag⁺ e sua redução a nitrito, o que leva a danos celulares severos, além da resistência bacteriana ao AgNO₃ já ter sido documentada (ATIYEH et al., 2007; KIM et al, 2007).

A quitosana (QIT) possui propriedades antimicrobianas, antitumorais, imunoestimulantes e hipocolesterômicas; é capaz de absorver metais tóxicos como mercúrio, cádmio, chumbo, entre outros; não apresenta toxicidade em tecidos vivos, além de ser biodegradável, características que a torna uma excelente alternativa para diversas finalidades (SUZUKI et al., 1986 e TOKORO et al., 1988 apud SUGANO et al., 1992; AGNIHOTRI, et al., 2004).

Nos tecidos vivos, essa substância não provoca reação alérgica ou rejeição, e sua biodegradação origina produtos inofensivos (amino açúcares), os quais são absorvidos pelo corpo humano (LIU et al., 2004). Esta degradação acontece através da ação da lisozima e por enzimas bacterianas do cólon, denominadas quitinases. Em geral, as endo-quitinases de microrganismos hidrolisam as ligações de N-acetil-β-1,4-glicosamina aleatoriamente (LIU et al., 2004). Quitinases também estão presentes nas plantas superiores, funcionando como mecanismo de defesa contra

os microrganismos, enquanto refletem relação simbiótica (RUIZ-HERRERA et al., 1975; BARTNICKI-GARCIA et al., 1994; RINAUDO, 2006).

Por sua vez, suas propriedades catiônicas conferem a este polímero ampla atividade antimicrobiana, além de permitir sua utilização extensiva na distribuição de fármacos, o que está relacionado com a habilidade de controlar a liberação de agentes ativos, além de sua natureza mucoadesiva, o que contribui para o aumento do intervalo de tempo residual da droga no sítio de absorção. Aplicações dos tipos oral, nasal, parenteral e transdérmica tem sido referenciadas (LIU et al., 2004; RINAUDO, 2006).

Neste estudo ao avaliar-se a CIM da QIT em relação aos microrganismos avaliados, observou-se alta atividade antibacteriana contra todas as linhagens, se comparada às AgNPs e AgNO₃. O mecanismo exato através do qual a QIT leva ao dano celular bacteriano ainda permanece obscuro. Todavia, sabe-se que em baixas concentrações (<0,2mg/mL) a interação de suas cargas positivas com cargas negativas das membranas celulares levam ao extravasamento do conteúdo bacteriano, culminando com a alteração da permeabilidade celular, característica relacionada a este colóide, por vários autores (RABEA et al., 2003; TIN et al., 2009).

Sabe-se ainda, que em ambientes ácidos, a QIT se torna policatiônica, o que causa aumento do pH. Quanto maior a densidade de cargas positivas, maior seu potencial antibacteriano. Em contrapartida, se a propriedade policatiônica da QIT é perdida, a eficácia antibacteriana se torna reduzida (YANG et al., 2005; KONG et al., 2010).

Ao considerar-se a combinação QIT-AgNPs, encontramos valores de CIM menores se compararmos com os outros compostos, o que se justifica pela alta estabilidade decorrente da presença da QIT. Os polímeros proporcionam distribuição uniforme de tamanhos das nanopartículas metálicas, além de melhorar a estabilidade das mesmas (HUSSAIN et al., 2003).

Sugere-se que os íons metálicos sejam reduzidos no polímero, o que garante a interação metal-agente estabilizante. Estes, por sua vez, envolvem os íons, formando uma espécie de capa, impedindo que o tamanho das partículas formadas seja alterado. Se a redução iônica do metal acontece antes da interação metal-agente estabilizante, este se torna incapaz de controlar o tamanho da partícula que será formada (PASTORIZA-SANTOS & LIZ-MARZÁN, 2002; COURROL et al., 2007;

JOUMAA et al., 2008). Além de polímeros, surfactantes como o SDS e o Tween 80 também atuam como agentes estabilizantes (KVÍTEK et al., 2008).

Ao avaliar-se o potencial antibacteriano das diferentes substâncias estudadas em associação com drogas antimicrobianas, inicialmente pela fixação da quantidade de AgNPs e QIT nos ensaios (32µg/mL) – drogas antimicrobianas e AgNPs (ATB-AgNPs), drogas antimicrobianas e quitosana (ATB-QIT) e drogas antimicrobianas, QIT e AgNPs (ATB-QIT-AgNPs) – foi observado um grande potencial inibitório ao considerar-se as CIMs obtidas para cada composto isoladamente e para as drogas antimicrobianas, também isoladamente. Neste contexto, as associações ATB-QIT e ATB-QIT-AgNPs destacam-se por sua atividade antimicrobiana, de acordo com os valores de CIM observados, em comparação com as associações ATB-AgNPs.

As combinações entre as drogas antimicrobianas e AgNPs vem sendo avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana por diversos autores, principalmente a partir do ano de 2005, e tem mostrado eficácia contra *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, linhagens que se destacam na microbiologia clínica pela crescente resistência a drogas, sendo considerados microrganismos multirresistentes (RMD) (SHAHVERDI et al., 2007; BIRLA et al., 2009; GADE et al., 2010; Li et al., 2010).

Assim, de maneira semelhante o observado no presente estudo, considerando-se a idéia de associação de compostos, Li e colaboradores (2005), utilizando de uma linhagem de *Escherichia coli*, realizaram em separado ensaios a fim de se determinar os perfis de susceptibilidade para AgNPs e para um β-lactâmico (amoxicilina). Nos ensaios iniciais, o MIC para as AgNPs foi de 40 µg/mL, enquanto para a amoxicilina, a inibição ocorreu com 525 µg/mL. Nos experimentos utilizando-se os dois compostos, amoxicilina 150µg/ml combinada com AgNPs 5µg/mL, inibiram o crescimento bacteriano. No entanto, separadamente, essas concentrações finais de antimicrobiano e AgNPs não inibiram a linhagem de *E. coli* (LI et al., 2010).

Quando consideramos os Gram negativos, o mesmo foi observado no presente estudo especialmente para as associações envolvendo AgNPs, QIT e os antimicrobianos tetraciclina (TET), amicacina (AMI), gentamicina (GEN) e meropenem (MER). Para estas associações, a CIM para os antimicrobianos foi reduzida em até 7 logs. Sugere-se que estes resultados, a partir do relatado por outros autores, possam estar relacionados á boa entropia conformacional que

possuem as AgNPs. Esta propriedade as beneficia na ligação de polivalentes, o que facilitaria a sua interação com os antimicrobianos (LI et al; 2010).

As associações entre os aminoglicosídeos avaliados com as AgNPs em Gram negativos (AMI- AgNPs e GEN-AgNPs), mostraram uma redução média de 6 a 8 log na CIM para os antimicrobianos. Diminuição significativa da CIM também foi observada em estudo realizado por Bonde e colaboradores (2012), considerando-se a combinação de GEN-AgNPs contra linhagem de *E. coli* e TET AgNPs contra linhagem de *Staphylococcus aureus*. Outros autores observaram, ainda, atividade antimicrobiana aumentada ao avaliar-se a combinação de AgNPs e macrolídeos, como a eritromicina, contra *S. Aureus* (SHAHVERDI et al., 2007)

Entretanto, um outro grupo de pesquisadores estudando, também *E. coli* e *S. aureus*, não observou qualquer diferença na atividade antimicrobiana das associações entre AMI e GEN com as AgNPs. Há de se considerar que neste estudo os ensaios foram realizados pelo método de disco-difusão (SHAHVERDI et al., 2007). Como já descrito anteriormente, foi sugerido na literatura que em meio sólido as AgNPs poderiam mostrar-se mais eficientes na inibição bacteriana (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004). Apesar disso, a disponibilidade de interação entre as NPs e as moléculas de antimicrobianos em discos impregnados pode não ter resultado em boa associação e/ou boa difusão no meio de cultura, o que explicaria a discrepância desses resultados em relação ao observado no presente estudo e no de outros autores.

As associações entre AgNPs e drogas antimicrobianas tem sido relatadas também considerando-se os antifúngicos. Gajbhiye e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antifúngica das AgNPs em combinação com o fluconazol, demonstrando que, apesar de as nanopartículas apresentarem atividade contra estes organismos, a sua associação com antimicrobianos potencializou seu efeito, tanto contra fungos filamentosos como contra os leveduriformes.

Tanto a TET, quando AMI e GEN são antimicrobianos que atuam na síntese de polipeptídios, se ligando de forma reversível ou irreversível, a subunidades ribossomos (DAVIES & WRIGHT, 1997). À medida que as AgNPs são capazes de interagir com estes antimicrobianos, e além disso, com as estruturas externas bacterianas, como membrana externa e parede celular, resultando na formação de poros nestas estruturas (SONDI & SALOPEK-SONDI, 2004) , sugere-se que as AgNPs possam atuar com facilitadores do transporte destes antimicrobianos do meio

extra para o intra celular, culminando com a atividade inibitória potencializada destas associações.

Essas ponderações poderiam ser consideradas em relação á LEV e á RIF, que atuam, também, em estruturas internas bacterianas inibindo a replicação, o metabolismo de ácidos nucléicos e a transcrição bacteriana (WANG, 1996; DRLICA & ZHAO, 1997; HOOPER; 1998; HOOPER, 2000). Desta forma, sua atividade antimicrobiana poderia ser, como já observado para outros antimicrobianos, melhorada pela associação com AgNPs.

Além disso, neste estudo, foi observado que os valores de CIM das combinações testadas de quinolonas foram diferentes se considerados os microrganismos Gram negativos e Gram positivos. Embora de forma geral as quinolonas atuem sobre a DNA girase e topoisomerase IV, estudos anteriores evidenciaram a diferença em relação ao alvo destes antimicrobianos quando comparamos diferentes bactérias. Em Gram negativos, a DNA girase foi considerada o principal alvo, sendo a atividade das quinolonas sobre a topoisomerase IV limitada (BREINES, 1997; HOOPER; 2000). Em contrapartida, em Gram positivos, a topoisomerase IV tem se mostrado o alvo principal. Desta forma, mutações em determinados alvos podem resultar em diferentes níveis de resistência, dependendo da linhagem a ser considerada, se Gram negativa ou Gram positiva FERRERO et al., 1995; YAMAGISHI et al., 1996; HOOPER; 2000).

Tal como outros β -lactâmicos, o MER é um carbapenêmico e atua inibindo o domínio peptidase das PLPs, podendo impedir a ligação cruzada de peptídeos, assim como outras reações da peptidase. Consequentemente, a camada de peptidoglicano enfraquece, resultando em lise celular ocasionada pela pressão osmótica. Os carbapenêmicos de forma geral, não são facilmente difusíveis através da parede bacteriana, todavia, nas Gram negativas esta classe de antimicrobianos consegue sobrepujar esta barreira, atravessando a membrana externa através de suas porinas (PAPP-WALLACE et al., 2011). Desta forma, a desestabilização da superfície bacteriana pela interação com as AgNPs poderia favorecer o efeito antimicrobiano aumentado destas substâncias, tal como observado para a oxacilina e o glicopeptídeo vancomicina em relação aos Gram positivos avaliados.

A oxacilina (OXA), também droga beta-lactâmica quanto a vancomicina (VAN - glicopeptídeo) são agentes de combate baseados na inibição da síntese da parede celular, além de serem utilizadas no tratamento de infecções causadas por Gram

positivos, como *S.aureus* (STUART et al., 2011). No presente estudo, para as linhagens de *S.epidermidis* e *Enterococcus faecalis* o MIC para VAN foi diminuído na associação com AgNPs na porporção de de 7 e 10 log, respectivamente. Para OXA, os MICs para as associações contra todas as linhagens testadas diminuiu 2-3 log em média, exceto para *S. epidermidis*, cuja diminuição se deu em 10 log.

Ao considerar-se a combinação de sulfametoxazol/trimetoprin (STX) com AgNPs, para os Gram positivos, foi notável a diminuição da CIM, porém o mesmo não ocorreu com os Gram negativos, para os quais a CIM permaneceu praticamente a mesma. As sulfas agem como análogas do ácido para-aminobenzóico (PABA), impedindo as vias de síntese de substâncias vitais para a célula, como o ácido fólico, por inibição competitiva. O trimetropim, por sua vez, age através de ligação reversível á diidrofolato redutase (DHFR) na mesma via de atuação das sulfas, enzima que reduz o ácido diidrofolico á ácido tetrafolico, precursor do ácido fólico. À medida que o efeito da AgNPs-SXT demonstrou maior eficácia nos Gram positivos, podemos sugerir que essa interação tenha favorecido a desestruturação da superfície desses microrganismos beneficiando preferencialmente a disponibilidade de SXT no citoplasma dos Gram positivos, já que seu mecanismo de ação é semelhante nos dois grupos microbianos avaliados.

Uma das formas mais conhecidas e mais simples para avaliar efeitos de combinações *in vitro* é através da técnica de *Checkerboard*. O termo *Checkerboard* se refere a um modelo, utilizando tubos ou placas de microtitulação, formado para testar dois agentes antimicrobianos em concentrações variadas acima e abaixo da CIM. O Índice de Concentração Fracionária Inibitória (CFI) é uma forma comum para se relatar resultados de estudos com o método *Checkerboard* e é definido como a concentração mais baixa de cada droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (TIN et al.,2009; JAYARAMAN et al, 2010)..

O método *Checkerboard*. utiliza o CIF para demonstrar quantitativamente que combinações de dois agentes podem apresentar efeitos inibitórios que são maiores (sinergismo) ou menores (antagonismo) que a soma dos seus efeitos individuais (ODDS, 2003).

Considerando as combinações envolvendo QIT e drogas antimicrobianas para os Gram negativos, a maioria das combinações apresentou efeito sinérgico para quase todas as linhagens bacterianas avaliadas, exceto para *K. pneumoniae*, quando AMI mostrou efeito indiferente.

Para os Gram positivos, exceto para as combinações OXA-QIT e VAN-QIT, para todas as outras combinações, foram encontrados efeitos sinérgicos. Para as duas combinações que foram exceção, os efeitos variaram entre indiferente e antagônico. Esse resultado não foi esperado, uma vez que nos experimentos anteriores quando a concentração das AgNPs foram fixadas, as duas combinações apresentaram 0,03µg/mL como valor da CIM.

Para os Gram negativos, todas as combinações mostraram efeito sinérgico ou aditivo, com exceção das combinações AMI-QIT-AgNPs para *K. pneumoniae* e TET-QIT-AgNPs para *E.coli*, que mostraram efeito indiferente. Para AMI, o mesmo foi encontrado quando utilizamos a combinação AMI-AgNPs.

Considerando-se os Gram positivos, quando expostos às combinações AgNPs, quitosana e drogas antimicrobianas, as combinações não mostraram efeito sinérgico ou aditivo contra *S. aureus* (OXA-QIT- AgNP) e *Enterococcus faecalis* (OXA-QIT-AgNPs e VAN-QIT-AgNPs). Estes dados sugerem que as interações entre os antimicrobianos, as AgNPs, QIT não interferem de maneira satisfatória com a parede celular bacteriana, embora isoladamente essas substâncias tem essa estrutura como alvo de ação. Por outro lado, interação positiva pode ter acontecido entre as estruturas da superfície bacteriana e antimicrobianos que possuem alvos de ação no citoplasma bacteriano, como a TET e a LEV.

De acordo com a literatura, indiferença sugere que o efeito combinado é simplesmente o efeito da droga mais ativa quando testada separadamente. Sinergismo é uma interação positiva entre dois compostos, possuindo provavelmente, como principais mecanismos: inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica; melhor penetração de um antimicrobiano como resultado da ação de outra substância na superfície celular; interação de transporte; inibição simultânea de diferentes alvos (ODDS, 2003). E o antagonismo, por outro lado, é uma interação negativa, onde os mecanismos de antagonismo são provavelmente: ações de dois antimicrobianos no mesmo sítio de ação podem resultar em baixa da habilidade do outro agente exercer sua atividade no mesmo local, ou num sítio alterado; a adsorção de um agente na superfície microbiana inibe a ligação de outro agente no sítio de ação; modificação de um alvo após a prévia exposição a outro agente (ODDS, 2003).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da análise dos resultados encontrados para as combinações entre QIT e drogas antimicrobianas, e AgNPs, QIT e drogas antimicrobianas, para todas as drogas testadas, a CIM diminuiu, sendo considerada em seu menor valor nestes experimentos. Como não houve crescimento bacteriano detectável, mesmo para a menor concentração de antimicrobiano que pudesse ser comparado ao controle positivo, a CIM foi considerada, então, a menor concentração obtida. Assim, a obtenção de concentrações finais de substâncias antimicrobianas nos sistemas teste menores que $0,03\mu\text{g/mL}$ figura como uma grande limitação deste trabalho.

Uma vez que ambos os compostos (AgNPs e QIT) tem sua atividade antibacteriana baseada em ruptura das estruturas externas bacterianas com a formação de poros, nossos resultados corroboram com o esperado, sendo as combinações ATB-QIT-AgNPs mais eficazes. Entretanto, são essenciais estudos prospectivos direcionados á elucidação das interações que ocorrem entre estes compostos, quando em combinação com os antimicrobianos nas células bacterianas.

Além disso, a utilização de outras técnicas microbiológicas de avaliação da susceptibilidade bacteriana a estas substâncias podem confirmar os dados obtidos, considerando-se as sugestões de que em meio sólido os valores de CIM podem ser alterados. A síntese química destas substâncias em maiores quantidades para avaliação da susceptibilidade bacteriana por técnicas de diluição em ágar destaca-se como limitação para estes experimentos.

De maneira geral, os resultados obtidos neste estudo corroboram com as sugestões sobre o uso de nanopartículas metálicas, particularmente AgNPs, como componentes do arsenal terapêutico antimicrobiano. A sua utilização combinada a QIT e drogas antimicrobianas pode resultar em novas abordagens de utilização de substâncias já instituídas, resultando em ganhos biológicos, dada sua toxicidade seletiva e propriedades farmacológicas, além de ganhos econômicos, dada a tecnologia já empregada na sua produção em larga escala.

8 CONCLUSÕES

- Apesar de as nanopartículas de prata sintetizadas possuírem atividade antibacteriana contra Gram positivos e Gram negativos, a quitosana mostra-se mais eficaz considerando-se esse efeito biológico;
- A associação entre nanopartículas de prata e quitosana mostra-se mais eficaz no controle da população bacteriana, *in vitro*, do que os mesmos compostos isoladamente;
- A associação de antimicrobianos com nanopartículas de prata e quitosana potencializa o efeito antibacteriano de drogas já instituídas no arsenal terapêutico de maneira aditiva ou sinérgica, dependendo da sua estrutura química e propriedades antimicrobianas;
- O efeito biológico da interação entre nanopartículas de prata e quitosana, ou sua associação com drogas antimicrobianas, não é homogêneo ao considerarem-se bactérias Gram positivas ou Gram negativas, e se apresenta ainda diverso entre espécies dentro de um mesmo grupo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S.A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVIET, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release, 100**: 5 –28.

AIDER, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT - Food Science and Technology, 43**: 837–842.

ALANIS, A.L. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Research, 36**: 697-705.

ALLEN, H.K; DONATO, J.; WANG, H.H.; CLOUD-HANSEN, K.A; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology, 8**: 251-259.

AMRO, N.A; KOTRA, L.P; WADU-MESTHRIGE, K.; BULYCHEV, A.; MOBASHERY, S.; LIU, G. 2000. High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. **Langmuir, 16**: 2789-2796.

ASM.2009. Antibiotic Resistance: An Ecological Perspective on an Old Problem. 32p.

ATIYEH, B.S.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, S.N.; DIBO, S.A. 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing:Review of the literature. **Burns, 33**: 139-148.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G.Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **PNAS, 101 (44)**: 15718-15723.

BARTNICKI-GARCÍA, S.; PERSSO, J. CHANZY, H. 1994. Na électron microscope and électron diffraction study of the effect of calcofluor and Congo red on the biosynthesis of chitin. **Arch Biochem Biophys**, **310**: 6-15.

BIRLA, S.S.; TIWARI, V.V.; GADE, A.K.; INGLE, A.P.;YADAV, A.P.; RAI, M.K. 2009. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**: 173-179.

BOYD, E.F. Bacterial factors encoded by mobile and integrative genetic elements in enteric pathogens. In: Shah M. Faruque (editor). Foodborne and waterborne bacterial pathogens: epidemiology, evolution and molecular biology. **Horizon Scientific Press**, 2012 . 289-318.

BREINES, D.M.; OUABDESSELAM, S.,EY, N.G. et al. 1997. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. **Antimicrob Agents Chemother**, **41**:175–179.

CARUTHERS, S.D.; WICKLINE, S.A.; LANZA, G.M. 2007. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, **18**: 26–30.

CHO, KH.; PARK, JE.; OSAKA, T.; PARK, SG. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. **Electrochimica Acta**, **51**: 956-960.

CHOPRA, I. 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **59**: 587-590.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2009. M07–A8. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard: 8th ed. CLSI, Wayne, PA.

CLEMENT, J.L.; JARRETT, P.S. 1994. Antibacterial Silver. **Metal Based Drugs Restyled and Resumed** , 1 (5-6): 467-482.

COURROL, L.C.; MONTEIRO, A.M.; SILVA, F.R.O.; GOMES, L.; VIEIRA JR.,N.D.; GIDHAND, M.A.; FIGUEIREDO NETO, A.M. 2007. **Optics Express**, 15 (11): 7066-7074.

COURVALIN, P. 1994. Transfer of Antibiotics Resistance Genes between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 38:1447-1451.

DAHLÉN, G. 2009. Bacterial infections of the oral mucosa. **Periodontology 2000**, 49: 13-38.

DALE, C.; MORAN, N.A. 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. **Cell**, 126: 453-465.

DAVIES, J.; WRIGHT, G.D. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends in Microbiology**, 5 (6): 234-240.

DINIZ, C. G.; ARANTES, R. M.; CARA, D. C.; LIMA, F.I.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L.M. 2003. Enhanced pathogenicity of susceptible strains of the *Bacteroides fragilis* group subjected to low doses of metronidazole. **Microbes & Infection**, 5 (1): 19-26.

DINIZ, C.G.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; ROCHA, E.R.; SMITH, C.J. 2004. Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole resistant mutant. **The Journal of Antimicrobial Chemother**, 54: 100-108.

DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. 2004. Genomic island in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, 2: 414-424.

DRLICA, K.; ZHAO, X. 1997. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **61 (3)**: 377-392.

DURBÁN, A.; ABELLÁ, J.J.; JIMENEZ- HERNÁNDEZ, N.; LATORRE, A.; MOYA, A. 2012. Daily follow-up of bacterial communities in the human gut reveals stable composition and host-specific patterns of interaction. **FEMS Microbiology Ecology**, **81**: 427–437.

ESPINOSA-CRISTOBAL, L.F.; MARTINEZ-CASTANÓN, G.A.; MARTINEZ-MARTINEZ, R.E.; LOYOLA-RODRIGUES, J.P. PATIÑO-MARÍN, N.; REYES-MACÍAS, J.F.; RUIZ, F. 2009. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. **Materials Letters**, **63**: 2603-2606.

FERRERO, L.; CAMERON, B.; CROUZET, J. 1995. Analysis of *gyrA* and *griA* Mutations in Stepwise-Selected Ciprofloxacin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**: **39 (7)**: 1554–1558

GABRIELSON, J.; HART, M., JARELOV, A., KUHN, I., MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods** **50**: 63 – 73.

GADE, A.; INGLE, A.; WHITELEY, C.; RAI, M. 2010. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. **Biotechnology Letters**, **32 (5)**: 593-600.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; ANIKET, G.; RAI, M. 2009. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** **5**: 382–386.

GWYNN, M.N.; PORTNOY, A.; RITTENHOUSE, S.F.; PAYNE, D.J. 2010. Challenges of antibacterial discovery revisited. **Antimicrobial Therapeutics Reviews**, **1213**: 5-19.

HOOPER, D. C. 1998. Bacterial Topoisomerases, Anti-Topoisomerases, and Anti-Topoisomerase Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, **27(1)**:54–63.

HOOPER, D.C. 2000. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases** **31(2)**:24–28.

HOPPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient intestine. **Annual Review of Nutrition**. **22**: 283-307.

HOUNDT, T.; OCHMAN, H. 2000. Long-term shifts in patterns of antibiotic resistance in natural populations of enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**: 5406-5409.

HUSSAIN, I.; BRUST, M.; PAPWORTH, A.J.; COOPER, A.I. 2003. Preparation of Acrylate-Stabilized Gold and Silver Hydrosols and Gold-Polymer Composite Films. **Langmuir**, **19**: 4831-4835.

IOM (Institute of Medicine). 2010. Antibiotic resistance: Implications for global health and novel intervention strategies. Washington, DC. **The National Academies Press**, 1-38.

JACKSON, R.W.; JONHSON, L.J.; CLARKE, S.R.; ARNOLD, D.L. 2011. Bacterial pathogen evolution: breaking news. **Trends in Genetics**, **27**: 32-40.

JAIN, K.K. 2008. Nanomedicine: Application of Nanobiotechnology in Medical Practice. **Medical Principles and Practices**, **17**: 89-101.

JAYARAMAN, P., SAKHARKAR, M.K; LIM, C.S.; TANG, T.H., SAKHARKAR, K.R. 2010. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International Journal of Biological Sciences* 6, (6): P.556-568.

JETERS, R.T.; WANG, G.R.; MOON, K.; SHOEMAKER, N.B.; SALYERS, A.A. 2009. Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. **Journal of Bacteriology**, **191 (20)** : 6374–6382.

JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITLEMAN, J.L.; DASZAK, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, **451**: 990–993.

JONES, C.M.; HOEK, E.M.V. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, **12** : 1531-1551.

JOUMAA, N.; TOUSSAY, P.; LANSALOT, M.; ELAISSARI, A. 2008. Surface modification of iron oxide nanoparticles by a phosphate-based macromer and further encapsulation into submicrometric polystyrene particles by miniemulsion polymerization. **Journal of Polymer Science, Part A-1, Polymer Chemistry**, **46**: 327-40.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. 2007. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, **622**: 58-69.

KENDRA, D.F.; HADWIGER, L.A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. **Experimental Mycology**, **8**: 276–281.

KIM, H.J.; CHEN, F.; WANG, X.; RAJAPAKSE, N.C. 2005. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **53**: 3696–3701.

KIM, J.S.; KUK, E.; YU, K.N.; KIM, J.H.; PARK, S.J.; LEE, H.J.; KIM, S.H.; PARK, Y.K.; PARK, Y.H.; HWANG, C.Y.; KIM, Y.K.; LEE, Y.S.; JEONG, D.H.; CHO, M.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, **3**: 95-101.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology** **144**: 51–63.

KVITEK, L.; PANÁČEK, J.; SOUKUPOVA, M.; KOLAR, R.; VECEROVA, R., PRUCEK, M.; HOLECOVA, R.; ZBORIL, R. 2008. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry C**, **112**: 5825-5834

LEEBER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, **8**: 171-184.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, **444**: 1022–1023.

LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D.Y.; BRUNET, L.; LIGA, M.V.; LI, D.; ALVAREZ, P.J.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, **42**: 4591-4602.

LI, W.R.; XIE, X.B.; SHI, Q.S.; ZENG, H.Y.; OU-YANG, Y.S.; CHEN, Y.B. 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **85**: 1115–1122.

LI, W.R.; XIE, X.B.; SHI, Q.S.; DUAN, S.S.; OUYANG, Y.S.; CHEN, Y.B. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Biometals**, **24** (1): 135-141.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, **95**: 147-155.

LIVERMORE, D. M.; MUSHTAQ, S.; JAMES, D. ; POTZ, N.; WALKER, R. A.; CHARLETT, A.; WARBURTON, F.; JOHNSON, A. P.; WARNER, M.; HENWOOD, C. J. 2003. In vitro activity of piperacillin /tazobactam and other broad-spectrum

antibiotics against bacteria from hospitalized patients in British Isles. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **22**: 14-27.

LOK, CN.; HO, CM.; CHEN, R.; HE, Q.Y.; YU, WY.; SUN,H.; TAM, P.KH.; CHIU, JF.; CHE, CM. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **12**: 527-534.

LORIAN, V.;GEMMEL, C. 1994. Effect of low antibiotic concentrations on ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefences. **Antibiotics and Laboratory Medicine**, **3**:493–555.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G.A.; NIÑO-MARTÍNEZ, N.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, F.; MARTÍNEZ-MENDOZA, J.R.; RUIZ, F. 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. **Journal of Nanoparticles Research**, **10**: 1343-1348.

MINDLIN, S.Z.; PETROVA, M.A.; BASS, I.A.; GORLENKO, Z.M. 2006. Origin, Evolution, and Migration of Drug Resistance Genes. **Russian Journal of Genetics**, **42**: 1257-1271.

MULDER, I. E.; SCHMIDT, B.; STOKES, C.R.; LEWIS, M.; BAILEY, M.; AMINOV, R.I.; PROSSER, J.I.; GILL, B.P.; PLUSKE, J. R.; MAYER, CD.; MUSK, C.C.; KELLY, D. 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. **BMC Biology**, **7**: 79.

NIKAIDO, H. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, **78**: 119-146.

O'BRIEN, T.F. 2002. Emergence, spread and environmental effects of antimicrobial resistance: How use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infection Diseases**, **34** (Suppl 3): 78-84.

ODDS, F.C. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **52** (1p).

PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; KOLÁŘ, M.; VERCENOVA, R.; PIZURÓVA, N.; SHARMA, V. K.; NEVECŇA, T.; ZBOEIL, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B (ACS Publications)**, **110**: 16248–16253.

PAPP-WALLACE, K.M.; EDIMIANI, A.; TARACILA, M.A.; BONOMO, R.A. 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. **Antimicrobials Agents Chemother.** **55(11)**:4943 – 4960.

PASTORIZA-SANTOS, L.; LIZ-MARZÁN, L.M. 2002. Synthesis of Silver Nanoprisms in DMF. **Nano Lett**, in press.

PERCIVAL, S.L.; BOWLER, P.G.; RUSSEL, D. 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. **Journal of Hospital Infection**, **60**:1-7.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUGUMAM, M.; BURGDÖG, K.S.; MANICHANHS, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MEDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H.B.; PELLETIEN, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNA, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; MetaHIT Consortium; BORK, P.; ERLICH, S.D.; WANG, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, **464**: 59-65.

RABEA, E.I.; BADAWEY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAULT, W. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromolecules**, **4 (6)**: 1457-1465.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, **1**: 76-78.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S.; SARAF,S. 2006. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin** , **29** (9): 1790-1798.

RINAUDO, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, **31**: 603-632.

ROSEBURY, T. 1962. Microorganisms Indigenous to Man. **Mcgraw-Hill, New York**.
SAMUEL, U.; GUGGENBICHLER, J.P. 2004. Prevention of catheter-related infections: The potential of a new nano-silver impregnated catheter. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **23**: 75-78.

RUIZ- HERRERA, J.; VO, S.; VAN DER WOUDE, W.K.; BARTNICKI-GARCIA, S. 1975. Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. *Proc Nat Acad Sci* **72**:2706–10.

SAMUEL, U.; GUGGENBICHLER, J. P. 2004. Prevention of cath eter-related infections : the potencial of a new nano-silver impregnated catheter. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **23S1**: S75-S78.

SANTOS, K.V.; NICOLI, J.R.; MARTINS, W.A.;COUTINHO, S.C.;APOLÔNIO, A.C.M.; DINIZ, C.G.; CARVALHO, M.A.R.;FARIAS, L.M. 2007. Comparative activity of ertapenem and piperacillin tazobactam in a murine systemic infection model with *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, **56**:1576-1579.

SANTOS, K.V.; CARVALHO, M.A.R.;MARTINS, W.A.; COUTINHO, S.C.; BAHIA, J.L; ANDRADE, J.P.L.; APOLONIO, A.C.M.; CARA, D.C.; DINIZ, C.G.; NICOLLI, J.R.; FARIAS, L.M. 2010. In vitro selection of ertapenem and piperacillin/tazobactam-resistant strains of *Bacteroides fragilis* and analysis of their virulence in gnotobiotic mice. **Journal of Chemotherapy**, **22(4)**:259-63.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its

application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, **42**: 321-324.

SCHIMIEDER, R.; EDWARDS, R. 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future Microbiology**, **7(1)**: 73–89.

SCHREURS, W.J.A.; ROSENBERG, H. 1982. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, **152**: 7–13.

SHAHVERDI, A.R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H.R.; MINAIAN, S. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine** **3(2)** : 168-171.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, **145**: 83-96.

SHLAES, D.M.; MOELLERING, R.C. 2002. The United States Food and Drug Administration and the end of antibiotics. **Clinical Infection Disease**, **34**: 420–422.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, **18**: 225103 (9pp).

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *Escherichia coli* as a model for gram-negative bacteria. **Journal of Colloid Interface Science**, **275 (1)**: 177–182.

SUGANO, M.; YOSHIDA, K.; HASHIMOTO, M.; ENOMOTO, K.; HIRANO, S. 1992. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosan in rats. In: Brine, C.J., Sandford, P.A., Zikakis, J.P. (Editores), *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier, London, 472–478

SPELLBERG, B. 2009. The antibacterial pipeline: why is it drying up, and what must be done about it? Antibiotic resistance: Implications for global health and novel intervention strategies. Washington, DC: **The National Academies Press**, 326-360.

STUART, J.J.; JONH, M.A; MILBURN, S.; DIAGRE, D. 2011. Susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci to several newer antimicrobial agents in comparison with vancomycin and oxacillin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **37 (3)**: 248–252.

THEURETZBACHER, U. 2009. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn? **International Journal of Antimicrobial Agents**, **34** : 15–20.

TIN, S.; SAKHARKAR, K.R.; LIM, C.S.; SAKHARKAR, M.K. 2009. Acitivity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. **Internacional Journal of Biological Sciences**, **5 (2)**: 153-160.

TOFT, C.; ANDERSSON, S.G.E. 2010. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. **Nature Reviews Genetics**, **11**: 465-475.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, **444**: 1027-1031.

VIMALA, K.; MOHANA, M.; SIVUDUA, K.S.; VARAPRASADA, K.; RAVINDRAA, S.; REDDYA, N.N., PADMAB, Y.; SREEDHARC, B.; RAJUA, K.M. 2010. Preparation of Acrylate-Stabilized Gold and Silver Hydrosols and Gold-Polymer Composite Films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, **11**: 1–9.

WAGNER, V.; DULLAART, A.; BOCK, A.K.; ZWECK, A. 2006. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, **24**: 1211-1217.

WANG, J.C. 1996. DNA Topoisomerases. **Annual Reviews Biochemistry**, **65**: 635-692.

WITTE, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **14**: 321-325.

YAMADA, K.; AKIBA, Y.; SHIBUYA, T.; KASHIWADA, A.; MATSUDA, K.; HIRATA, M. 2005. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. **Biotechnology Progress**, **21**: 823–829.

YAMAGISHI, J.; KOJIMA, T.; FUJIMOTO, K.; HATTORI, S. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemother**, **40 (5)**: 1157 – 1163.

YANG, T.C., CHOU, C.C., LI, C.F., 2005. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **International Journal of Food Microbiology**, **97**: 237–245.

YOUTIE, J.; PORTER, A.; SHAPIRA, P.; TANG, L.; BENN, T. 2011. The Use of Environmental, Health and Safety Research in Nanotechnology Research.