



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

DOUGLAS REIS RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE
CARBONO ASSOCIADAS COM CIPROFLOXACINO**

BRASÍLIA, 2020



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

DOUGLAS REIS RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE
CARBONO ASSOCIADAS COM CIPROFLOXACINO**

Monografia de Conclusão de
Curso apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Farmacêutico,
na Universidade de Brasília, Faculdade
de Ceilândia.

Orientadora: Luana Maria Magalhães de Souza Brandão

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, 2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ra REIS RODRIGUES DA SILVA, DOUGLAS
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS
DE CARBONO ASSOCIADAS COM CIPROFLOXACINO / DOUGLAS REIS
RODRIGUES DA SILVA; orientador LUANA MARIA MAGALÃES DE
SOUZA BRANDÃO; co-orientador IZABEL CRISTINA RODRIGUES DA
SILVA. -- Brasília, 2020.
23 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de
Brasília, 2020.

1. NANOCARBONOS. 2. RESISTÊNCIA BACTERIANA. 3. TESTE DE
MICRODILUIÇÃO EM CALDO. I. MAGALÃES DE SOUZA BRANDÃO, LUANA
MARIA, orient. II. RODRIGUES DA SILVA, IZABEL CRISTINA, co
orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, especialmente minha mãezinha que Deus a tenha, e minha madrinha que sempre me apoiou em minhas escolhas e fez de tudo para que eu conseguisse estudar, desde quando vim do interior do Tocantins, fez tudo que podia para pagar meu curso e dar-me do bom e do melhor.

Agradeço também a minha mãezona de UnB, professora Izabel, por ter acolhido mesmo com os erros desde Estatística Aplicada, daí por diante o destino já estava traçado, você era quem me colocaria nos eixos, dando bronca, puxando a orelha quando precisava, mas sempre do lado até no momento de maior tristeza, você se deslocou para longe só para me dar um abraço.

À minha orientadora Luana, por ter aceitado me orientar como seu primeiro pupilo, ajudando de todas as formas possíveis para o desenvolvimento deste trabalho, pela sua paciência e sempre motivando quando precisava, falando que no final tudo daria certo mesmo com erros.

Ao professor Daniel, da Faculdade LS, pelo auxílio para a realização dos experimentos os quais deram origem a este trabalho. Agradeço também meus companheiros de laboratório, pela ajuda que sempre me proporcionou.

Aos professores da Universidade de Brasília, que tive a experiência de ser seu aluno, por todos os conhecimentos e ensinamentos os quais levaram a um amadurecimento tanto pessoal quanto profissional, especialmente ao professor Paulo Barboni que do seu jeito brincalhão estava ali para ajudar.

Meus amigos nesta grande jornada por todos os momentos que passamos juntos, congressos, viagens, saidinhas rápidas, conversas, risadas e todo o apoio nos momentos bons e ruins que passamos durante esses anos de graduação. Cada palavra amiga faz a diferença, mostrava que se importavam, sabia se estava bem ou não, porque cada um completava e entendia o outro, sempre juntos!

Agradeço também aos meus amigos Lucas e Francielly, por todos os momentos e apoio mesmo quando eu não acreditava, estavam sempre ali pra conversar, apoiar e falar que eu era capaz.

Por fim agradeço a Universidade de Brasília, por ter me proporcionado viver essa experiência, que foi à graduação. Cada momento vivido me transformou como pessoa e assim como futuro profissional da saúde. Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Aqueles que rompem as regras são escórias, é verdade. Mas aqueles que abandonam seus amigos são piores que a escória.”

Kakashi Hatake

BRASÍLIA, 2020

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características gerais das cepas de E. coli.....	9
TABELA 2: Testes em Placas de 96 poços.....	15

LISTA DE ABREVIações

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

ATCC - American Type Culture Collection

CLSI - Clinical & Laboratory Standards Institute

CIM – Concentração inibitória mínima

CBM - Concentração bactericida mínima

SUS – Sistema Único de Saúde

MG – Micrograma

ISO – International Organization for Standards

CVI – Complexo violeta-iodo

S. Aureus - *Staphylococcus aureus*

Cip – Ciprofloxacino

C-dots – Carbon Dots

E. coli – *Escherichia coli*

RESUMO

A resistência a agentes antimicrobianos é um problema de saúde pública, por gerar inúmeros gastos com internações hospitalares com tratamento de infecções com variáveis níveis e tratamentos, sejam elas de origem bacteriana, fúngica ou viral. A necessidade urgente de sínteses de novas moléculas ou modificações de estruturas já com arranjo e atividade farmacológica definidas e de uso convencional, vem sendo problemática de diversos cientistas e indústrias farmacêuticas. A nanotecnologia surge como uma promissora alternativa para suprir a demanda de novos fármacos, oferecendo mecanismos de acoplamento, sistema de entrega de fármacos ou novas formulações e formas de administração. O presente estudo teve por intuito usar nanopartículas acopladas com o Ciprofloxacino, um agente antimicrobiano de amplo espectro de ação. Onde o sistema nanopartícula-fármaco classifica-se como sistema de distribuição de fármacos. A atividade terapêutica baseou-se no método de microdiluição em placa, testado em dois tipos de bactéria, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados foram descritos em termos de porcentagem de inibição, considerando a fração da leitura do poço testado e o controle de crescimento. Para o cálculo da concentração mínima inibitória (CIM), a metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal foi executada sobre a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações, via programa GraphPrism versão 7.0. Obteve-se então resultados satisfatórios tanto para bactérias gram positivas como gram negativas. Comprovando até o presente momento, por testes *in vitro*, a eficácia da nanopartícula no direcionamento do fármaco de escolha em atividade antimicrobiana e farmacocinética por apresentar uma diminuição da quantidade dose-resposta do fármaco necessária para inibição do crescimento microbiano.

Palavras-chave: Nanopartículas; Ciprofloxacino; Nanotecnologia.

ABSTRACT

Resistance to antimicrobial agents is a public health problem, as it generates expenses with hospital admissions for the treatment of diseases with variables and treatments, whether they are of bacterial, fungal or viral origin. The urgent need for synthesis of new molecules or modifications of structures with already defined and pharmacological arrangements and conventional use has been problematic for several scientists and pharmaceutical industries. Nanotechnology emerges as a promising alternative to supply the demand for new drugs, coupling mechanisms, drug delivery system or new formulations and forms of administration. The present study aimed to use nanoparticles coupled with Ciprofloxacin, an antimicrobial agent of wide range spectrum of action. Where the nanoparticle-drug system is classified as a drug distribution system. The therapeutic activity was based on the microdilution plate method, tested on two types of bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results were gained in terms of percentage of inhibition, considering the fraction of the reading of the tested well and the growth control. For the calculation of the minimum inhibitory concentration (MIC), the methodology of adjustment to the response-sigmoidal dose curve was performed on the percentage of inhibition in different needs, via the program GraphPrism version 7.0. Satisfactory results were then obtained for both gram positive and gram negative bacteria. Proving to date, through in vitro tests, the effectiveness of the nanoparticle in directing the drug of choice in antimicrobial and pharmacokinetic activity as it presents a decrease in the dose-response amount of the drug necessary to inhibit microbial growth.

Keywords: Nanoparticles; Ciprofloxacin; Nanotechnology.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica:.....	2
3. Antimicrobianos e Possíveis Problemas de Saúde.	4
4. Resistência Bacteriana	7
5. Escherichia coli e Staphylococcus aureus.....	9
6. Nanopartículas como Antimicrobianos.....	11
7. Quinolonas e seu representante Ciprofloxacino.....	12
8. Justificativa	14
9. Objetivos.....	14
9.1Objetivos específicos.....	14
10. Metodologia	15
11. Microdiluição em placa de 96 poços	15
11.1Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	15
12. Resultados e Discussão	16
13. Conclusão.....	18
14. _ Referências Bibliográficas.....	20

1. Introdução

A nanotecnologia consiste na aplicação de insumos ou processos em que ao menos um de seus componentes possui uma de suas dimensões na escala nanométrica, ou seja, entre um e 100 nanômetros, propiciando a manipulação de qualquer material reduzido a essa escala, surgindo novos materiais em qualquer área econômica, influenciando a economia mundial (CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTI, Valtencir., 2014).

Muitos estudiosos consideram essa tecnologia como constituinte da Quarta Revolução Industrial, pois essa tecnologia faz parte de uma evolução tecnológica tão significativa que representa, juntamente com outras tecnologias, alterações históricas inimagináveis como em relação ao tamanho diminuto, à velocidade do desenvolvimento dessas novas tecnologias e ao elevado grau de complexidade devido aos diferentes agentes envolvidos nesse processo, como as universidades, pesquisadores, fabricantes, governos e a sociedade em geral, através de grupos de interesses (CRUZ, Cleide Ane Barbosa da et al., 2016)

Recentemente a indústria farmacêutica começou a se movimentar em favor de novas pesquisas, para incorporar competências na produção de medicamentos com uso de nanomateriais/nanopartículas. Uma incorporação, embora complexa, se torna fundamental para a manutenção de sua competitividade no médio e longo prazo, principalmente em face da perspectiva de aumento da concorrência e de redução das margens no segmento de genéricos graças a avanços tecnológicos (ODA et al., 2010).

O avanço de diversas técnicas de biotecnologia, nas últimas décadas, foi capaz de desvendar diversos processos biológicos em nível molecular, podendo assim, ser capaz de realizar reprodução artificial e ou modificada de processos, que antes eram restritos a modelos naturais. Não se sabe ainda, se a biotecnologia substituirá totalmente a síntese química como plataforma tecnológica para desenvolvimento e produção na indústria farmacêutica, mas não podemos descartar sua importância para o setor (SILVA, Ana Carolina Costa da., 2015).

Setor esse que fez com que o interesse em novas pesquisas, tanto na área da nanociência quanto na nanotecnologia. Cabe ressaltar que políticas que envolvam Ciência e Tecnologia vêm sendo discutidas no mundo todo criando novas propostas de pesquisas para que problemas globais sejam resolvidos, podemos destacar como problema, a resistência bacteriana que vem reduzindo com o uso de novas tecnologias, testes para novos fármacos ou melhoramento dos que estão hoje nas indústrias (REIS; CARLA., 2009).

A nanociência estuda o comportamento dos átomos, moléculas e estrutura em escala nanométrica, enquanto a nanotecnologia viaja na manipulação da matéria no nível atômico e molecular, permitindo a produção ou modificação de produtos antes observados em uma escala micro ou macroscópicas (DIMER, Frantiescoli Anversa et al., 2013).

A European Medicine Agency considera na área da saúde o uso de estruturas menores que 1000 nanômetros de diâmetro, são as nanopartículas formadas pelos átomos de carbono, como o fulereno, os grafenos e as nanofibras de carbono, além dos lipossomas, nanoemulsões, dentre outras essas estruturas podem ter propriedades específicas ou serem usadas somente como carregadores. Na nanotecnologia farmacêutica ou nanomedicina visa a produção de nanomedicamentos que ofereçam vantagens aos homólogos, tendo principalmente seu tamanho reduzido, para um chegar mais rápido ao alvo celular e passar os sistemas biológicos mais facilmente. (Shi, J. et al., 2010).

Na obtenção de formulações usando as nanotecnologias devem-se seguir alguns critérios, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, conjugação, capacidade para funcionalização de superfície complexação e encapsulamento. Podendo usar diferentes mecanismos de encapsulação, os quais incluem solubilização ou retenção na nanopartícula, conjugação ou adsorção (Durán,N.; Durán,M.; Tasic, L.; Marcato, P. D., 2010).

O uso associado a agentes terapêuticos podendo ser encapsulados, ligados covalentemente ou adsorvidos sobre os nanomateriais, dando origem aos chamados materiais teranósticos (que servem para terapia e diagnóstico ao mesmo tempo). Essas abordagens podem facilmente resolver questões de solubilidade e biodispersão de muitos ativos, os nanomateriais ainda podem ser encapsulados com fármacos funcionando como agente de direcionamento (Durán,N.; Durán,M.; Tasic, L.; Marcato, P. D., 2010).

2. Revisão Bibliográfica

A nanotecnologia, hoje citada em diversos artigos e publicações, teve o marco principal sua utilização pelos antigos egípcios, pela sua aplicação de técnicas de fermentação; no século XIX Mendel, por meio do uso da biotecnologia conseguiu demonstrar as características de hereditariedades (COLLINS, Klaus; John., 2013).

Os doutores Avery MacLeod e McCarty em 1944 identificaram o DNA como material genético, mas o marco principal da biologia molecular veio cerca de 10 anos após, com a elucidação da estrutura helicoidal do DNA em 1953, por Watson e Crick. As aplicações dessas descobertas foram utilizadas quase meio século depois de estudos, no qual a indústria farmacêutica, na década de 80 revolucionou o tratamento para diabetes com o uso de insulina humana (ODA et al., 2010).

A área da nanotecnologia está incluída em vários campos de pesquisa como a biologia molecular e a nanotecnologia. De acordo com a *International Organization for Standards* (ISO), a nanotecnologia é definida como a aplicação científica relacionada à manipulação e controle de matéria em escala nanométrica, entre 1 a 100nm. É a capacidade de manipular e reestruturar a matéria em níveis atômicos, moleculares ou macromoleculares. A respeito de manipular, se inclui o processo de síntese dos nanomateriais (ISO TS 80004-1., 2015).

O uso de nanopartículas vem revolucionando pesquisas científicas, a nova aplicação apresenta o nanomaterial como um dispositivo promissor na área da saúde, em especial para a indústria farmacêutica, através da conjugação de nanopartículas com fármacos convencionais. Essa conjugação apresenta como vantagem a possibilidade de utilizar menores concentrações de fármacos convencionais, essas já determinadas para alcance e eficácia terapêutica, e com isso apresentar melhorias nas etapas farmacocinéticas e farmacodinâmicas por representar a chance de oferecer menor efeito adverso, menor gastos para o tratamento e ser uma ferramenta de escolha para microrganismos de resistência. Além das vantagens relacionadas a síntese e rearranjo de fármacos convencionais, a nanopartícula é capaz de romper a membrana celular, interagir com DNA ou proteínas podem produzir indiretamente espécies reativas de oxigênio, um feito dessas nanopartículas conjugadas ou a nanomateriais, auxiliando na diminuição resistência bacteriana (Jorg Kreuter., 2014).

Antibióticos podem ser caracterizados como uma substância sintética ou natural capaz, de inibir o crescimento ou matar bactérias e fungos, sendo classificados como bactericidas e bacteriostáticos, no qual podem inibir o crescimento microbiano ou

causar a morte respectivamente, podendo ser de diversas classes como os inibidores de betalactamases, e penicilinas (MELNICK; Adelberg., 2010).

A identificação do tipo de patógeno ajuda na melhor escolha do tratamento, ou seja, classe terapêutica com o espectro de ação e eficácia. Em infecções do trato urinário, o patógeno responsável por mais de 50% dos casos é a *Escherichia coli*, bacilo gram negativo da família das Enterobactérias anaeróbias, normalmente encontrada no intestino, mas pode colonizar também outros tecidos ou sistemas, incluindo o trato urinário, devido à proximidade anatômica com o canal retal (MANDAL, Jharna et al., 2015).

Espécies do gênero *Staphylococcus* vivem como comensais em diversos sítios anatômicos de humanos e outros animais, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie de maior importância médica. Este microrganismo pode ser componente da microbiota normal da pele e membranas mucosas humanas, em especial a mucosa nasal. *S. aureus* é um coccus gram positivo é patógeno oportunista capaz de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano e está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, constituindo-se em uma das principais causas de infecções adquiridas tanto na comunidade como em ambiente hospitalar. O desenvolvimento das doenças causadas por *S. aureus* está associado, além das características do hospedeiro, com a expressão de fatores de virulência que permitem colonização persistente, disseminação no hospedeiro e a evasão do sistema imunológico. O conjunto de fatores de virulência necessários para causar a doença depende do local da infecção, e este pode ser determinante na disseminação da bactéria (ALMEIDA, Maria et al., 2017).

3. Antimicrobianos e Possíveis Problemas de Saúde.

Um problema de saúde pública associado a diversos fatores e fasciculado entre os sistemas de saúde de todo o mundo, sendo a resistência bacteriana listada pela World Economic Forum Global Risks como uma das grandes ameaças à saúde humana (BLAIR et al., 2015). Os mecanismo de ação dos antimicrobianos são estudados e aprimorados a décadas, porém os microrganismos acham diversas maneiras para inativá-los ou escapar desses, como a inibição produção de enzimas para destruição ou inibição de partes do agente antimicrobiano, como por exemplo a produção de betalactamases que é capaz de quebrar o anel betalactâmico da classe de antibióticos betalactâmicos. Com o uso indiscriminado dos antimicrobianos esses mecanismos de resistência só vêm aumentando, por isso estratégias que envolvam equipes de saúde é

relevante para o controle de todos antimicrobianos (SCHERER, Carolina Boesel; BOTONI, Larissa Silveira; COSTA-VAL, Adriane Pimenta., 2016).

Tornando-se relevante considerar de forma multidisciplinar o maior número possível de pontos estratégicos de ação, contemplando desde a natureza das doenças infecciosas, os procedimentos farmacoterapêuticos existentes, os fatores ambientais, políticos e socioeconômicos pertinentes à questão, visto que não há uma solução definitiva para a resistência microbiana em função da dinamicidade da evolução biológica dos organismos vivos (DA COSTA, A. L. P., JUNIOR, A. C. S. S., 2017).

Toda infecção acontece após um agente biológico aderir-se, invadir e esquivar-se das defesas imunológicas do hospedeiro e, com sucesso colonizar seus tecidos, ocorrendo a doença em função de lesões causadas pelo agente aos tecidos e órgãos do hospedeiro que sistemicamente terá comprometida todas as funções fisiológicas, caso não disponha de meios de defesa e proteção contra os patógenos que nele tentaram se estabelecer e dele obter nutrientes e condições fisiológicas desejadas (da Costa, A. L. P., & Junior, A. C. S. S., 2017).

Manifestando-se a doença através de sinais e sintomas, em períodos classificados em: (incubação, prodrômico, transmissibilidade e coalescência. Que são diferenciados pela biologia de cada patógeno e sua relação com o hospedeiro. Neste contexto, o planejamento, organização e execução de ações educativas de saúde, contenção e preventivas da disseminação de patógenos resistentes ou não em ambientes hospitalares, laboratoriais, ambulatoriais e domésticos depende do reconhecimento dos períodos da doença citados acima (Angles, E., 2018).

Assim como as fontes de infecção, todos os hospedeiros e meios que possam manter um agente infeccioso viável e apto para infectar novos hospedeiros. As vias de eliminação, ou seja, as formas pelas quais podem ocorrer a saída de um agente infeccioso a partir de uma fonte de infecção, como por exemplo, as secreções naso-buco-faríngeas, as fezes, urina, sangue, escarro, exsudatos, descargas purulentas, descamações epiteliais, o suor, o leite materno e outras vias como a placentária e a via sexual (FOLETTTO, Vitória Segabinazzi et al., 2019).

Vias de transmissão que são os meios pelos quais o hospedeiro interage com o agente causador de doença, além da análise de inúmeras variáveis, como por exemplo, condições e alterações ambientais, condições demográficas, socioeconômicas e políticas relacionadas à qualidade das políticas de saúde e da organização dos sistemas e serviços de assistência médica prestada à comunidade, que podem

contribuir para a dispersão de um dado patógeno dentro de uma população (FOLETTTO, Vitória Segabinazzi et al., 2019).

O reconhecimento dos fatores de suscetibilidade e resistência às doenças intrínsecas aos indivíduos de uma dada população são características que também devem ser consideradas pelos sistemas de vigilância em saúde, para que os padrões de transmissão das doenças infecciosas sejam elucidados, e se aplicável, programas de vacinação sejam organizados e executados com foco na fração crítica da população com o intuito de eliminar determinado patógeno e alcançar redução máxima de doenças, prevenindo a formação de fontes de infecção (Araujo, M. Q., Poletto, K. Q., & Bessa, N. G., 2017)

A respeito de fatores epidemiológicos relevantes para o controle das doenças infecciosas, é importante ressaltar, que no Brasil, os programas, treinamentos, manuais, RDCs e guias disponibilizados nacionalmente destinados ao combate de patógenos resistentes são baseados em documentos de origem internacional como a Food and Drug Administration, Center for Disease Control, World Health Organization e o National Committee for Clinical Laboratory Standards, literaturas essas, que consideram a presença de muitos recursos, assim como condições patológicas não presentes na realidade nacional (COSTA., 2016).

Representam limitações para as ações de controle e prevenção da resistência microbiana e disseminação de patógenos resistentes em comunidades humanas, em função da discrepância socioeconômica dos países onde a literatura de referência é publicada, e o Brasil (DE OLIVEIRA, Caio Ferreira et al., 2014).

Neste âmbito, pode-se afirmar que trabalhos baseados na realidade nacional, regional e de cada estado do país, em relação à incidência e prevalência de casos de infecções causadas por patógenos resistentes nos estabelecimentos de saúde podem nortear o planejamento e a logística das ações e serviços de saúde como vigilância ambiental e vigilância sanitária, favorecendo a execução de estratégias institucionais, administrativas, programáticas e sociais fundamentadas em políticas públicas especificamente desenvolvidas para reduzir e prevenir os riscos à saúde mais comuns, em cada localidade (ARAÚJO, Susana et al., 2016).

Em relação à prática dos profissionais de saúde, entre os fatores que contribuem para a resistência microbiana, estão a postura defensiva de profissionais de saúde que prescrevem antimicrobianos desnecessariamente com finalidade de evitar potenciais complicações jurídicas, e a prescrição baseada empiricamente em sinais e sintomas

sem fundamentação em culturas microbianas e testes de suscetibilidade, sendo estes os principais fatores desencadeadores de patógenos resistentes em ambiente hospitalar, na qual os fármacos antimicrobianos exercem grande pressão seletiva sob cepas resistentes (LOUREIRO, Rui João et al., 2016).

Havendo também vários outros fatores de natureza socioeconômica que influenciam no uso não racional e ou abusivo de antimicrobianos como a pobreza e acesso inadequado a estes fármacos, o que leva muitos pacientes a procurarem produtos de qualidade duvidosa, adulterados, falsificados ou contendo concentrações subterapêuticas do componente ativo (LOUREIRO, Rui João et al., 2016).

4. Resistência Bacteriana

Em 1929 com a descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina foi descoberta por Alexander Fleming, que observou a inibição do crescimento em uma placa em uma cultura de estafilococos contaminada por um fungo, o *Penicillium notatum*. A qual revolucionou o tratamento de enfermidades causadas na Segunda Guerra Mundial, sendo assim, usualmente para infecções aéreas superiores, septicemias e pneumonias causadas por estafilococos e estreptococos, além de ser nova a droga ainda tinha baixa toxicidade (CAUMO; Karin et al., 2010).

Com o passar dos anos foi-se observando que a nova droga não estava mais sendo tão eficaz, uma vez que as bactérias estavam resistentes a este antibiótico, pelo desenvolvimento de enzimas que quebram o anel betalactâmico desde fármaco, as betalactamases (CAUMO; KARIN et al., 2010).

Contudo o problema foi resolvido com a criação de novos compostos antibacterianos, tais como os macrolídeos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e alterações nos que já existiam, contudo o uso indiscriminado de antimicrobianos fez com que novas resistências fossem adquiridas pelas bactérias. (DA COSTA, A.L. Pena., 2017)

Modificações feitas nas estruturas de fármacos já existentes, conservando o grupo farmacofórico, região com atividade biológica. Alteração de radicais ou compostos ligados a ele, têm-se novos compostos com atividade melhoradas e possíveis espectros de ação mais amplo, tal como podemos citar a quinolonas (DA COSTA, Anderson Luiz Pena., 2017).

Populações bacterianas podem desenvolver resistência antimicrobiana de forma, como resposta adaptativa à pressão exercida por antimicrobianos, podendo ser por seleção natural ou até mesmo disseminação clonal ou aquisição de genes de resistência (Moraes, A. L., Araújo, N. G. P., & Braga, T. D. L., 2016).

A resistência por resposta adaptativa está ligada a adaptações ou modificações que os cromossomos da bactéria podem sofrer, esse tipo de disseminação ocorrerá mais lentamente e sua resistência ficará relacionada a compostos relacionados aos tipos de modificações (Moraes, A. L., Araújo, N. G. P., & Braga, T. D. L., 2016)..

Entretanto as vias de aquisição de genes de resistência ou transferência horizontal ocorrem de maneira rápida e podendo ocorrer entre bactérias de filos diferentes assim a possibilidade de diferentes tipos de resistência se espalhar é maior e bem mais rápida quando se compara com as mudanças cromossômicas (RANGEL, Luiz Thibério Lira Diniz.,2017).

Entretanto o tipo de resistência bacteriana que mais tende a preocupar é a resistência bacteriana adquirida aos antimicrobianos, pois além de ser mais complexa, envolve transferência de genes codificadores de resistência por diferentes vias, tais como: via bacteriófagos (transdução), via plasmídeos conjugativos, e a via de DNA exógeno (transformação) (RANGEL, Luiz Thibério Lira Diniz.,2017).

Processos no qual gera grande preocupação, sendo que a aquisição desses genes de resistência pode gerar a expressão de mecanismos bioquímicos diversos, um dos principais a diminuição da incorporação do agente antimicrobiano pela célula bacteriana, degradação enzimática, efluxo ativo do antimicrobiano, e alteração ou hiperprodução do alvo antimicrobiano (MARTÍNEZ-EZQUERRO, José Darío., 2020).

Segundo Perry & Wright (2013), a via mais importante e frequente é a de transferência de genes de resistência aos antimicrobianos é a conjugação, envolvendo plasmídeos, transposons e integrons. No qual plasmídeo é um fragmento de DNA de dupla fita, circular ou linear, extra-cromossômico, auto replicativo, estes elementos abrigam genes não essenciais e contribuem para a evolução das espécies por facilitar a disseminação horizontal destes genes (ABRAHAMOVICH, Eliana., 2018).

Plasmídeos possuem também a habilidade para adquirir sequências de inserção e transposon e mobilizar genes de resistência a antimicrobianos entre espécies não relacionadas, conferindo resistência às maiores classes de antimicrobianos, como betalactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e quinolonas (ABRAHAMOVICH, Eliana., 2018).

5. Escherichia coli e Staphylococcus aureus

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um microrganismo pertencente à família Enterobacteriaceae, gram negativa, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente. A contaminação com a *E. coli* ocorre através do consumo de água ou alimentos contaminados com a bactéria.

A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) foi reconhecida como um importante patógeno vinculado a doenças alimentares a partir de 1983 devido a um surto ocorrido pela ingestão de hambúrgueres mal cozidos em um restaurante fast food nos Estados Unidos da América. Seu principal reservatório natural é o trato gastrointestinal de bovinos sendo encontrado nas fezes dos mesmos.

Alguns outros tipos de *Escherichia coli* são encontrados nos quais serão descritos na tabela abaixo.

TABELA 1: Características gerais das cepas de *E. coli*

Cepas	Aspectos de virulência	Patologias relacionadas	Aspectos clínicos	Tratamento
EPEC (enteropatogênica)	Fímbrias formadoras de feixes, com efeito de fixação e ofuscamento.	Bebês vivendo em países em desenvolvimento	Diarreia aquosa, vômitos.	Reposição de líquidos, ou casos mais graves soro fisiológico.
EIEC (enteroinvasiva)	Utilizam proteínas de adesina para se ligar e entrar nas células intestinais	Diarreia profunda e febre alta, assemelha-se a <i>Shigella spp.</i>	Diarreia	Utilizam-se os mesmo antimicrobianos que os para a <i>Shigella spp.</i>
		Diarreia		Reposição

ETEC enterotoxi gênica	Fímbrias, enterotoxinas sensíveis e enterotoxinas estáveis ao calor	da infância em países em desenvol vimento Diarreia do viajante	Diarreia aquosa	de líquido, fluoroquinol ona ou rifaximina podem ser utilizadas isoladament e ou combinada com loperamida
EHEC (enterohe morrágica)	Shiga-toxinas 1 e 2; Efeito de fixação e ofuscamento. Presença de plasmídeo Pol57 (genes para hemolisinas, catalase- peroxidase, etc)	Surto transmissí vel via alimentos e água.	Diarreia aquosa, colite hemorrá gica.	Reposição de líquidos, terapia de suporte; o uso de agentes antimicrobiano s é contraindicado
EAEC (enteroagr egadora)	Fímbrias, citoxinas	Diarreia da infância; diarreia do viajante	Diarreia com muco	Reposição de líquidos, tratamento antibiótico para pacientes com Aids
DAEC (adesão difusa)	Desconhecidos	Crianças	Diarreia	Reposição de líquidos.

Fonte: Modificada de DONNENBERG, (2012); LIM et al., (2010).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (TONG, Steven YC et al., 2015).

A penicilina G descoberta por Alexander Fleming, em 1928 passou a ser usada no tratamento de pacientes infectados pelo *S. aureus* em 1943. Porém, logo esse patógeno exibia resistência àquele betalactâmico em diversos hospitais. O que ocorreu com a meticilina, primeira penicilina semi sintética, com o aparecimento das cepas MRSA e com a vancomicina, contra a qual já existem cepas de *S. aureus* resistentes (VRSA). Hoje, felizmente, ainda existem alternativas terapêuticas contra as cepas resistentes aos glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina, como as estreptograminas (quinupristina/daltopristina), as oxazolidinonas e as associações de antibióticos, como vancomicina e betalactâmicos (TONG, Steven YC et al., 2015).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antibióticos demonstrado pelo *S. aureus* está diretamente relacionado com os procedimentos empregados na sua antibioticoterapia. Por outro lado, o entendimento do funcionamento da patogenicidade desse perigoso agente infeccioso pode orientar os profissionais de clínica na racionalização de sua antibioticoterapia, minimizando, assim, as chances de seleção de cepas resistentes (e multirresistentes) aos antimicrobianos. Sabendo-se que os índices de cepas MRSA em hospitais brasileiros variam de 40% a 80%, principalmente em UTIs, a importância de se conhecer uma cepa de valor epidemiológico para o ambiente hospitalar já foi reconhecida (TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekhar G., 2017).

Fatores diversos reforçam essa importância, como a mortalidade e o custo atribuído à infecção por essas cepas, inferindo a necessidade de implementação de um programa de vigilância microbiológica ativa. (TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekhar G., 2017).

6. Nanopartículas como Antimicrobianos

A necessidade de desenvolver e fabricar novos e eficazes agentes antimicrobianos é particularmente exigente, especialmente no cenário atual de surgimento de microrganismos resistentes a múltiplos medicamentos. Uma iniciativa promissora seria convergir a nanotecnologia para desenvolver novas estratégias de tratamento antimicrobiano. Essas propriedades distintas em nanoescala conferem capacidades antimicrobianas impressionantes aos nanomateriais, que podem ser explorados em diversas áreas como na ciência biomédica, na nanomedicina e na agricultura entre outros meios como indústria têxtil (ZANONI, Elton Torres et al., 2019).

A nanotecnologia modula particularmente as propriedades físico-químicas de nanopartículas orgânicas e inorgânicas, tornando-as adequadas para várias aplicações relacionadas à terapia antimicrobiana em comparação com suas contrapartes em massa. No entanto, uma questão importante associada a esse uso de nanomateriais é a preocupação com a segurança no sistema de saúde. Portanto, é necessário um conhecimento aprofundado sobre nanoestruturas biocompatíveis destinadas à terapia antimicrobiana (DE LIMA, C. A.; TOLEDO, R. V., 2016).

As nanopartículas de prata (Ag), grafeno, pontos quânticos (QDs), óxido de zinco (ZnO) e quitosana são consideradas representantes de metais, semicondutores, óxidos metálicos e nanopartículas orgânicas que encontraram várias aplicações na terapia antimicrobiana em detalhes. Geralmente diretamente a membrana da célula microbiana, interagem com o DNA e proteínas ou podem iniciar indiretamente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam componentes celulares microbianos e vírus (SANCHES, Mariele Paludetto et al., 2020).

Por exemplo, nanopartículas de prata têm atividade antibacteriana de amplo espectro, enquanto outras apresentam atividade antibacteriana e antiprotozoária. As formulações de nanomateriais podem ser usadas diretamente ou como revestimentos de superfície ou como transportadores eficazes para a distribuição de antibióticos. A natureza policatiônica das NPs de quitosana auxilia na conjugação e estabilização de nanopartículas metálicas, o que aumentará seu uso efetivo na terapia antimicrobiana (SANCHES, Mariele Paludetto et al., 2020).

7. Quinolonas e seu representante Ciprofloxacino

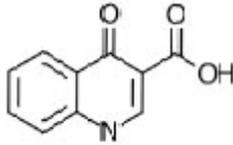
Entre o final da década de 1980 e o começo de 1990, os desenvolvimentos de fluoroquinolonas foram desenvolvidas, estas apresentavam atividade potente contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, até mesmo anaeróbias obrigatórias (RUIZ, 2003; ALDRED et al., 2014).

Pertencentes a um grupo de antimicrobianos sintéticos potentes relacionados ao ácido nalidíxico, sua obtenção é a partir de modificações estruturais no esqueleto da molécula 4-quinolona. As quinolonas são formadas por uma estrutura básica: dois anéis, com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3 do anel (ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, Diego Abelardo et al., 2015).

A figura 2 a seguir, mostra a estrutura química básica. Modificações na estrutura do fármaco interferem na atividade antimicrobiana, aumentam a afinidade pelo sítio

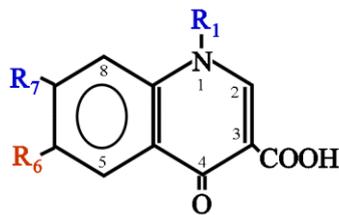
alvo, melhoram a penetração nas células e alteram a farmacocinética e a toxicidade das quinolonas, demonstrado na figura 3.

FIGURA 2: Estrutura básica das Quinolonas



Fonte: Sicelo., 2020.

FIGURA 3: Modificações na estrutura das Quinolonas



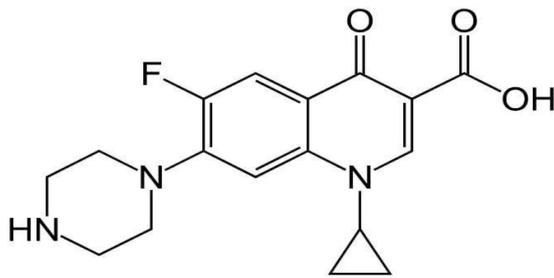
<p>QUINOLONAS R₆ = H</p>	}	<p>Ácido Nalidíxico</p>						
<p>FLUOR- QUINOLONAS R₇ = F</p>	}	<table border="0"> <tr> <td>Ciprofloxacina</td> <td>Norfloxacina</td> </tr> <tr> <td>Levofloxacina</td> <td>Trovafloxacina</td> </tr> <tr> <td>Ofloxacina</td> <td>Moxifloxacina</td> </tr> </table>	Ciprofloxacina	Norfloxacina	Levofloxacina	Trovafloxacina	Ofloxacina	Moxifloxacina
Ciprofloxacina	Norfloxacina							
Levofloxacina	Trovafloxacina							
Ofloxacina	Moxifloxacina							

Fonte: Google com Modificações., 2020.

O Ciprofloxacino é um antibiótico derivado do ácido fluoroquinolônico, devido à sua baixa toxicidade e amplo espectro de ação é muito utilizado na profilaxia e no tratamento de diversas infecções bacterianas, sendo mais indicado para trato urinário e/ou ocular (DE LIMA, Carola; TOLEDO, Rafael, 2016).

Fármaco capaz de inibir a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Inibindo essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (ROCHA, Igor Vasconcelos et al, 2017).

FIGURA: CIPROFLOXACINO



Fonte: RANG, Humphrey. P. et al., 2007

8. Justificativa

Por considerar a Ciprofloxacin um fármaco de escolha para tratamento de infecções bacterianas de amplo espectro e, reconhecendo a necessidade de estudos para o delineamento de novas formulações que aumentem a susceptibilidade à terapia antibacteriana, este trabalho buscou avaliar a atividade do fármaco quando associado à nanocarbonos e sua atividade como um dispositivo de direcionamento da droga.

9. Objetivos

Diante da aplicação de *C-dots* como carreadores de fármacos, o objetivo deste trabalho é avaliar as nanopartículas sintetizadas com finalidade em aplicação em sistemas biológicos e verificar sua capacidade de direcionamento de fármacos.

9.1 Objetivos específicos

Verificar a estabilidade da solução de dispersão contendo o C-dot conjugado com a Ciprofloxacin; E então avaliar a atividade antimicrobiana em culturas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC. Em seguida, determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em leitura de placa por meio da técnica de microdiluição. Por fim, analisar a eficácia em tratamentos do agente antimicrobiano conjugado ao C-dot

10. Metodologia

Os resultados foram descritos em termos de porcentagem de inibição, considerando a fração da leitura do poço testado e o controle de crescimento. Para o cálculo do CIM, a metodologia usada foi a de ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal, executada sobre a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações, via programa GraphPrism versão 7.0. A CBM foi determinada por estimativa do cálculo sob o valor do CIM, com uso do software GraphPrism versão 7.0.

11. Microdiluição em placa de 96 poços

Os testes de microdiluição foram feitos no laboratório de microbiologia com parceria da Faculdade LS, para o preparo das microplacas seguiu-se os seguintes modos descritos na CLSI de 2019. Com a nanopartícula produzida por a Mestranda Luana Maria, no laboratório de síntese da Universidade de Brasília.

Os grupos experimentais foram divididos em: Ciprofloxacino padrão, Cirpo+C-dots produzidos no laboratório de Microbiologia na Faculdade LS. Os tratamentos foram realizados em triplicata com finalidade de aumentar o grupo amostral. Para a realização do teste de microdiluição em caldo, os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922, que foram inoculados em Mueller-Hinton (caldo MH).

O preparo do inoculo através da de uma colônia de bactéria, semeada em placa de crescimento previamente incubada em estufa de crescimento a 37°C, posterior a 24h de incubação, foi diluída em tubo de ensaio contendo soro fisiológico. A análise das diluições deu-se por meio da escala de McFarland, correspondendo a turvação em 0,5 correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, com medição auxiliada através de espectrofotômetro de absorvância.

11.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Fez-se a análise para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo, realizada em placas de 96 poços, estéreis e descartáveis.

No qual foram adicionados à placa 100 microlitro de caldo agar, em todos os poços de B1 à G12, posteriormente na coluna A adicionamos 200 microlitros da nossa formulação, assim fizemos diluição seriada partindo de A1 à G12, retirando 100

microlitros e passando para o próximo poço. Logo após adicionamos 80 microlitros de caldo em todos os poços. Assim por fim colocamos 80 microlitros do inóculo em todos os poços exceto na fileira D, pois a mesma ficará como controle.

Na fileira H1 á H12 adicionamos 200 microlitros nos 4 primeiros poços, e nos 4 últimos 180 microlitros, sendo que neste último foi adicionado mais 20 microlitros do seu inóculo, sendo então esses controle positivo e negativo. As placas são incubadas a 37°C, a leitura do CIM após o período de incubação, de 24 e 48 horas, se faz por meio da análise da absorbância de cada poço através do leitor de ELISA. Deve-se considerar como CIM a menor concentração de inibir o crescimento do microrganismo.

Após a leitura, os resultados obtidos foram avaliados e foi calculada a CIM, em porcentagem, de cada poço, conforme mostra a Tabela 2. Nesta tabela, são apresentados três parâmetros importantes para a determinação da atividade antimicrobiana dos materiais testados, sendo eles: concentração inibitória mínima (CIM), intervalo de confiança (IC 95) e concentração bactericida mínima (CBM).

12. Resultados e Discussão

Os valores de inibição do crescimento microbiano foram obtidos por meio de leitura em leitora de microplaca Multiskan em comprimento de onda de 630 nm. Após a leitura adicionou-se o corante Resazurina 0,01% às placas, para uma melhor visualização da inibição gerada pelos materiais testados. Este corante é um indicativo do metabolismo celular das bactérias, tornando-se rosa onde há células viáveis, e roxo onde houve inibição do crescimento das cepas.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima das nanopartículas com Ciprofloxacino e Ciprofloxacino puro em cepas de *S. aureus* e *E.coli*.

	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria	
	Cdot+Cipro	Cipro	Cdot+Cipro	Cipro
CIM (mg/mL)	0,0007	52,141	0,000006	9,32
IC (IC 50)	0,000063-0,00253	11,33-240,35	0,00000054-0,000023	6,633-12,235
IC 99,9 (MBC)	0,6993	52088	0,05994	9310.68

Fonte: Autoria Própria

MAHOR et al., 2016 em seu trabalho teve por objetivo aumentar a solubilidade e reduzir doses do moxifloxacino, pertencente a 4ª geração de antibióticos da classe das fluoroquinolonas, por meio do processo de encapsulamento em uma matriz gelatinosa, para avaliar a ação do fármaco no sistema oftálmico com liberação controlada. A análise da atividade antimicrobiana in vitro, por meio do método Ágar Cup Plate, onde uma concentração conhecida da amostra é colocada no centro da placa de Petri com meio ágar e inóculo de escolha. Os resultados obtidos demonstraram que a nanoformulação apresentou halos de inibição maiores do que os apresentados pelo fármaco comercial.

TOPAL et al., 2018 teve por objetivo preparar uma nanoformulação de Ciprofloxacino com manitol por meio da técnica de freeze-drying para obter um produto com uso inalatório com finalidade de uso em infecções pulmonares, demonstrando a importância e relevância que o antibiótico apresenta mesmo sendo parte da 2ª geração das fluoroquinolonas.

YOUNG-II JEONG et al., 2008 teve como objetivo preparar nanopartículas de copolímero de ciprofloxacina (CIP), encapsulado poli (dl-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e seu potencial antibacteriano, foi testado em bactéria gram negativa *E.coli*, foi elaborado pelo método de evaporação de solvente em emulsão, no qual no teste in vitro que verificou a atividade antibacteriana, demonstrou uma atividade relativamente menor que a do CIP livre.

Entretanto, quando feitos testes em camundongos, pode se observar que as PLGA com CIP, teve eficácia superior para inibir o crescimento das cepas utilizadas no estudo, resultando em que o uso da nano melhora a função de modo sinérgico no tratamento antimicrobiano.

BENEDINI et al., 2019 desenvolveu um sistema de entrega de drogas baseado em nanopartículas com hidroxapatita e ciprofloxacino, além da ação bacteriana, o material oferecido mostrou-se biocompatível e capaz de regenerar ossos.

NEHAL SHARMA et al., 2015, em seu estudo teve como objetivo de observar a atividade sinérgica de nanopartículas de óxido de zinco acopladas a Ciprofloxacino e outros antibióticos, foi feito com teste de microdiluição em placa e testado em fungos, bactérias gram positivas e gram negativas.

Foi utilizado partículas em duas concentrações uma à 1% e outra a 10% da nanopartícula pura, onde foi observado um maior efeito antimicrobiano na formulação à 10%, quando conjugado com antibióticos foi descrito um sinergismo do efeito antimicrobiano em todas as formulações, demonstrando assim que o estudo abre grande leque para futuros estudos.

Quando comparado o presente estudo com os descritos na literatura podemos observar um grande futuro promissor para o uso de nanopartículas como agente carregador/direcionador de fármaco em sistemas biológicos. Pois todos os estudos descritos tiveram resultados positivos quando comparados aos testes feitos sem nanomateriais.

Nosso estudo revelou que usando um fármaco quinolônico tivemos melhores resultados estatísticos quando associados a nanopartículas do que quando o fármaco está livre de associações. Um futuro promissor para diminuir o uso de agentes antimicrobianos, pois o mesmo teve ação estatisticamente favorável tanto em bactérias gram negativas quanto para agentes gram positivos.

13. Conclusão

Um antimicrobiano ideal deve matar ou inibir seletivamente o crescimento de microrganismos, podendo causar pouco ou nenhum efeito adverso ao hospedeiro. Cada uma das análises feitas tem sua vantagem e desvantagem, baseado na literatura, sabemos que um acoplamento de fármacos com nanopartículas é vantajoso, pois além de diminuir a quantidade de fármaco utilizado, funcionam como nanocarregadores diminuindo a degradação dos fármacos.

Assim problemas com uso racional de medicamentos poderá ser reduzidos, uma vez que menor quantidade de fármaco precisa ser utilizada, as nanopartículas fará com

que o mesmo não sofra ação imediata de enzimas de degradação e sua distribuição fará a terapia antimicrobiana seja mais eficaz, sendo que a quantidade de fármaco necessária para eliminação do patógeno será aplicada.

No presente estudo podemos observar que a combinação de Ciprofloxacino com a nanopartícula foi mais efetiva do que o antibiótico sozinho, sendo que a eficácia do complexo Cipro+Cdot em bactérias gram positivas quando observado o CIM, foi maior que a do Ciprofloxacino. Entretanto, quando observamos o mesmo complexo, agora para bactérias gram negativas surge um perspectiva para futuros estudos, resultando em uma melhor inibição desse tipo de bactéria como podemos observar na tabela 2.

O presente estudo levantou grandes hipóteses, como a possibilidade de diminuição da resistência bacteriana pelo uso excessivo de fármacos, sendo que foi observado estatisticamente que usando as nanopartículas, precisaríamos de menor quantidade de fármaco para inibir os agentes alvo. Um futuro promissor que precisa ser mais explorado, pois como as Indústrias Farmacêuticas não estão conseguindo acompanhar o surgimento de bactérias resistentes a diversas classes terapêuticas, criar de forma simples, barata e não precisar de grandes tecnologias um modelo de acoplamento de fármaco a nanopartículas que diminua a utilização de agentes antimicrobiano, possivelmente mudaram o rumo dessa batalha.

14. Referências Bibliográficas

1. ABRAHAMOVICH, Eliana. Estudios sobre la transferencia horizontal de resistencia a tetraciclina en bacterias esporuladas aisladas de colmenas de abejas melíferas. 2018. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de La Plata
2. ALMEIDA, Maria et al. Staphylococcus aureus. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2017.
3. ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, Diego Abelardo; GARZA-MAYÉN, Gilda Sofía; VÁZQUEZ-LÓPEZ, Rosalno. Quinolonas: Perspectivas atuais e mecanismos de resistência. **Jornal chileno de infectologia** , v. 32, n. 5 p. 499-504, 2015.
4. ALENCAR, Adriano Pereira et al. Detecção de microrganismos em caixas de delivery à luz da coloração Gram/Detection of microorganisms in delivery boxes in light of Gram stain. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 3, p. 4890-4899, 2020. ANDRADE, Jéssica Velasco; ROCHA, Eleusa Maria Ferreira. Identificação de contaminantes bacterianos em uma destilaria de etanol do Pontal do Triângulo Mineiro. **Intercursos Revista Científica**, 2017.
5. ANGLES, Eddie. Uso racional de antimicrobianos e resistência bacteriana: para onde vamos? *Revista Médica Herediana* , v. 29, n. 1 pág. 3-4, 2018
6. ARAUJO, Michelly Queren; POLETTO, Karine Queiroz; BESSA, Nelita Gonçalves. Perfil de resistência bacteriana em fômites de UTI em hospital público do Estado do Tocantins. *REVISTA CEREUS*, v. 9, n. 2, p. 126-141, 2017.
7. ARAÚJO, Susana et al. Resistência bacteriana a antibióticos em vegetais e águas de irrigação: um problema de saúde pública. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*, v. 6, n. 1, p. 1-3, 2016
8. BLAIR, J. M. et al. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature*, v. 13, p. 42- 51, 2015.
9. BROOKS, George F. Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology/Geo. F. Brooks...[et al.]. New York; Chicago: McGraw Hill Medical,, 2010.
10. BUCHHOLZ, Klaus; COLLINS, John. The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 97, n. 9, p. 3747-3762, 2013. CHAVES, Claudilene Ribeiro et al. NANOPARTÍCULAS DE CARBONO: SÍNTESE E PROPRIEDADES.

11. CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTO, Valtencir. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.
12. CAUMO, Karin et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.
13. CAVALCANTE, Amanda; ANJOS, Paula; VANDESMET, Lilian. A DESCOBERTA DA PENICILINA E A RESISTÊNCIA DE MICRORGANISMOS AOS ANTIMICROBIANOS. *Mostra Científica em Biomedicina*, v. 1, n. 1, 2017.
14. CONCEIÇÃO, Ana Isabel FS; MATOS, Carla; MOUTINHO, Carla. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. 20017.
 - a. CRUZ, Cleide Ane Barbosa da et al. Inovação tecnológica: um mapeamento de patentes sobre o uso da nanotecnologia em diagnósticos e tratamentos médicos. 2016.
15. DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, Antonio Carlos Souza Silva. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.
16. DE LIMA, C. A.; TOLEDO, R. V. Análise do Ciprofloxacino em Amostras de Medicamentos de Referência, Similar e Genérico por Espectroscopia no Infravermelho. *CEP*, v. 12244, p. 000, 2016.
17. DIMER, Frantiescoli Anversa et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Química nova*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1978-. Vol. 36, n. 10,(2013), p. 1520-1526, 2013.
18. DE OLIVEIRA, Caio Ferreira et al. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 242-247, 2014.
19. Durán, N.; Durán, M.; Tasic, L.; Marcato, P. D.; *Quim. Nova* 2010, 33, 151. International Organization for Standards – ISO/TC 229: Nanotechnologies. ISO/TS 800041: VocabularyPart 1: Core Terms. 2015.
20. ELO, Celso Pinto de; PIMENTA, Marcos. Nanociências e nanotecnologia. *Parcerias estratégicas*, v. 9, n. 18, p. 09-22, 2010
21. FOLETTO, Vitória Segabinazzi et al. Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos de hemoculturas em hospital universitário. *Saúde (Santa Maria)*, v. 45, n3, 2019.

22. International Organization for Standards – ISO/TC 229: Nanotechnologies. ISO/TS 800041: Vocabulary Part 1: Core Terms. 2015.
23. Jeong YI, Na HS, Seo DH, Kim DG, Lee HC, Jang MK, Na SK, Roh SH, Kim SI, Nah JW. Ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int J Pharm.* 2008 Mar 20;352(1-2):317-23. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.001. Epub 2007 Nov 9. PMID: 18160236.
24. KREUTER, Jorg. Nanoparticles. In: *Colloidal drug delivery systems*. CRC Press, 2014. p. 231-253.
25. Lee, R. W.; Shenoy, D. B.; Sheel, R.; *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*; Vitthal, S. K., ed.; William Andrew Publishing: Boston, 2010, cap. 2.
26. LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de saúde pública*, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
27. MANDAL, Jharna et al. Antibiotic resistance pattern among common bacterial uropathogens with a special reference to ciprofloxacin resistant *Escherichia coli*. *The Indian journal of medical research*, v. 136, n. 5, p. 842, 2015.
28. MARTÍNEZ-EZQUERRO, José Darío. Consecuencias de la transferencia horizontal de genes en la evolución genómica eucarionte [Consequences of horizontal gene transfer in eukaryotic genomic evolution]. 2020.
29. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th ed., 2019.
30. MOYES, Rita B.; REYNOLDS, Jackie; BREAKWELL, Donald P. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, v. 15, n. 1, p. A. 3C. 1-A. 3C. 8, 2016.
31. Neha Sharma; Savita Jandaik; Sanjeev Kumar. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms, 2015.
32. ODA, Leila Macedo; SOARES, Bernardo Elias Correa. *Biotechnologia no Brasil. Aceitabilidade pública e desenvolvimento econômico. Parcerias Estratégicas*, v. 6, n. 10, p. 162173, 2010.
33. OLIVEIRA, A. C.; SILVA, R. S. Desafios do Cuidar em Saúde Frente à Resistência Bacteriana: Uma Revisão. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, n. 10, v. 1, p. 189-197, 2008. ORÚS, P. et al. Increasing Antibiotic Resistance in Preservative-Tolerant Bacterial Strains Isolated from Cosmetic Products. *International Microbiology*, n.18, p. 51-59, 2015

34. PFALLER, Michael A. et al. Wild-type MIC distributions and epidemiologic cutoff values for fluconazole, posaconazole, and voriconazole when testing *Cryptococcus neoformans* as determined by the CLSI broth microdilution method. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 71, n. 3, p. 252-259, 2011..
35. Rang et al. Rang & Dale Farmacologia. Elsevier Brasil, 2016.
36. REIS, Carla et al. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. *BNDES Setorial*, n. 29, mar. 2009, p. 359-392, mar. 2009, 2009.
37. RANGEL, Luiz Thibério Lira Diniz. O papel de transferência horizontal de genes na história evolutiva de duas classes de genes em bactérias. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
38. RODRÍGUEZ, Patricia A.; ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, v. 16, n. 2, p. 166-167, 2018
39. ROCHA, Igor Vasconcelos et al. Ciprofloxacin-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST410 strain carrying the *mcr-1* gene associated with bloodstream infection. *International journal of antimicrobial agents*, v. 49, n. 5, p. 655, 2017.
40. SANCHES, Mariele Paludetto et al. Nanopartículas de Pluronic® F127 recobertas com o complexo polieletrólítico quitosana/alginato de sódio contendo óleo essencial de citronela: deposição em tecido de algodão para aplicação antimicrobiana. 2020.
41. Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; *Nano Lett.* 2010, 10, 3223.
42. TAYLOR, Tracey A.; UNAKAL, Chandrashekhar G. *Staphylococcus aureus*. 2017.
43. TONG, Steven YC et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.
44. VIEIRA, Priscila Noemi; VIEIRA, Suellen Laís Vicentino. Uso irracional e resistência a antimicrobianos em hospitais. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 21, n. 3, 2017.
45. ZANONI, Elton Torres et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e adsorvidade de nanopartículas de sílica dopadas com CuO. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, n. 1, 2019.