

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA ASSOCIADAS COM GENTAMICINA EM *Staphylococcus aureus*

EVALUATION OF THE MECHANISM OF BACTERIAL RESISTANCE OF CHITOSAN NANOPARTICLES ASSOCIATED WITH GENTAMICIN IN *Staphylococcus aureus*

EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO ASOCIADAS A GENTAMICINA EN *Staphylococcus aureus*

Tatiane Batista dos Santos

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil

ORCID: 0000-0002-5807-4614

Helena de Almeida Cerqueira Kodel

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil

ORCID: 0009-0004-4860-9701

Willamys Souza Correa

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil

ORCID: 0009-0004-2663-2759

Fernanda Guimarães Valverde

Universidade Tiradentes | Aracaju, Sergipe, Brasil

ORCID: 0000-0001-9462-5041



978-65-84528-45-1



10.53524/lit.edt.978-65-84528-45-1/05

Submissão 22/01/25

Publicação 08/02/2025

Como citar

SANTOS, T. B *et al.* Avaliação do mecanismo de resistência bacteriana de nanopartículas de quitosana associadas com gentamicina em *Staphylococcus aureus*. *In*: FONTES, F. L. L.; MELO, M. M. (Org). **Interdisciplinaridade em foco: diálogos entre saúde, educação e sociedade**. Teresina: Literacia Científica Editora & Cursos, 2025, p. 32-41.

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

RESUMO

OBJETIVO: Verificar o mecanismo de resistência em *S. aureus* com o uso de nanopartículas de quitosana com gentamicina.

MATERIAIS E MÉTODOS: Nanopartículas foram sintetizadas por gelificação iônica, resultando em nanopartículas de quitosana pura (NPQT) e associadas à gentamicina (NPQT-GEN). Os tamanhos das partículas foram determinados por DLS. O rendimento das nanopartículas foi avaliado e caracterizado por FTIR. A atividade antibacteriana foi testada pela concentração inibitória mínima (CIM). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os tamanhos das NPQT (2,0 mg/mL) e NPQT-GEN (0,5 mg/mL) foram $197,7 \pm 1,24$ nm e $406,6 \pm 10,9$ nm, respectivamente, com índices de polidispersividade entre 0,27 e 0,31. As soluções mostraram estabilidade garantida após armazenamento. A FTIR confirmou a formação das nanopartículas pela colocação das bandas em 1660 e 1580 cm^{-1} da quitosana para 1640 e 1530 cm^{-1} . Em NPQT-GEN, houve aumento de intensidade nas bandas de NH e CO. **CONCLUSÃO:** Portanto, o presente estudo mostrou que as concentrações de 2,0 mg/ml e 0,5mg/mL foram melhores, respectivamente. Assim apresentando resultados promissores frente as linhagens bacterianas.

PALAVRAS-CHAVE: Antibiótico. Nanotecnologia. Quitosana.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To verify the resistance mechanism in *S. aureus* using chitosan nanoparticles with gentamicin. **MATERIALS AND**

METHODS: Nanoparticles were synthesized by ionic gelation, resulting in pure chitosan nanoparticles (NPQT) and nanoparticles associated with gentamicin (NPQT-GEN). Particle sizes were determined by DLS. Nanoparticle yield was evaluated and characterized by FTIR. Antibacterial activity was tested by minimum inhibitory concentration (MIC). **RESULTS AND DISCUSSION:** The sizes of NPQT (2.0 mg/mL) and NPQT-GEN (0.5 mg/mL) were 197.7 ± 1.24 nm and 406.6 ± 10.9 nm, respectively, with polydispersity indices between 0.27 and 0.31. Safe solutions are guaranteed after storage. FTIR confirmed the formation of nanoparticles by shifting the bands at 1660 and 1580 cm^{-1} from chitosan to 1640 and 1530 cm^{-1} . In NPQT-GEN, there was an increase in intensity in the NH and CO bands. **CONCLUSION:** Therefore, the present study showed that concentrations of 2.0 mg/ml and 0.5 mg/mL were better, respectively. Thus, presenting promising results against bacterial strains.

KEYWORDS: Antibiotic. Nanotechnology. Chitosan.

RESUMEN

OBJETIVO: Verificar el mecanismo de resistencia en *S. aureus* utilizando nanopartículas de quitosano con gentamicina.

MATERIALES Y MÉTODOS: Las nanopartículas se sintetizaron mediante gelificación iónica, dando como resultado nanopartículas de quitosano puro (NPQT) y nanopartículas asociadas a gentamicina (NPQT-GEN). Los tamaños de partículas se determinaron mediante DLS. El rendimiento de nanopartículas se evaluó y caracterizó mediante FTIR. La actividad antibacteriana se probó mediante concentración inhibitoria mínima (CIM). **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:** Los tamaños de NPQT (2,0 mg/mL) y NPQT-GEN (0,5 mg/mL) fueron $197,7 \pm 1,24$ nm y $406,6 \pm 10,9$ nm, respectivamente, con índices de polidispersidad entre 0,27 y 0,31. Se garantiza que las soluciones son seguras después del almacenamiento. La FTIR confirmó la formación de nanopartículas desplazando las bandas a 1660 y 1580 cm^{-1} del quitosano a 1640 y 1530 cm^{-1} . En NPQT-GEN, hubo un aumento de intensidad en las bandas de NH y CO. **CONCLUSIÓN:** Por lo tanto, el presente estudio mostró que las concentraciones de 2,0 mg/mL y 0,5 mg/mL fueron mejores, respectivamente. Presentando así resultados prometedores frente a cepas bacterianas.

PALABRAS CLAVE: Antibiótico. Nanotecnología. Quitosano.

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno responsável por diversos tipos de infecções, sejam elas de baixa gravidade ou potencialmente fatais, como endocardite, bacteremia, pneumonia e osteomielite crônica (WANG & SUN, 2021). O *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma bactéria gram-positiva, que pode levar a uma dependência de antibióticos de último recurso, como a ceftarolina, daptomicina, tigeciclina e ceftazidima-avibactam. O MRSA é responsável por 37% das sepSES por *S. aureus* com altas taxas de mortalidade (PFALLER *et al.*, 2020; PAYNE *et al.*, 2021).

Dentre as possíveis falhas no tratamento das infecções, a resistência bacteriana aos antibióticos é uma das maiores preocupações para a saúde global. As bactérias podem expressar resistência intrínseca, adquirida ou adaptativa. A resistência intrínseca é definida como a resistência exibida devido às propriedades inerentes da bactéria (LI *et al.*, 2023; SHREE *et al.*, 2023).

Devido aos mecanismos de defesa das bactérias multirresistentes, como a inativação enzimática, alterações do sítio de ligação, alterações no sistema de transporte e bomba de fluxo, os tratamentos tornam-se menos eficazes, pois não conseguem agir nesses mecanismos (ALFARO-VIQUEZ *et al.*, 2020). Um relatório de 2017 do Sistema de Vigilância Antimicrobiana Global da Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou a resistência aos antibióticos como um desafio mundial. O tratamento para infecções bacterianas possui custo elevado, tendo em vista a dificuldade e complexidade de reduzir esses microrganismos resistentes a múltiplas drogas, tendo um gasto estimado de US \$20 bilhões anualmente (VIEIRA, 2018).

Dessa forma, uma das abordagens utilizadas para otimizar a eficácia terapêutica e reduzir o mecanismo de resistência bacteriana é o uso da nanotecnologia no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (NPs), lipossomas ou dendrímeros carregados com compostos antimicrobianos como exemplo a gentamicina, podendo melhorar o efeito terapêutico desses compostos (ALFARO-VIQUEZ *et al.*, 2020; MODI *et al.*, 2023).

Nanopartículas são partículas orgânicas, inorgânicas ou híbridas que possuem escalas nanométricas, 100 nm ou menos, sendo comparadas ao tamanho de biomoléculas e estruturas bacterianas intracelulares. As propriedades exclusivas dos sistemas de nanopartículas revolucionaram muitas tecnologias e indústrias, incluindo a medicina. Assim, as nanopartículas podem ser projetadas como novas modalidades terapêuticas (MITCHELL *et al.*, 2021; LOPES, 2019).

Entre os polímeros naturais a quitosana se destaca por ser um polissacarídeo alcalino natural renovável que não apresenta toxicidade nem efeitos colaterais, além de apresentar boas propriedades de hidratação e adsorção. Atualmente, os derivados de quitosana podem ser usados como veículos de entrega direcionados para medicamentos, bem como adjuvantes e transportadores de entrega para vacinas. Portanto, derivados de quitosana e suas nanopartículas podem ser amplamente utilizados e expandidos (WANG *et al.*, 2020; BADAWY *et al.*, 2021).

Além disso, dentre os antibióticos que podem ser associados às nanopartículas para o tratamento de infecções bacterianas temos a gentamicina que é um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de infecções por bactérias gram-positivas como *S. aureus*. Um dos maiores problemas dessa classe de antibióticos está associado ao seu processo de excreção que ocorre através de filtração glomerular sem metabolização prévia, o que gera nefrotoxicidade ocasionada pelo acúmulo do fármaco no córtex renal (SIMPSON *et al.*, 2024; GAMAAN; ZAKY; AHMED, 2023). Desse modo, o presente estudo visou avaliar a influência do uso de nanopartículas de quitosana com gentamicina sobre o mecanismo de resistência em *S. aureus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da NPs de quitosana e NPs com gentamicina (NPQT e NPQT/GEN)

A distribuição do tamanho das nanopartículas foi determinada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) utilizando o equipamento Zetasizer Nanoseries (MALVERN) em parceria com o NUESC (Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais) da Universidade Tiradentes/SE.

Para a medida do tamanho (nm) e do Pdl (distribuição do tamanho) das NPs, as mesmas foram ressuspensas em água ultra-pura (3 gotas de solução por mL de água). As leituras foram realizadas em cubeta de vidro com 3 repetições em intervalos de tempo de 1 minuto. O espalhamento de luz foi detectado em um ângulo de 90° e temperatura de 25 °C. Para a análise dos dados, foi considerada a viscosidade de água como de 0,8872 cP e índice de refração da quitosana igual a 1,33.

Espectroscopia Vibracional na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os componentes químicos da gentamicina, da quitosana e das nanopartículas (NPQT e NPQT/GEN) foram determinados utilizando as vibrações dos grupos funcionais obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Shimadzu IRAffinity-1, Columbia, MA), com resolução de 4 cm⁻¹. A medição dos espectros de absorção das amostras foi realizada na região do infravermelho (4000 a 400 cm⁻¹).

Microrganismos

Os microrganismos utilizados na determinação do mecanismo de ação e da resistência bacteriana foram cedidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As linhagens utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 INCQS 00015 (sensível a meticilina) e a *Staphylococcus aureus* ATCC

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

43300 INCQS 00577 (resistente a meticilina). Os microrganismos foram ressuspensos para cultivo em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e sua manutenção foi feita em Agar Mueller Hinton (AMH), 24 h, 37 °C.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das NPQT e NPQT/GEN

A CIM foi determinada por meio da técnica de microdiluição com base na metodologia descrita por PATEL et al (2019) com adaptações. Para realização da técnica, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços com fundo chato. Inicialmente, uma suspensão de cada inóculo bacteriano foi preparado equivalente a 0,5 da escala de McFarland e rediluído em 1:10 (v/v) para obter a concentração de 10^4 UFC/mL. Em seguida, foram distribuídos 100 µL de BHI em todos os poços da placa. A avaliação antimicrobiana das NPs (sob a células planctônicas) foi determinada pela retirada de uma alíquota de 100 µL da solução de NPQT (10 mg/mL) adicionada ao primeiro poço da coluna 1, 2 e 3 da linha A e 100 µL da solução de NPQT/GEN (10 mg/mL) foi adicionada ao primeiro poço da coluna 4, 5 e 6 da linha A, a partir do primeiro poço foi realizado a diluição seriada para os poços sucessores até a linha H.

Paralelamente, foi realizado o controle de viabilidade das linhagens bacterianas. O CP (Controle Positivo) foi determinado na coluna 9 e ao seu primeiro poço da linha A foi adicionado 100 µL do antimicrobiano: gentamicina (Hydrofarma) a uma concentração de 10 mg/mL. A análise do CN (Controle Negativo) foi verificada na coluna 10 adicionando 100 µL de água ultrapura como solvente no primeiro poço da linha A para verificar se há ação antimicrobiana do solvente. Como CC (Controle de Crescimento) foi utilizado o meio de crescimento acrescido do inóculo bacteriano para comprovar a viabilidade bacteriana e o CE (Controle de Esterilidade) foi verificado apenas pelo meio de crescimento para comprovar a esterilidade do meio. Por fim, foi adicionado a todos os poços 10 µL do inóculo bacteriano.

Todo o ensaio antimicrobiano foi realizado em triplicata. Após o preenchimento das placas, as amostras foram incubadas em estufa microbiológica a 35 °C por 24 horas. A revelação da CIM foi constatada por meio do corante TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazólio), a partir da adição de 20 µL de solução do corante em todos os poços da placa de microdiluição. Em seguida, as placas foram, novamente, incubadas a 37 °C por 2 horas. Após, o processo de incubação foi verificado a mudança de coloração, os poços que apresentaram coloração vermelha mostraram a viabilidade bacteriana.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

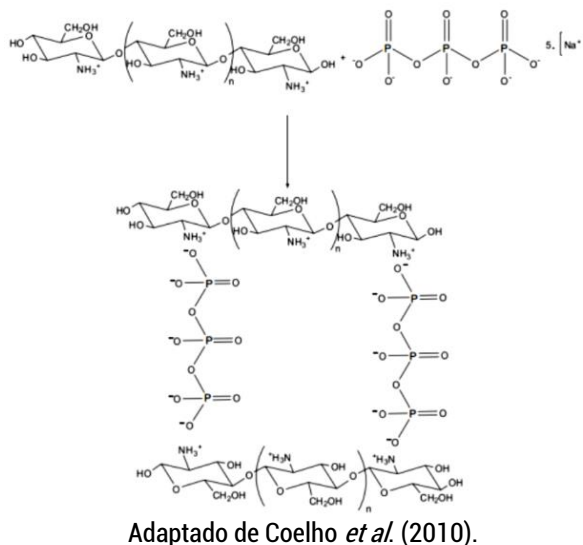
Caracterização da NPs de quitosana e NPs com gentamicina (NPQT e NPQT/GEN)

As NPs foram formadas a partir da interação da solução de TPP com a solução de quitosana, pela técnica de gelificação iônica, que tem como princípio promover a ligação das moléculas de quitosana carregadas positivamente com o agente reticulante chamado de tripolifosfato de sódio (TPP) (FIGURA 1) carregado negativamente, este tem sido muito utilizado pois não é tóxico, tem rápida capacidade de geleificação e interage eletrostaticamente com a quitosana catiônica (ALQAHTANI *et al.*, 2019). Através desse processo as ligações estáveis entre segmentos de cadeias polipeptídicas dentro da molécula formam uma estrutura em rede tridimensional, normalmente mais rígida que o material não reticulado (COSTA *et al.*, 2015).

A partir disso, o TPP dissolvido em água resulta em íons OH^- , $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$. Em soluções com pH básico, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ e $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ podem interagir ionicamente com grupos amino protonados (NH_3^+) da quitosana através da reticulação iônica. Assim, o pH com valores abaixo de 6,0 resulta apenas em íons $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$, e as partículas podem ser formadas somente por reticulação iônica, ocorrendo um entrelaçamento cruzado possibilitando uma aproximação entre duas moléculas de quitosana (COSTA *et al.*, 2015).

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

Figura 1. Representação da interação entre quitosana e TPP, resultando em nanopartículas.



A Tabela 1 apresenta a média e o desvio-padrão do tamanho médio e o índice de polidispersividade das NPs sintetizadas para as diferentes concentrações de solução TTP em relação a concentração de QT, a fim de verificar a melhor concentração e, se o tripolifosfato de sódio interfere no tamanho das NPs.

Tabela 1. Tamanho médio das NPs e índice de polidispersividade para as diferentes concentrações de solução TTP em relação a solução de quitosana após análise pelo DLS.

Solução de TTP	DHM (nm)	PDI
	NPQT/GEN	
0,5 mg/ml	406,6 ± 10,9	0,27 ± 0,03
1,0 mg/ml	385,7 ± 13,3	0,31 ± 0,02
1,5 mg/ml	6285,3 ± 1020	0,49 ± 0,22
2,0 mg/ml	3903,3 ± 201,6	0,83 ± 0,23
	NPQT	
0,5 mg/ml	311,3 ± 3,78	0,44 ± 0,01
1,0 mg/ml	315,8 ± 2,13	0,42 ± 0,03
1,5 mg/ml	205,5 ± 1,50	0,41 ± 0,00
2,0 mg/ml	197,7 ± 1,24	0,31 ± 0,00

Fonte: Autoria própria (2024).

De acordo, com a tabela apresentada é possível observar que a concentração de 2,0 mg/mL de TTP de nanopartículas de quitosana pura foi a que formou as NPs com menor tamanho médio e menor índice de polidispersão. Em relação ao DHM das NPQT, igual a 197,7 ± 1,24 nm, os resultados mostram tamanhos menores quando comparado ao estudo realizado por COSTA et al., (2017) com tamanho de 244 ± 12 nm.

Também é possível verificar que o aumento da concentração de TTP interfere no tamanho das nanopartículas obtidas e conseqüentemente, influencia na uniformidade delas. Esta relação ocorre através da ligação do grupamento amina livre da quitosana com o grupamento fosfato do TPP, ou seja, quanto maior a concentração de fosfato disponível no meio, mais interações intramoleculares dos grupamentos, assim diminuindo o tamanho das nanopartículas (COSTA, 2015). Em geral, as NPs variam entre 20 e 200 nm ou 550 e 900 nm, isso varia dependendo da aplicação (RASHKI *et al.*, 2021).

Entretanto, em relação as NPQT/GEN, é possível observar que a concentração com menor tamanho de NPQT/GEN (1,0 mg/mL) apresentou diferença significativa com a solução de NPQT, ou seja, a adição do fármaco ao polímero influenciou o tamanho e a dispersividade das NPs produzidas. Porém, a concentração selecionada foi de NPQT/GEN (0,5 mg/mL) para seguir as próximas análises, pois o DHM dessa concentração 406,6 ± 10,9 mesmo apresentando tamanho diferente quando comparado ao estudo realizado por JI et al (2011) que obteve nanopartículas de quitosana associada a gentamicina de 150.8

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

± 16.9 nm a 343.3 ± 12.4 nm, foi observado na Tabela 1 que essa concentração (0,5 mg/mL) de NPQT/GEN teve o melhor e o menor índice de polidispersão.

Masarudin et al. (2015) afirmam que o PDI é um valor usado para indicar a uniformidade de distribuição das nanopartículas, e seu valor varia de 0 a 1. Valores baixos de PDI indicam distribuição homogênea do tamanho das partículas e uniformidade do diâmetro (MOHAMMADI; HASHEMI; HOSSEINI, 2015). Com relação, ao PDI a amostra de NPQT na concentração de 2,0 mg/mL de TTP apresentou índice com valor 0,3. Segundo, ZHANG, KOSARAJU (2007) e Casara (2019) relatam em seus estudos, que dispersões com PDI abaixo de 0,3 indicam alta homogeneidade e monodispersividade no tamanho das partículas presentes no meio. Fato este, que corrobora com os valores apresentados neste estudo.

Hashad et al. 2016 mostraram um PDI de 0,206-0,511 para NPs de quitosana em respostas as distintas condições usadas nas formulações. Dessa forma, a análise dos valores de PDI das suspensões de nanopartículas sintetizadas neste estudo indica que elas foram monodispersas. No estudo de Castro (2017) observaram que as NPQT/GEN apresentaram polidispersividade alta do que as NPQT sem a presença do antibiótico pôr a concentração ser maior (0,75 mg/mL), indicando que o antibiótico usado altera a distribuição dos diâmetros das partículas em dispersão. Em contrapartida, o resultado do projeto apresentado na Tabela 1 mostrou que houve uma monodispersividade (PDI: 0,27) no tamanho das partículas presentes no meio, com a concentração de 0,5 mg/mL, assim melhorando o trabalho desses autores utilizando a mesma concentração.

Assim, as amostras com concentração de TTP de NPQT e NPQT/GEN, respectivamente 2,0 mg/mL e 0,5 mg/mL se apresentaram como duas condições promissoras para continuidade das análises e aplicabilidade para os ensaios microbiológicos.

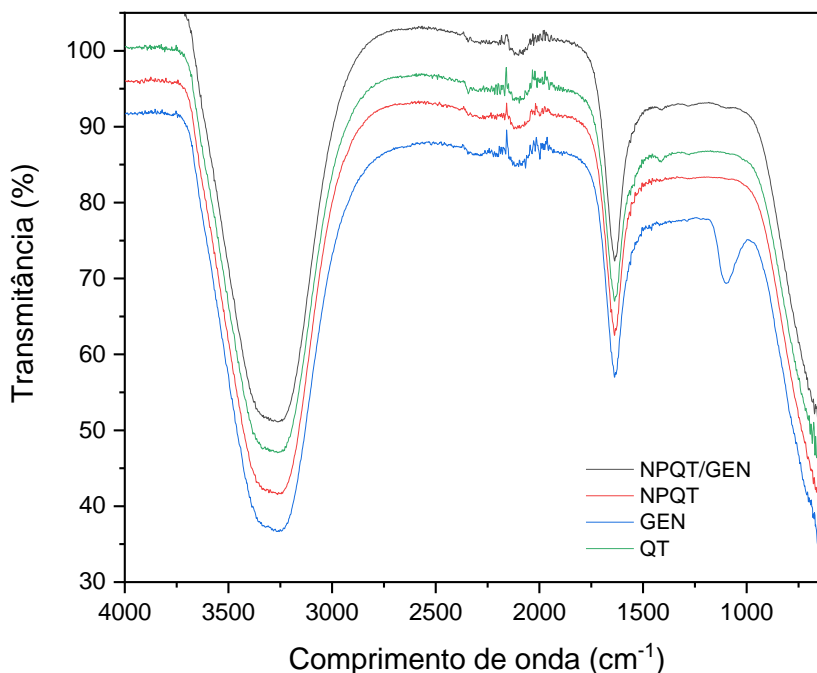
Espectroscopia Vibracional na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectrofotometria por infravermelho das amostras quitosana (QT), NPQT, GEN e NPQT/GEN apresentaram a sobreposição das bandas espectros semelhantes com as bandas específicas, como mostrado na Figura 9. No espectro de quitosana pura se pode observar a presença de bandas intensas e alongadas em $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao estiramento axial das hidroxilas advindas da estrutura molecular da quitosana. No espectro das nanopartículas de quitosana pode se notar que a banda referente ao estiramento OH é mais intensa, sugerindo um aumento na quantidade de hidroxilas no material, provavelmente advindas dos demais componentes utilizados para a síntese das nanopartículas, como a água ou ácido acético (YAN et al., 2019).

Adicionalmente, na gentamicina também é possível observar bandas referentes ao estiramento OH, uma vez que a molécula de sulfato de gentamicina utilizada possui diversas hidroxilas em sua estrutura. A banda em 2875 cm^{-1} é correspondente a deformação axial C-H presente na estrutura da quitosana. A banda atribuída a esse estiramento pode ser verificada nos espectros de QT, nanopartículas de quitosana (NPQT) e nanopartículas de quitosana contendo gentamicina (NPQT/GEN). A formação das nanopartículas pode ser confirmada pelo deslocamento das bandas presentes em 1660 e 1580 cm^{-1} da quitosana para 1640 e 1530 cm^{-1} nos espectros atribuídos as nanopartículas, representando os grupos CO-NH₂ e NH₂, respectivamente. Esse deslocamento nos picos e a mudança de intensidade também pôde ser verificado em outros trabalhos que sintetizaram nanopartículas de quitosana, os quais sugerem que ocorreram ligações entre estes grupos com o fosfato da molécula de TPP, responsável pela formação das nanopartículas. Com relação a formação das NPs associadas a GEN, verifica-se um aumento de intensidade as NPQT/GEN quando comparadas com a intensidade características do fármaco. A ligação do grupamento N-H (1559 cm^{-1}) e C-O (1637 cm^{-1}) são mais intensas nos espectros de NPQT/GEN, sugerindo bandas características de absorção de gentamicina ao polímero, como mostra na Figura 2 (LIU *et al.*, 2017).

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

Figura 2. Resultado espectros de infravermelho das amostras de QT, NPQT, GEN e NPQT-GEN.

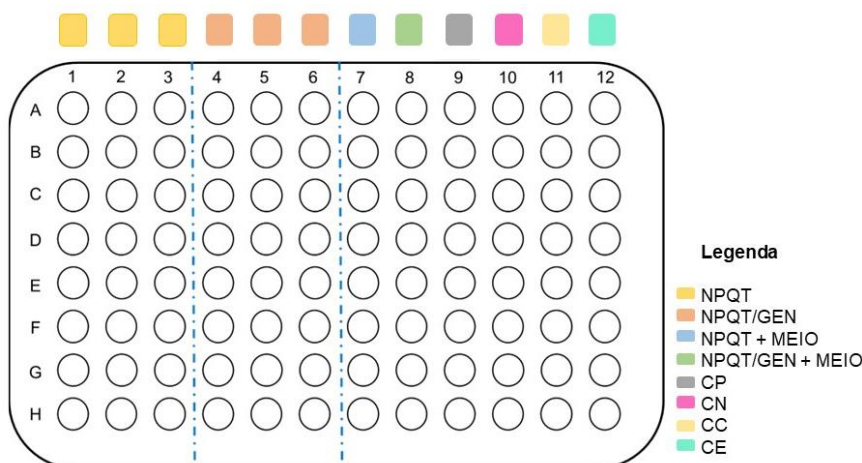


Fonte: Autoria própria (2024).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das NPQT e NPQT/GEN

Os resultados obtidos para CIM demonstraram que as amostras bacterianas apresentaram sensibilidade ao antibiótico utilizado em sua forma livre, a fim de verificar o mecanismo de resistência bacteriana de nanopartículas de quitosana associadas com gentamicina em *Staphylococcus aureus*. No entanto, para a avaliação da atividade antimicrobiana da ação das NPs de QT associadas ou não ao antimicrobiano também, foi realizada pela dosagem da CIM, que de acordo com a Tabela 2 apresenta a eficácia de inibição em suas respectivas concentrações para cada microrganismo. As linhagens foram submetidas sob mesmas condições de temperatura (35 °C) e tempo (24 horas). A menor concentração que inibiu o crescimento de bactérias foi considerada como CIM. A Tabela 2 apresenta a CIM da gentamicina frente as linhagens bacterianas e a atividade antimicrobiana das NPQT e NPQT/GEN. E a Figura 3, representa a distribuição dos testes na placa de microdiluição.

Figura 3. Placa de 96 poços para Teste de Concentração Inibitória Mínima. 1 e 2 (amostras); CP: Controle Positivo (Bactéria + Meio + Gentamicina); CN: Controle Negativo (Bactéria + Água Milli-Q + Meio); CC: Controle de Crescimento (Meio + Bactéria); CE: Controle de Esterilidade (Apenas meio). Fonte: Autoria própria.



Fonte: Autoria própria (2024).

O teste de Concentração Inibitória Mínima da nanopartícula de quitosana pura com concentração de 2,0 mg/mL revelou atividade antimicrobiana para inibição das cepas bacterianas Gram-positivas com resultados de 1 µg/ml para

INTERDISCIPLINARIDADE EM FOCO: DIÁLOGOS ENTRE SAÚDE, EDUCAÇÃO E SOCIEDADE

Staphylococcus aureus ATCC 43300 INCQS 00577 (*MRSA*) e 0,25 µg/ml para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 INCQS 00015 (*MSSA*). Por outro lado, se manteve a ação quando comparado a nanopartícula de quitosana mais o antibiótico com concentração de 0,5 mg/mL que apresentou os melhores resultados de 0,00049µg/ml para *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 INCQS 00577 (*MRSA*) e 0,00024 µg/ml para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 INCQS 00015 (*MSSA*), como pode ser visto na tabela 2 abaixo:

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico livre, das NPQT e NPs carregadas com gentamicina (NPQT/GEN) frente às linhagens de *S. aureus* MRSA (ATCC 43300), *S. aureus* sensível (ATCC 25923).

Linhagem bacteriana	CIM	CIM	CIM
	Gentamicina	NPQT	NPQT/GEN
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>MRSA</i>)	1,25 mg/mL	1mg/mL	0,00049 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>MSSA</i>)	0	0,25 mg/mL	0,00024 mg/mL

Fonte: Autoria própria (2024).

Os resultados obtidos para CIM confirmou que todas as linhagens bacterianas não apresentaram resistência ao antibiótico em sua forma livre. Entretanto, há possibilidade que ao serem carregados com o fármaco apresentem um efeito sobre os microrganismos em modo planctônico, bem como nos sésseis (GASPAR, 2018). De acordo, com o estudo realizado neste trabalho, foi encontrado valores maiores de CIM das NPQT. Este evento pode estar relacionado com o grau de desacetilação, massa molar do polímero e tamanho da partícula podem interferir na atividade antimicrobiana (COSTA, 2015).

Para as NPQT associadas a GEN (NPQT/GEN) as concentrações de inibição foram reduzidas e distintas em relação as NPQT frente aos microrganismos. Infere-se que o fármaco associado ao polímero otimizou a ação inibitória. Contudo, ao relacionar as NPQT/GEN a ação inibitória do fármaco livre, pode-se observar que a *Staphylococcus aureus* (*MSSA*) obteve melhor resultado (0,00024 mg/mL) quando este foi associado a nanopartícula. Para a linhagem resistente a MRSA foi verificado que o crescimento bacteriano na concentração 0,00049 mg/mL, ou seja, o fármaco em sua forma livre apresentou menor valor de inibição. Estudos definem que gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos e inibe o crescimento de diversas espécies de bactérias (gram negativas e positivas) e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica dos microrganismos (YAN et al., 2019).

A literatura explica que as NPs possuem uma maior área superficial e maior afinidade com as células bacterianas (NEVES, 2013). Este mecanismo é devido ao fato de que os grupos amino carregados positivamente podem acometer diretamente a membrana celular com carga negativa da bactéria via atração eletrostática, interferindo na atividade celular e permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares com consequente inibição do crescimento microbiano, o que é diferente das interações alvo-específicas dos antimicrobianos convencionais (CHABALA; CUARTAS; LÓPEZ, 2017; YAN et al., 2019).

Embora o mecanismo antimicrobiano exato da quitosana e seus derivados ainda não seja totalmente compreendido, várias hipóteses sobre o mecanismo de ação foram propostas e aceitas. Sendo que a hipótese mais viável é que os grupos amina carregados positivamente (NH^{3+}) da glucosamina interagem com a superfície carregada negativamente das bactérias, causando vazamento de constituintes intracelulares que causa em morte celular. Assim, os agentes antibacterianos carregados positivamente podem danificar as membranas celulares (SOBHANI et al., 2017; KRAVANJA et al., 2019; RASHKI et al., 2021).

A CIM possui alta relevância para medicina pois, permite identificar a quantidade do fármaco adequado que o paciente deverá ser submetido. O primeiro passo na investigação e desenvolvimento de um diagnóstico adequado passa pela determinação da MIC de cada antibiótico direcionado ao tratamento. Geralmente, esta técnica caracteriza o ponto de partida da maioria das avaliações pré-clínicas de novos agentes antimicrobianos (GUTIÉRREZ et al., 2019).

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que, este estudo apresentado, revela condições favoráveis para a produção de nanopartículas de quitosana incorporadas à gentamicina (0,5 mg/mL de TTP). As análises por DLS demonstraram regularidades no tamanho das partículas de QT pura e carregadas com o fármaco (197,7 nm e 406 nm, respectivamente), com PDI monomodal (0,31 e 0,27). O FTIR apresentou bandas mais intensas nas regiões entre 3000 - 3500 e o surgimento de bandas entre 1640 - 1530 cm^{-1} , sugerindo o aumento de interações químicas e formação das nanopartículas e, ainda confirmou o aumento de intensidade das bandas em 1559 - 1637 cm^{-1} nas NPs. Com relação as análises microbiológicas, as NPQT/GEN apresentaram resultados promissores frente as linhagens bacterianas.

REFERÊNCIAS

- ALFARO-VIQUEZ, E. Antimicrobial proanthocyanidin-chitosan composite nanoparticles loaded with gentamicin. **Int J Biol Macromol**, v. 16, p. 1500-1508, 2020.
- ALQAHTANI, F. Y.; ALEANIZY, F. S.; TAHIR, E. El; ALQUADEIB, B. T.; ALSARRA, I. A.; ALANAZI, J. S.; ABDELHADY, H. G. Preparation, characterization, and antibacterial activity of diclofenac-loaded chitosan nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 1, p. 82–87, 2019.
- BADAWY, M. E.I. Structure and antimicrobial comparison between N-(benzyl) chitosan derivatives and N-(benzyl) chitosan triphosphate nanoparticles against bacteria, fungi, and yeast. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-11, 15 jul. 2021.
- CASARA, F. **Investigação do potencial amebicida do extrato bruto e compostos isolados de Eugenia hiemalis frente a Acanthamoeba spp.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2019.
- CASTRO, K. C. **Síntese de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de antibiótico no tratamento de mastite.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alfenas, 2017.
- CHABALA, L. F. G.; CUARTAS, C. E. E.; LÓPEZ, M. E. L. o. Release behavior and antibacterial activity of chitosan/alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles. **Marine Drugs**, v. 15, n. 10, 2017.
- COSTA, B. P. **Síntese, caracterização e efeito inibitório da solução de nanopartículas de quitosana na aderência e no biofilme maduro de Streptococcus mutans.** Universidade Federal da Paraíba, 2015.
- GAMAAN, Manar A.; ZAKY, Heba S.; AHMED, Hebatalla I. Gentamicin-induced nephrotoxicity: A mechanistic approach. **Azhar International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 11-19, 2023.
- GASPAR, L. M. D. A. C. Desenvolvimento de nanocarreadores poliméricos para a desestruturação de biofilmes de agentes patogênicos. **Universidade Tiradentes**, 2018.
- GUTIÉRREZ, J. O. D.; LÓPEZ, S. Y. R.; GONZÁLEZ, J. C. C.; CORNEJO, A. D.; MARTÍNEZ, S. D. N.; CRISTOBAL, L. F. E. Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata en placa dentobacteriana aislada de pacientes. **Revista mexicana de medicina forense y ciencias de la salud**. Instituto de medicina forense da Universidade de Vera Cruz Ana, 2019.
- HASHAD, R. A.; ISHAK, R. A.; FAHMY, S.; MANSOUR, S.; GENEIDI, A. S. Chitosan-triphosphate nanoparticles: Optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. **International journal of biological macromolecules**, v. 86, p. 50-58, 2016.
- KRAVANJA, G.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Chitosan-based (Nano) materials for novel biomedical applications. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1960, 2019.
- LI, T.; WANG, Z.; GUO, J.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; WANG, J.; HAN, B.; TAO, H.; LIU, J.; WANG, X. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. **Science of The Total Environment**, v. 860, p. 160461, 2023.
- LIU, Y.; JI, P.; LV, H.; QIN, Y.; DENG, L. Gentamicin modified chitosan film with improved antibacterial property and cell biocompatibility. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p.550–556, 2017.
- MASARUDIN, M. J.; CUTTS, S. M.; EVISON, B. J.; PHILLIPS, D. R. E.; PIGRAM, P. J. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. **Nanotechnology, science and applications**, v. 8, p. 67, 2015.
- MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E.; PEPPAS, N. A.; LANGER, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nat Rev Drug Discov**, p. 1-24, 4 out, 2020.

- MODI, S. K.; GAUR, S.; SENGUPTA, M.; SINGH, M. S. Mechanistic insights into nanoparticle surface-bacterial membrane interactions in overcoming antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1135579, 2023.
- MOHAMMADI, A.; HASHEMI, M.; HOSSEINI, S. M. Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling Botrytis cinerea, the causal agent of gray mould disease. **Innovative food science & emerging technologies**, v. 28, p. 73-80, 2015.
- NEVES, A. L. P. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. **Universidade federal de santa catarina centro tecnológico**, 2013.
- PAYNE, J. A.; TAILHADES, J.; ELLETT, F.; KOSTOULIAS, X.; FULCHER, A. J.; FU, T.; LEUNG, R.; LOUCH, S.; TRAN, A.; WEBER, S. A.; SHITTENHELM, R. B.; LIESCHKE, G. J.; QUIN, H. C.; IRIMA, D.; PELEG, A. Y.; CRYLE, M. J. Antibiotic-chemoattractants enhance neutrophil clearance of Staphylococcus aureus. **Nat Commun**, 2021.
- PFALLER, M. A.; CARVALHAES, C. G.; SMITH, C. J.; DIEKEMA, D. J.; CASTANHEIRA, M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012–2017). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 97, n. 2, p. 115016, 2020.
- Rashki, S.; Asgarpour, K.; Tarrahimofrad, H.; Hashemipour, M.; Ebrahimi, M. S.; Fathizadeh, H.; KHORSHIDI, A.; KHAN, H.; MARZHOSEYNI, Z.; NIASARI-SALAVATI, M.; MIRZAEI, H. Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117108, 2021.
- SHREE, P.; SINGH, C. K.; SODHI, K. K.; SURYA, J. N.; SINGH, D. K. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. **Medicine in Microecology**, p. 100084, 2023.
- SIMPSON, E.; SARWAR, H.; JACK, I.; LOWRY, D. Evaluation of the Potential of Chitosan Nanoparticles as a Delivery Vehicle for Gentamicin for the treatment of Osteomyelitis. **Antibiotics**, v. 13, n. 3, p. 208, 2024.
- SOBHANI, Z.; SAMANI, S. M.; MONTASERI, H.; KHEZRI, E. Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: fabrication and antimicrobial activity. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 7, n. 3, p. 427, 2017.
- VIEIRA, F. S. **Evolução do gasto com medicamentos do Sistema Único de Saúde no período de 2010 a 2016**. Textos para discussão. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, 2018.
- WANG, W.; SUN, B. VraCP regulates cell wall metabolism and antibiotic resistance in vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain Mu50. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, p. 1712–1723, 2021.
- WANG, W.; MENG, Q.; LI, Q.; LIU, J.; ZHOU, M.; JIN, Z.; ZHAO, K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. **Int J Mol Sci**, p. 1-26, 2020.
- YAN, T.; LI, C.; OUYANG, Q.; ZHANG, D.; ZHONG, Q.; LI, P.; LI, S.; YANG, Z.; WANG, T.; ZHAO, Q. Synthesis of gentamicin-grafted-chitosan with improved solubility and antibacterial activity. **Reactive and Functional Polymers**, v. 137, p. 38–45, 2019.
- ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European polymer journal**, v. 43, n. 7, p. 2956-2966, 2007.