

Cristiana Sousa Pinheiro

# NANOTECNOLOGIA: SOLUÇÃO ÀS RESISTÊNCIAS BACTERIANAS

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cristiana Sousa Pinheiro

# NANOTECNOLOGIA: SOLUÇÃO ÀS RESISTÊNCIAS BACTERIANAS

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*The future belongs to those who believe in the beauty of their dreams.*

*Eleanor Roosevelt*

Eu, Cristiana Sousa Pinheiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011164797, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 16 de setembro de 2016.

---

(Cristiana Sousa Pinheiro)

## **AGRADECIMENTOS**

Um agradecimento especial ao **Professor Doutor Luís Loura** por toda a ajuda e paciência  
nesta etapa final.

À **minha família** que sempre acreditou em mim e que permitiu para que tudo se  
concretizasse.

Ao **Gossip & Friends** pela amizade e por todos os momentos partilhados.

A **Coimbra** e à **Faculdade de Farmácia**, por tudo o que me ensinou nestes 5 anos, e  
onde passei uns dos melhores momentos da minha vida.

## **RESUMO**

O uso incorreto e excessivo de antibióticos, tem conduzindo a uma crescente resistência bacteriana, que se tem tornado numa preocupação global. Conseqüentemente, são necessárias novas alternativas aos antibióticos de modo a ultrapassar esta crise. A área da Nanotecnologia tem revolucionado este problema, por conseguir aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os seus efeitos secundários devido às suas propriedades físico-químicas.

Este trabalho faz uma abordagem de alguns dos tipos principais de nanopartículas e das suas características, ilustrando como exemplo as últimas pesquisas e avanços desta área para superar a resistência. Refere, ainda, as dificuldades existentes para a entrada no mercado, apesar da sua considerável investigação académica.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia; nanopartículas; resistência bacteriana; antibióticos, mercado.

## **ABSTRACT**

The improper use and overuse of antibiotics, has led to an increase of bacterial resistance, which has become a global concern. Therefore, new alternatives to antibiotics are needed to overcome this crisis. Nanotechnology has revolutionized this problem, because it is able to increase the effectiveness of treatment and reduce side effects due to their physicochemical properties.

This monograph addresses the use of nanoparticles, describing some of their main types and features, illustrating with selected examples the latest research and advances in this area to overcome the bacterial resistance. Likewise, it mentions the difficulties of market access, despite its considerable academic research.

**Keywords:** Nanotechnology; nanoparticles; bacterial resistance; antibiotics, market access.

## **ÍNDICE**

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	3
2.1. COMO AS BACTÉRIAS SE TORNAM RESISTENTES.....	3
3. INTERESSE TERAPÊUTICO DAS NANOPARTÍCULAS .....	4
3.1. COMO ATUAM AS NANOPARTÍCULAS.....	6
3.2. NANOPARTÍCULAS - AGENTES TERAPÊUTICOS .....	7
3.2.1. NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	7
3.2.2. NANOPARTÍCULAS COMO VEÍCULOS TRANSPORTADORES DE ANTIBIÓTICOS .....	8
3.3. FARMACOCINÉTICA.....	13
3.4. APLICAÇÕES.....	14
3.4.1. DISPOSITIVOS MÉDICOS COM NANOPARTÍCULAS.....	14
3.5. CITOTOXICIDADE.....	15
3.5.1. CITOTOXICIDADE DA PRATA.....	15
3.5.2. ESTRATÉGIA PARA DIMINUIÇÃO DA TOXICIDADE POR AGNPs .....	16
3.6. CONTROLO DE QUALIDADE – A ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	17
4. ENSAIOS CLÍNICOS E DIFICULDADES NA INTRODUÇÃO NO MERCADO .....	17
5. CONCLUSÃO .....	18
6. BIBLIOGRAFIA .....	19

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AgNPs** – Nanopartículas de prata

**CF** – Fibrose Cística

**CTS-Ag NPs** – Nanopartículas de prata imobilizadas em quitosano

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid*

**DPPC** – Dipalmitoilfosfatidilcolina

**FDA** – Food and Drug Administration

**FLs** – Lipossomas fusogénicos

**FUS** – Ácido Fusídico

**MDR** – *Multi-drug-resistance*

**MIC** – Concentração mínima inibitória

**MRSA** – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

**MSSA** – *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*

**NPs** – Nanopartículas

**PAA** – Poliacrilato

**PEG** – Polietileno glicol

**PLGA** – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

**PBPs** – *Penicillin Binding Proteins*

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio

**WHO** – World Health Organization

**RNA** – *Ribonucleic acid*



## **I. INTRODUÇÃO**

As infecções bacterianas são, ainda, das maiores causas de morbidade e de mortalidade na atualidade, causando cerca de 300 milhões de casos críticos todos os anos (BEYTH *et al.*, 2015; GUPTA, LANDIS e ROTELLO, 2016). Apesar de terem sido desenvolvidas diversas gerações de antibióticos, a resistência antimicrobiana tem-se tornado cada vez mais numa importante ameaça contra a saúde pública, devido ao abuso e uso incorreto de antibióticos (CHEN *et al.*, 2014). Deste modo, o aumento de bactérias multi-resistentes (MDR) a antibióticos convencionais e de infecções associadas à formação de biofilmes, bem como a diminuição de antibióticos aprovados recentemente, tornaram urgente a necessidade de desenvolver estratégias alternativas para o combate a resistências (BEYTH *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2014; GUPTA, LANDIS e ROTELLO, 2016; SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016; ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).

Adicionalmente, as limitações da terapêutica convencional como a biodisponibilidade limitada, solubilidade reduzida, acumulação inespecífica do fármaco, difícil transporte através da membrana de modo a alcançar micro-organismos intracelulares e ainda rápida degradação, requerem que novas soluções sejam descobertas (ZHANG *et al.*, 2010).

O uso da Nanotecnologia encontra-se, assim, entre as estratégias mais promissoras para ultrapassar a resistência antimicrobiana, bem como as limitações da terapêutica convencional. Neste contexto, devido às suas características únicas podem ser usadas nanopartículas (NPs) estrategicamente com atividade antimicrobiana ou como veículos transportadores de antibióticos (BEYTH *et al.*, 2015; GUPTA, LANDIS e ROTELLO, 2016; PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).

Este trabalho descreve o potencial do uso de NPs no combate à resistência a antibióticos, abordando o seu modo de ação, as suas vantagens e desvantagens e as dificuldades existentes para a sua introdução no mercado.

## 2. RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

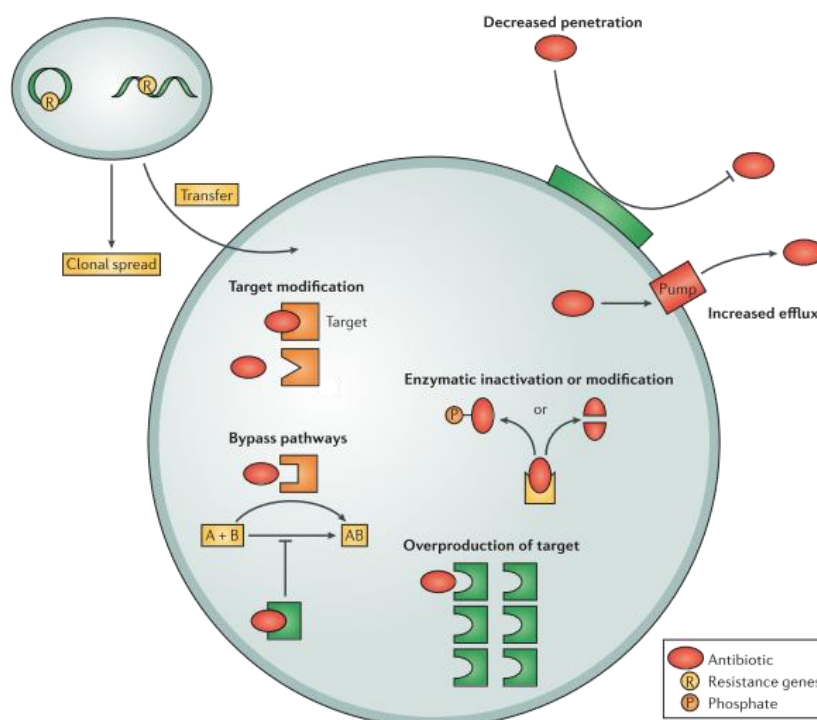
De acordo com a definição da WHO, uma estirpe é considerada resistente quando deixa de responder ao tratamento e conseqüentemente, torna-se difícil de tratar a infecção e parar a sua disseminação (ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).

Deve-se ter em atenção, ainda, que o facto de uma bactéria ser resistente a um dado antibiótico não significa que tenha parado de responder ao tratamento, mas que responde apenas a concentrações mais elevadas (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016).

### 2.1. COMO AS BACTÉRIAS SE TORNAM RESISTENTES

A resistência antimicrobiana pode ser natural ou adquirida (VENTOLA, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycoplasma* são dois exemplos de bactérias com resistência intrínseca/natural a certos antibióticos como macrólidos e  $\beta$ -lactâmicos, respetivamente. Por outro lado, a resistência adquirida ocorre por mutações espontâneas que surgem durante o crescimento. Estas mutações podem ser transmitidas para organismos sensíveis através de mecanismos de transferência horizontal: transformação; transdução e conjugação (HENRIQUES NORMARK e NORMARK, 2002).

Os principais mecanismos de resistência encontram-se representados na figura abaixo (Figura 1):



**Figura 1. Principais mecanismos de resistência.**

A diminuição da entrega do agente antimicrobiano deve-se a diversos fatores como a diminuição da permeabilidade da membrana, presença de bombas de efluxo, inativação enzimática, superprodução ou modificação do alvo. Retirados de LEWIS, 2013.

- i. Diminuição da absorção do fármaco por mutação de porinas;
- ii. Aumento de bombas de efluxo;
- iii. Alteração do alvo do fármaco – ex. mutações em proteínas ribossomais; alteração de *Penicillin Binding Proteins* (PBPs);
- iv. Inativação dos fármacos através de enzimas como  $\beta$ -lactamases ou acetilases;
- v. Formação de biofilmes – aglomerados de bactérias que aderem a um substrato e que tornam a bactéria inacessível a antibióticos;
- vi. Bactérias intracelulares – bactérias que se hospedam em organelos intracelulares, protegendo-se de fármacos antibacterianos devido à fraca capacidade de estes entrarem na célula hospedeira (BEYTH *et al.*, 2015; HENRIQUES NORMARK e NORMARK, 2002; LEWIS, 2013; PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).

Por conseguinte, tem-se recomendado recentemente o direcionamento da investigação segundo o objetivo de resolver os mecanismos descritos anteriormente e de aumentar a eficácia do fármaco através de sistemas de entrega do antibiótico para o local da infeção (ZAZO, COLINO e LANA O, 2016).

### **3. INTERESSE TERAPÊUTICO DAS NANOPARTÍCULAS**

Como referido anteriormente, surgiu um particular interesse nas NPs devido às suas propriedades físico-químicas únicas, tais como o seu tamanho reduzido, forma, relação superfície/massa favorável e reatividade elevada. Estas propriedades contribuem para uma maior facilidade de administração de antibióticos, ultrapassando, conseqüentemente algumas das limitações da terapêutica de antibióticos convencionais, já descritas anteriormente (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016).

As NPs podem apresentar atividade antimicrobiana, quer por elas próprias quer por formulação juntamente com antibióticos (HUH e KWON, 2011).

NPs de metal – **inorgânicas** (por exemplo prata) – são conhecidas pelo seu efeito antibacteriano natural, por exibirem propriedades bactericidas através da formação de espécies reativas de oxigénio (LOOMBA e SCARABELLI, 2013). Outro mecanismo conhecido, já referenciado, é o facto de este tipo de nanopartículas, ao ser incorporado na membrana celular da bactéria, provocar uma perturbação na célula, podendo levar à morte celular (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016).

NPs **orgânicas** (por exemplo lipossomas e polímeros) apresentam a vantagem de serem moléculas biodegradáveis e de disporem elevada compatibilidade com o organismo humano

(FORIER et al., 2014; XIE et al., 2014). No entanto, sua estabilidade, principalmente a dos lipossomas, deve-se ter em consideração por ser um fator crítico para uma maior biodisponibilidade do fármaco (XIE et al., 2014).

A formulação de fármacos com atividade antimicrobiana, tanto com NPs metálicas como com NPs orgânicas tem mostrado características promissoras como aumento da ação farmacológica (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016) e diminuição da toxicidade do fármaco.

A tabela seguinte descreve as potenciais vantagens promissoras da utilização de ambos os tipos de NPs como agentes antibacterianos.

**Tabela 1.** Descrição das vantagens e desvantagens inerentes ao uso de nanopartículas como agentes terapêuticos no tratamento de infecções bacterianas. Texto adaptado de HUH e KWON, 2011.

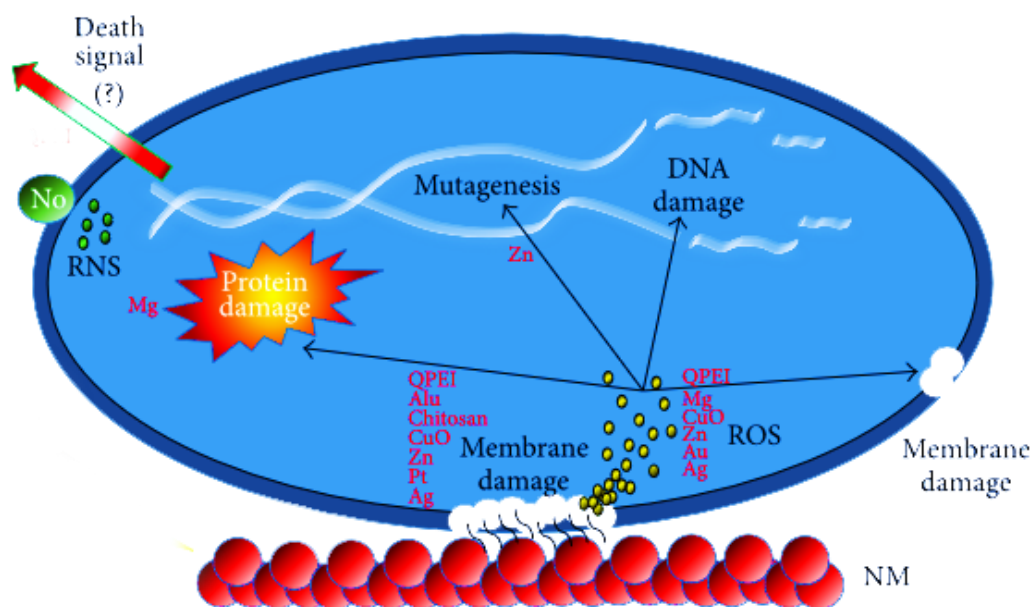
<b>NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS</b>	
<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
Entrega do fármaco ao local da infecção por estímulos (pH, temperatura, químicos)	Acumulação de NPs administrados por via intravenosa
Diminuição dos efeitos secundários associados ao antibiótico	Elevada exposição ao fármaco no local de entrega
Diminuição da resistência antimicrobiana	Citotoxicidade (pulmões, rins, fígado, cérebro, etc.)
Aumento do tempo de semivida do fármaco	
Libertação controlada do fármaco	
Maior solubilidade	

Pode se concluir que, no combate a infecções com o auxílio de NPs, a terapia com auxílio de NPs é vantajosa por estas conseguirem direcionar o fármaco ao local da infecção com uma maior biodisponibilidade do que a terapia convencional, o que contribui para uma diminuição dos efeitos secundários dos antibióticos e proteger bactérias que são benéficas ao organismo humano (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016; ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).

### 3.1. COMO ATUAM AS NANOPARTÍCULAS

Uma vez que as NPs atuam através de múltiplos mecanismos, simultaneamente, a resistência antibacteriana torna-se pouco provável, porque requeria que a bactéria sofresse diversas mutações ao mesmo tempo (PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).

Mecanismos de ação das nanopartículas (Figura 2):



**Figura 2. Mecanismo antimicrobiano das nanopartículas.** Esquema geral do modo de ação das NPs. Interação eletrostática entre NPs e a membrana celular, originando desintegração celular ou danos a nível dos componentes celulares. Também é frequente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são tóxicas tanto para células procariontas como eucariotas. Imagem adaptada de BEYTH *et al.*, 2015.

- i. **Alteração do potencial de membrana e perda da sua integridade** – quando as nanopartículas se ligam electrostaticamente à parede celular, há uma alteração do potencial de membrana (despolarização) e deste modo, uma perda de integridade celular que resulta na lise da célula e numa provável morte celular (PELGRIFT e FRIEDMAN, 2013).
- ii. **Produção de ROS** – a interação NP-membrana induz a uma formação de radicais livres (ROS). Estas espécies provocam stress oxidativo que conduz a um dano a todos os componentes celulares, incluindo peroxidação de lípidos, alteração de proteínas, inibição de enzimas, danos a nível do DNA e RNA, bem como mutações (WANG *et al.*, 2011; PAN *et al.*, 2010).

## 3.2. NANOPARTÍCULAS - AGENTES TERAPÊUTICOS

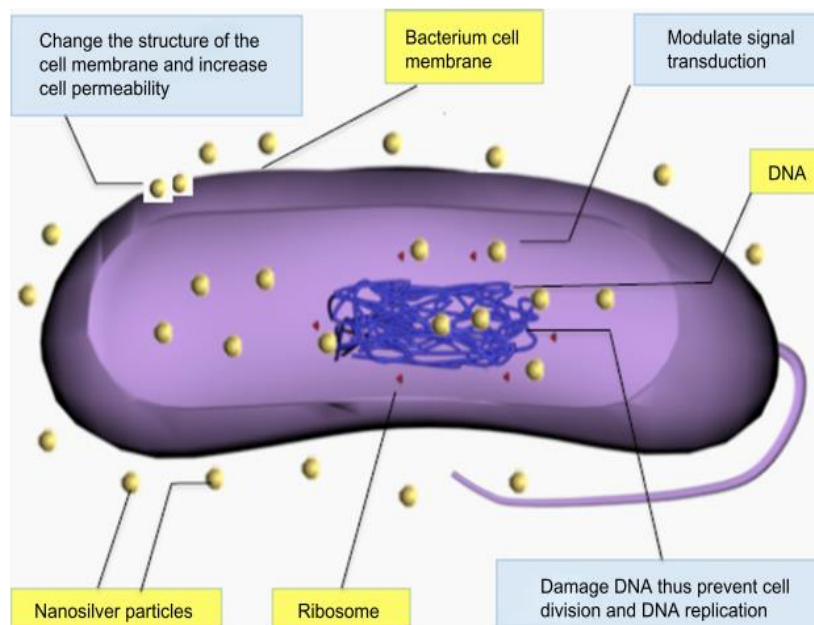
### 3.2.1. NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

#### a. Prata – AgNPs (Nanopartícula inorgânica)

Na medicina, a prata tem sido amplamente utilizada para desinfecção de dispositivos médicos, bem como, para o tratamento de queimaduras, feridas e para uma variedade de doenças infecciosas (AVALOS *et al.*, 2016) devido à sua atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-inflamatória (GE *et al.*, 2014).

AgNPs apresentam um largo espectro para bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e ainda para estirpes resistentes. No entanto, KIM *et al.* (2007), ao testar nanopartículas de prata em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, descobriram que havia diferenças nos resultados. O crescimento de *E. coli* era inibido efetivamente, enquanto que em *S. aureus* a inibição verificou-se menos eficaz. Estes resultados sugerem que as diferenças morfológicas destas duas estirpes podem influenciar a ação destas nanopartículas.

O mecanismo por qual atuam ainda não se encontra totalmente conhecido, contudo, conhece-se possíveis modos de ação (Figura 3):



**Figura 3. Mecanismo de ação de AgNPs.** NPs de prata podem atuar aumentando a permeabilidade celular, por interação com o DNA e por modulação do perfil das proteínas bacterianas. Imagem retirada de GE *et al.*, 2014.

- i. AgNP pode aderir à membrana celular aumentando a permeabilidade celular (SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004);
- ii. Formação de radicais livres (KIM *et al.*, 2007);
- iii. A liberação de íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) contribui para a interação destes com enzimas essenciais à bactéria, bem como, com grupos fosfato do DNA, impedindo a divisão celular e consequentemente a replicação (MATSUMURA *et al.*, 2003);
- iv. Modulação da transdução de sinal, interferindo nos perfis de fosforilação de tirosina de proteínas bacterianas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2007).

b. **Quitosano** (Nanopartícula orgânica)

O quitosano é um biopolímero polissacarídeo catiónico, obtido pela quitina extraída de exosqueletos de crustáceos (FORIER *et al.*, 2014).

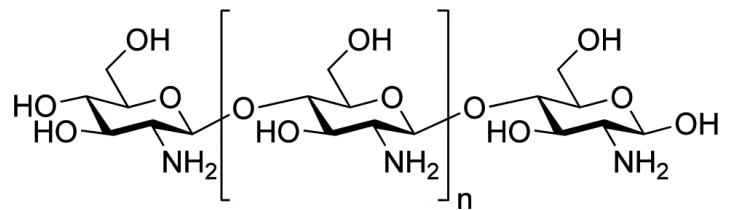


Figura 4. Estrutura química do Quitosano.

Devido à sua natureza não tóxica,

biodegradável, biocompatível e às suas propriedades antimicrobianas intrínsecas, o quitosano pode ser utilizado para revestimento das NPs (HUSSEIN-AL-ALI *et al.*, 2014). A sua atividade antimicrobiana deve-se à ligação eletrostática com a membrana da bactéria causando agregação e liberação do seu meio intracelular da para o exterior (FORIER *et al.*, 2014).

No entanto, como já foi referido anteriormente, também é possível associar antibióticos com este polímero, melhorando o perfil antibacteriano de ambos (ver seção 3.3.2. b.).

### 3.2.2. NANOPARTÍCULAS COMO VEÍCULOS TRANSPORTADORES DE ANTIBIÓTICOS

O facto de ser possível introduzir na mesma partícula, mais que um agente antimicrobiano, pode resultar em maior potência, maior eficácia antimicrobiana, para além de uma maior probabilidade de ultrapassar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias (PELGRIFT E FRIEDMAN, 2013). Isto porque, como referenciado anteriormente, a associação entre NPs e antibióticos existentes permite uma maior biodisponibilidade de fármaco do que seria possível apenas com administração do antibiótico (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016).

Adicionalmente, outro desafio no tratamento de infeções bacterianas por antibióticos é a necessidade de desenvolver agentes que consigam ser direcionados especificamente para o local da infeção em regiões do corpo onde fármacos hidrofílicos têm pouco acesso e

fármacos hidrofóbicos apresentam fraca solubilidade e biodisponibilidade (TUROS *et al.*, 2007). Assim, a entrega destes fármacos por lipossomas e polímeros torna-se promissora.

a. **LIPOSSOMAS** – Como a sua estrutura consiste numa bi-camada fosfolipídica (Figura 5), os lipossomas são das nanopartículas mais utilizadas como transportadores de fármacos, uma vez que a sua estrutura lipídica mimetiza a membrana celular, conseguindo rapidamente fundir com as membranas de agentes infecciosos (ZHANG *et al.*, 2010). Este tipo de nanopartículas tem ainda particular interesse por poder conter compostos tanto hidrófilos como hidrófobos (NICOLOSI *et al.*, 2015). Contudo, a sua estabilidade na corrente sanguínea é reduzida, pelo que a entrega de fármaco se encontra comprometida. Uma forma de ultrapassar o problema passará pela conjugação de, por exemplo, polietileno glicol (PEG) ou de ligandos, à superfície. (ZHANG *et al.*, 2010).

a.1. **ESTUDOS** – Foram realizados estudos *in vitro* de forma a confirmar as possibilidades terapêuticas futuras das NPs descritas. No entanto, é de realçar que estes são meramente ilustrativos, e que mais existem descritos na literatura.

#### **ESTUDO I:**

Ácido Fusídico (FUS) é um antibiótico bacteriostático com espectro para bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis*, incluindo MRSA. No entanto, a redução da permeabilidade das membranas celulares tornou-se um mecanismo de resistência a este antibiótico (NICOLOSI *et al.*, 2015).

Um estudo foi realizado por NICOLOSI *et al.* (2015) conjugando FUS em lipossomas fusogénicos (FLs). FLs são vesículas fosfolipídicas que pela sua constituição lipídica têm a capacidade de destabilizar as membranas celulares fundindo-se com estas. Por conseguinte, FUS é libertado no meio intercelular, ao contrário do que se verificaria se fosse administrado na sua forma livre, em que ficaria retido na membrana bi-lipídica.

Foram usadas 25 de estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de casos clínicos. Adicionaram-se em 3 meios previamente preparados 100 µl de FUS – *loaded fusogenic* (**FLI**) ou 100 µl de lipossomas convencionais com ácido Fusídico (**CLI**) ou 100 µl de **FUS** livre, e 5 µl de uma suspensão bacteriana. Posteriormente, os meios foram incubados a 37°C durante 24h.

**Nota:** Em meios com estirpes Gram-negativas não foram adicionadas concentrações de FUS livre, uma vez que este não apresenta atividade antimicrobiana contra estas.

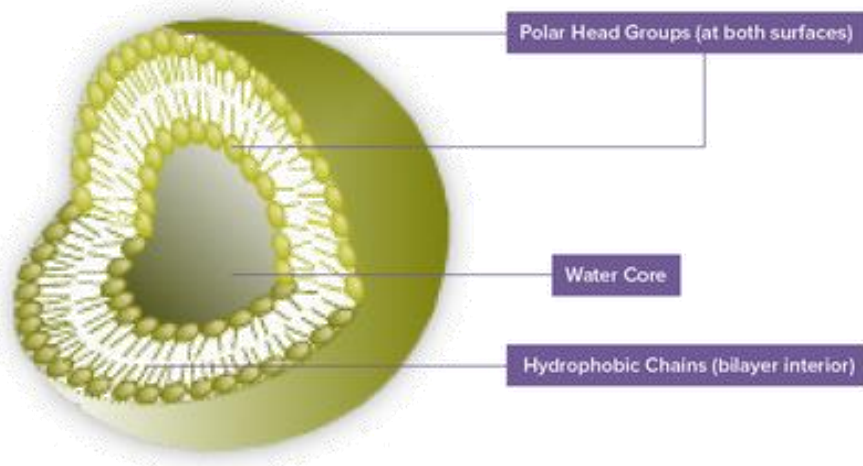


**Resultados:** Nos meios em que se adicionou **CLI**, verificou-se concentrações mínimas inibitórias (MIC) elevadas tanto para Gram-positivo como Gram-negativo. Por outro lado, quando o antibiótico era conjugado em FLs, este exibia atividade contra ambas as estirpes. Os resultados experimentais permitem concluir que a propriedade fusogênica das vesículas fosfolipídicas auxilia a entrada do fármaco no meio intracelular, havendo um progresso na atividade antibacteriana.

### ESTUDO 2:

A Fibrose cística (CF) é uma doença hereditária causada por uma mutação genética. Cerca de 80% dos doentes com CF sofrem de infecções pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar da terapêutica por inalação de antibióticos, estudos sobre a função pulmonar destes pacientes comprovaram a necessidade de novos tratamentos para tratar a infeção por *Pseudomonas* (CLANCY *et al.*, 2013).

Uma possível solução baseia-se na formulação de lipossomas para inalação. Na constituição destes lipossomas deve constar lípidos como colesterol e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), uma vez que estes são constituintes naturais do surfactante pulmonar (MEERS *et al.*, 2008).



**Figura 5. Lipossoma como sistema de entrega de fármacos ao local da infeção.** Nesta figura encontra – se representado um lipossoma com a sua estrutura bi-lipídica e núcleo hidrofílico. Imagem retirada de Insmad – Arikayce (Lipossomal Amikacin for inhalation), 2015.

- **ESTUDO 2.1:** Um estudo realizado por MEERS *et al.* (2008) utilizou uma formulação destes lipossomas conjugados com amicacina (**Arikace™**). O objetivo era investigar a capacidade destes de penetrar através do biofilme formado em doentes com CF com infeção crónica por *P. aeruginosa*, e de identificar o fator que permite que esta formulação seja direcionada ao local da infeção.

Verificou-se, numa amostra *in vivo* saudável (em pulmões de rato) que após a administração de lipossomas conjugados com antibiótico, este não é libertado de imediato, havendo uma libertação gradual. Adicionalmente, a libertação de fármaco é mediada por ramnolípidos (classe de glicolípidos produzidos por *P. aeruginosa*, reconhecidos como fatores de virulência produzidos por esta bactéria). Em pulmões infetados, conclui-se que a amicacina conjugada com lipossomas é mais eficaz no tratamento do que esta sozinha.

- **ESTUDO 2.2: Estudos de fase II** foram realizados por CLANCY *et al.* (2013) com o objetivo de determinar a segurança e eficácia de **Arikace™**:

**Tabela 2.** Descrição do ensaio clínico de fase II com Arikace™. Texto adaptado de CLANCY *et al.*, 2013.

ENSAIO CLÍNICO DE FASE II – ARIKACE	
Método	105 doentes foram sujeitos a um ensaio duplamente-cego com Arikace ou com placebo.
Doentes	Necessário diagnóstico de CF com infeção crónica por <i>P. aeruginosa</i> , sem conhecida alergia à amicacina.
Estudo	Foram administrados 560 mg diariamente durante seis ciclos de 28 dias, com intervalo de 56 dias entre cada um deles.
Resultados	<p><u>Segurança:</u> formulação bem tolerada durante os seis ciclos de tratamento; sem observação de efeitos adversos inesperados.</p> <p><u>Eficácia:</u> diminuição da densidade do biofilmes após os seis ciclos; função pulmonar melhorada.</p>

b. **NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS** – A utilização deste tipo de nanopartículas como transportadores de fármacos apresenta vantagens como estabilidade estrutural em fluidos biológicos (HUH e KWON, 2011) e baixo risco de toxicidade, uma vez que são facilmente excretadas pelo organismo (YOKOYAMA, 2014).

#### b.1. ESTUDOS

##### ESTUDO I – QUITOSANO:

TIN *et al.* (2009) realizou um estudo associando um antibiótico ao polímero quitosano. Os resultados obtidos comprovaram que a formulação de NPs com antibiótico e revestimento com quitosano permite que uma menor concentração de ambos os constituintes seja necessária, melhorando, no entanto, a atividade do fármaco contra estirpes resistentes, como *P. aeruginosa*. Conclui-se que esta associação poderá ser uma alternativa promissora nas situações em que a terapêutica existente deixa de apresentar resultados positivos. Estudos futuros *in vivo* são necessários com outras classes de antibióticos de modo a validar os resultados obtidos *in vitro*.

##### ESTUDO 2:

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é um dos maiores responsáveis por infecções adquiridas em meio hospitalar, sendo *Staphylococcus aureus* resistente devido à produção de enzimas ( $\beta$ -lactamases) que hidrolisam o fármaco (TUROS *et al.*, 2007).

Deste modo, foi realizado um estudo por TUROS *et al.* (2007) em que se procedeu à síntese de **nanopartículas poliméricas de poliacrilato (PAA)** conjugadas com penicilina, com objetivo de confirmar a capacidade destas de proteger o fármaco da ação das  $\beta$ -lactamases.

O estudo realizado *in vitro* consistiu na comparação da atividade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas com a atividade da penicilina G livre, sobre MSSA E MRSA. Para proceder a esta comparação foram realizadas duas experiências: uma com a adição de  $\beta$ -lactamases e outra sem enzimas degradadoras. Na experiência sem a adição de enzimas verificou-se que a penicilina G possuía uma maior atividade contra MSSA do que NPs associadas ao fármaco. No entanto, aquando da adição de  $\beta$ -lactamases, o antibiótico livre perdeu a sua ação enquanto as nanopartículas permaneceram com atividade antimicrobiana. Assim, pode se concluir que as nanopartículas apresentam capacidade de proteger os antibióticos de um dos mecanismos de resistência que as bactérias possuem. Futuros estudos devem ser realizados de forma a entender a farmacodinâmica destas NPs em modelos *in vivo*.

### 3.3. FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética das NPs depende de vários aspetos, como as suas propriedades físico-químicas, a presença de ligandos à sua superfície e vias de administração (ZAZO, COLINO e LANAIO, 2016). Assim esta pode ser melhorada tendo em conta as características a seguir descritas:

#### 3.3.1. VIA DE ADMINISTRAÇÃO:

Os antibióticos são, geralmente, administrados por via oral ou via intravenosa, resultando por vezes em efeitos secundários indesejados devido a uma distribuição inespecífica nos tecidos e órgãos. Deste modo, a administração de antibióticos é ideal se for localmente, como por exemplo por via inalatória em infeções pulmonares (HUH e KWON, 2011).

#### 3.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS:

a. O tamanho das NPs é um fator importante porque quanto menor o tamanho, maior a capacidade de atravessar tecidos, e poros de mucosas ou membranas, alcançando o meio intracelular mais facilmente. Assim, existe uma maior eficiência de entrega do fármaco, diminuindo a MIC, e do seu efeito antimicrobiano (ZAZO, COLINO e LANAIO, 2016). No entanto, estudos toxicológicos demonstraram que dimensões menores que 100 nm contribuem para a toxicidade intrínseca das NPs (GATOO *et al.*, 2014).

b. A carga da superfície das nanopartículas é um fator importante para que a atividade antimicrobiana seja direcionada para o local da infeção (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016), isto porque, influencia a interação entre a NP e a membrana celular da bactéria, por interações eletrostáticas. Sabe-se que, devido à composição da membrana celular das bactérias, a carga destas é negativa, pelo que o uso de nanopartículas catiónicas permitirá que a sua atividade seja otimizada. Uma estratégia será a utilização de polímeros catiónicos (por exemplo PLGA ou Quitosano) (RADOVIC-MORENO *et al.*, 2012).

c. A ligação de ligandos à superfície da NP aumenta o reconhecimento destas por parte das células. Estas moléculas são escolhidas dependendo da sua estabilidade e seletividade para as células alvo. Neste caso, sendo o alvo células infetadas, o ligando deve ser escolhido de acordo com a possibilidade de interações específicas com biomoléculas presentes na superfície da bactéria (ZAZO, COLINO e LANAIO, 2016).

**Exemplo:** *S. aureus* e *E. coli* secretam uma enzima, hialuronidase, que na presença de ácido hialurónico, clivam-no. Assim, uma formulação de NP e antibiótico com ácido

hialurônico à superfície, assegura que o fármaco seja libertado apenas na presença de bactérias (HERRMANN, 2015).

Em conclusão, as NPs otimizam as características físico-químicas permitindo o seu uso a nível clínico e a sua administração através de vias mais confortáveis (ZAZO, COLINO e LANA O, 2016).

### 3.4. APLICAÇÕES

#### 3.4.1. DISPOSITIVOS MÉDICOS COM NANOPARTÍCULAS

Micro-organismos como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae* crescem na superfície de dispositivos médicos, tais como, cateteres, instrumentos ortopédicos e dentários, e ainda em materiais para curativos (ZAZO, COLINO e LANA O, 2016), o que contribui para um maior risco de infeções. Assim, comprovou-se que a formulação de dispositivos médicos com nanopartículas ajuda a prevenir o crescimento de micro-organismos na superfície destes equipamentos. (POLLINI *et al.*, 2011). Vários tipos de NPs podem ser usados para este fim, no entanto, os mais usados são AgNPs. A capacidade da prata para reduzir o processo inflamatório e facilitar a cicatrização resultou num aumento do seu uso a nível clínico (FINLEY *et al.*, 2015).

Alguns dos produtos que se encontram disponíveis são:

- Acticoat™
- Aquacel®
- PolyMem Silver®
- SilvaSorb™ (ZAZO, COLINO e LANA O, 2016).

A odontologia e a ortopedia são dois campos da medicina em que ocorrem mais complicações associadas à ocorrência de infeções (ZAZO, COLINO e LANA O, 2016).

**ODONTOLOGIA** – AgNPs incorporados em nanotubos de titânio para implantes de Ti, exerceram efeito antibacteriano contra *S. aureus*, durante os primeiros dias. A sua capacidade de prevenir a adesão bacteriana inicialmente, é considerada suficiente para prevenir infeções pós-operatórias (ZHAO *et al.*, 2011).

Apesar de ter sido comprovada a biocompatibilidade entre AgNPs e células de mamíferos, sugerindo que a aplicação em material odontológico não representa risco para a saúde humana, mais estudos serão necessários para determinar a concentração de prata que

exerce o seu efeito antimicrobiano mas não citotóxico (CORRÊA *et al.*, 2015) (ver seção 3.5.1.).

**ORTOPEDIA** – O aço inoxidável é um material normalmente utilizado em implantes ortopédicos. No entanto, o facto de poder ocorrer infeções associadas ao implante ortopédico, contribui para a necessidade de desenvolver um implante em que este risco diminua. Assim, pelas características já descritas da prata, foi fabricado um implante suportado com AgNPs. Verificou-se uma inibição da adesão bacteriana e conseqüentemente, inibição da formação de biofilmes, *in vitro*, e uma diminuição da infeção associada ao implante *in vivo* (QIN *et al.*, 2015).

### 3.5. CITOTOXICIDADE

A biocompatibilidade das nanopartículas usadas como agentes antimicrobianos deve ser explorada uma vez que estas, ao adquirirem aplicações biomédicas, poderão causar efeitos positivos ou negativos ao organismo humano.

A caracterização das NPs como tamanho, carga, estrutura superficial, é, deste modo, importante de modo a entender quais os fatores em ter em conta, aquando da formulação destas, para que a toxicidade seja a menor possível (BEYTH *et al.*, 2015).

#### 3.5.1. CITOTOXICIDADE DA PRATA

O facto de as AgNPs poderem, em certas concentrações, provocar problemas de saúde, estudos direcionados para a segurança destas nanopartículas são extremamente necessários (GE *et al.*, 2014).

Para uma melhor compreensão da citotoxicidade produzida por AgNPs, foram realizados estudos *in vitro* e *in vivo*:

a. **IN - VITRO**: estudos em várias linhagens de células humanas e/ou de outros mamíferos obtiveram como resultado, a ocorrência de citotoxicidade.

Sugere-se como mecanismos, tal como referido na seção *Interesse Terapêutico das nanopartículas – 3.1) Como atuam as nanopartículas* e *3.2) Nanopartículas – Agentes Terapêuticos*, que as nanopartículas ionizadas ativam os canais iónicos alterando a permeabilidade da célula, interação com a mitocôndria, e produção de ROS (GE *et al.*, 2014).

Um **estudo *in vitro*** realizado por AVALOS *et al.* (2016) avaliou o tamanho das NPs como um fator de toxicidade. Duas nanopartículas AgNPs de tamanhos diferentes (4,7 e 42 nm) foram administradas a duas culturas com fibroblastos humanos. Posteriormente foram

observados a viabilidade celular e parâmetros de stress oxidativo. Verificou-se que as nanopartículas de menor tamanho apresentam maior toxicidade do que as de 42 nm. Pode-se concluir que o tamanho contribui para a toxicidade.

b. **IN - VIVO**: Apesar de vários estudos terem sido realizados, ainda não existe um consenso sobre a toxicidade de AgNPs em humanos. A maior parte da investigação da citotoxicidade das nanopartículas baseia-se em estudos *in vitro* e com uma duração a curto prazo (GE *et al.*, 2014).

### **3.5.2. ESTRATÉGIA PARA DIMINUIÇÃO DA TOXICIDADE POR AgNPs**

De forma a contornar a citotoxicidade inerente às AgNPs nas células de mamíferos, foram formuladas NPs conjugadas com Quitosano. Este é um polímero que não apresenta efeitos tóxicos em células de mamíferos, mas que consegue afetar a membrana da célula eucariótica (HE *et al.*, 2015).

Um estudo realizado por HE *et al.* (2015) em *E. Coli* e *S. aureus*, com NPs de prata imobilizadas em quitosano (CTS-Ag NPs) demonstrou que as NPs formuladas apresentavam uma maior eficácia antimicrobiana do que apenas AgNPs. A ação sinérgica do quitosano, pela destabilização da membrana por contacto, e de AgNP pela libertação de iões de prata contribui para uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Por outro lado, o quitosano estabiliza AgNPs, impedindo que estes agreguem, potenciando a sua ação bactericida e permite uma libertação controlada de iões de prata contribuindo para uma atividade antimicrobiana a longo prazo. Este estudo permitiu concluir que no geral CTS-AgNPs consegue inibir a crescimento bacteriano, enquanto, que apresenta fraca toxicidade em células de mamíferos.

Em suma, para que o problema da toxicidade das nanopartículas, nas células saudáveis, seja ultrapassado, devem ser pesquisadas novas formulações de NPs que estejam aptas a responder a estímulos aquando na presença de células infetadas (XIE *et al.*, 2014).

A aplicação da toxicogenómica poderá, ainda, contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais as NPs causam toxicidade (POMA e GIORGIO, Di, 2008).

### **3.6. CONTROLO DE QUALIDADE – A ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS**

Um dos fatores mais importantes para estudos pré-clínicos é a estabilidade das nanopartículas e este parâmetro deve ser considerado, principalmente, aquando do seu armazenamento (ZHAO e JIANG, 2013). Uma forma a ultrapassar este obstáculo, passa pela introdução de estabilizadores (ZHAO e JIANG, 2013).

A maior parte dos estudos realiza-se utilizando nanopartículas recentemente sintetizadas em meio puro, o que não é suficiente para determinar a sua aplicabilidade.

## **4. ENSAIOS CLÍNICOS E DIFICULDADES NA INTRODUÇÃO NO MERCADO**

Atualmente existem poucos sistemas de nanopartículas comercializados. Uma das razões deve-se à dificuldade de transpor do laboratório para o mercado. Os estudos pré-clínicos devem considerar a eficácia terapêutica, seguidos pela segurança da utilização das NPs, considerando tanto a concentração do material utilizado bem como do fármaco que atinge o tecido (ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).

Outra explicação pode passar pela maior parte das pesquisas serem realizadas por académicos com programas de nanotecnologia financiados pelo governo. No entanto sem a ajuda da indústria para desenvolver ensaios clínicos, e sem regulação nacional e internacional, o sucesso da nanomedicina pode estar comprometido. Isto explica o facto de existirem inúmeros artigos de pesquisa, mas apenas alguns ensaios clínicos (ZAZO, COLINO e LANAO, 2016). Um dos exemplos, já referido anteriormente, é **Arikace™** na fibrose cística.

De fato, a baixa rentabilidade de novas nanoterapias alternativas, a desconfiança por parte do consumidor, potenciais riscos de utilização e regulamentação inadequada são fenómenos que explicam a falta de sistemas nanotecnológicos no mercado (ANDRADE et al., 2013).

Atualmente o custo dos sistemas nanotecnológicos existentes é elevado, comparativamente aos tratamentos por antibióticos. No entanto, a futura utilização de nanopartículas melhorará a qualidade de vida da população (ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).



## 5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos demora, normalmente, alguns anos até atingir ensaios clínicos de modo a alcançar a aplicação prática (HUSSEIN-AL-ALI *et al.*, 2014). No entanto, a nanotecnologia é uma área que permite resolver alguns dos problemas que têm surgido nos últimos anos na medicina, nomeadamente melhorar e devolver a atividade antimicrobiana de antibióticos já conhecidos que tenham sido afetados pelo aparecimento de resistências. A combinação de diversas estratégias simultâneas para o combate às resistências bacterianas tem-se revelado uma tentativa promissora de reduzir a quantidade de antibiótico administrado, diminuindo a probabilidade do desenvolvimento de resistências (FRANCI *et al.*, 2015).

Contudo, são necessários, ainda, futuros estudos direcionados para a entrega de fármacos, segurança e possível toxicidade relacionados com as nanopartículas (HUSSEIN-AL-ALI *et al.*, 2014).

Por um lado, nanopartículas de origem metálica podem vir a ser uma grande vantagem na área da saúde, no entanto, estudos sobre a sua toxicidade ainda se encontram em fases precoces. Assim que este parâmetro seja resolvido, espera-se que estas nanopartículas possam ajudar no avanço da medicina (LOOMBA e SCARABELLI, 2013).

Por outro lado, as nanopartículas orgânicas com as suas características biodegradáveis e biocompatibilidade elevada continuarão a ser potenciais agentes transportadores de antibióticos em meio intracelular.

Em conclusão, futuros estudos devem compreender questões como verificar a eficácia da entrega de antibióticos por nanopartículas *in vivo*; investigar métodos de modo a melhorar as formulações das nanopartículas; explorar o potencial da inibição do crescimento de estirpes resistentes e ainda, explorar a consequências de uma exposição a longo prazo de antibióticos, bem como os seus efeitos citotóxicos (SHIMANOVICH e GEDANKEN, 2016).

Apesar dos progressos da Nanotecnologia para o desenvolvimento de nanopartículas como agentes antimicrobianos, é necessário uma multidisciplinariedade entre engenheiros nanotecnológicos e microbiólogos (ZHANG *et al.*, 2010), uma colaboração entre a academia e indústrias farmacêuticas de modo a obter com sucesso nanoantibióticos, que poderão, futuramente, resolver infeções graves por micro-organismos (KALHAPURE *et al.*, 2015). Com uma equipa multidisciplinar será mais fácil descobrir os fatores necessários para uso clínico, como a segurança, capacidade de transporte, alvo específico e biodistribuição (ZAZO, COLINO e LANAO, 2016).

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, F; RAFAEL, D; VIDEIRA, M; FERREIRA, D; SOSNIK, A; SARMENTO, B. - **Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases.** *Advanced Drug Delivery Reviews.* 65:13-14 (2013) 1816–1827.
- AVALOS, A; HAZA, A; MATEO, D; MORALES, P. - **Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts.** *International Wound Journal.* 13:1 (2016) 101–109.
- BEYTH, N; HOURI-HADI, Y; DOMB, A; KHAN, W; HAZAN, R. - **Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials.** *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* (2015) 1–16.
- CHEN, J; WANG, F; LIU, Q; DU, J. - **Antibacterial polymeric nanostructures for biomedical applications.** *Chemical Communications.* 50:93 (2014) 14482–14493.
- CLANCY, J. P; DUPONT, L; KONSTANT, M. W; BILLINGS, J; FUSTIK, S; GOSS, C. H; LYMP, J; MINIC, P; QUITTNER, A. L; RUBENSTEIN, R. C; YOUNG, K, R; SAIMAN, L; BURNS, J. L; GOVAN, J. R. W; RAMSEY, B; GUPTA, R. - **Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *Thorax.* 68:9 (2013) 818–25.
- CORRÊA, J. M; MORI, M; SANCHES, H. L; CRUZ, A. D; JR; E. P; POIATE, I. A. V. P. - **Silver nanoparticles in dental biomaterials.** *International Journal of Biomaterials.* (2015)1–9.
- FINLEY, P. J; NORTON, R; AUSTIN, C; MITCHEL; ZANK, S; DURHAM, P. - **Unprecedented Silver-Resistance in clinically isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and Wound Management.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 59:8 (2015) 4734–4741.
- FORIER, K; RAEMDONCK; SMEDT, S. C. D; DEMEESTER, J; COENYE, T; BRAECKMANS. - **Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms.** *Journal of Controlled Release.* (2014) 607–623.
- FRANCI, G; FALANGA, A; GALDIERO, S; PALOMBA, L; RAI, M; MORELLI, G; GALDIERO, M. - **Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents.** *Molecules.* (2015) 8856–8874.
- GATOO, M. A; NASEEM, S; ARFAT, M. Y; DAR, A. M; QASIM, K; ZUBAIR, S. - **Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations.** *BioMed Research International* (2014) 1–8.
- GE, L; LI, Q; WANG, M; OUYANG, J; LI, X.; XING, M. MQ. - **Nanosilver particles in**

- medical applications: Synthesis, performance, and toxicity.** International Journal of Nanomedicine. 9:1 (2014) 2399–2407.
- GUPTA, A; LANDIS, R. F.; ROTELLO, Vincent M. - **Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical.** F1000Research. (2016) 1–10.
- HE, M; LU, L; ZHANG, J; LI, D. - **Immobilized Silver Nanoparticles on Chitosan with Special Surface State-Enhanced Antimicrobial Efficacy and Reduced Cytotoxicity.** Journal of nanoscience and nanotechnology. 15:9 (2015) 6435–6443.
- NORMAK B. H; NORMARK, S. - **Evolution and spread of antibiotic resistance.** Journal of Internal Medicine. 252:2 (2002) 91–106.
- HERRMANN, I. K. - **How nanotechnology-enabled concepts could contribute to the prevention, diagnosis and therapy of bacterial infections.** Critical care. 19:1 (2015) 1–5.
- HUH, A. J; KWON, Y. J. - **Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era.** Journal of Controlled Release. 156:2 (2011) 128–145.
- HUSSEIN-AL-ALI, S. H; EL, M. E; ZOWALATY; HUSSEIN, M, Z; ISMAIL, M; WEBSTER, T. J. - **Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic.** International Journal of Nanomedicine. 9:1 (2014) 549–557.
- KALHAPURE, R. S; SULEMAN, N; MOCKTAR, C; NASREEN, S; GOVENDER, T. - **Nanoengineered drug delivery systems for enhancing antibiotic therapy.** Journal of Pharmaceutical Sciences. 104:3 (2014) 1–34.
- KIM, J. S; DVM; PhD, KUK, E; MS; YU, K. N; MS; KIM J; MS; PARK, S. J; BS; LEE, H. J; DVM; PhD; KIM, H. S; DVM; PhD; PARK Y. K; DVM; MS; PARK Y. H; DVM, PhD; HWANG, C; DVM; PhD; KIM, Y; PhD; LEE, Y; PhD; JEONG, D. H; PhD; CHO, M; DVM; PhD - **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 3:1 (2007) 95–101.
- LEWIS, K. - **Platforms for antibiotic discovery.** Nature reviews. Drug discovery. 12:5 (2013) 371–387.
- LOOMBA, L; SCARABELLI, T. - **Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part I: gold and silver colloids.** Therapeutic Delivery. 4:7 (2013) 859–873.
- WANG, S; LAWSON, R; RAY, P. C; YU, H. - **Toxic effects of gold nanoparticles on *Salmonella typhirium* bacteria.** Toxicology and Industrial Health. 27:6 (2011) 547–554.

- MATSUMURA, Y; KUNIYAKI, Y; KUNISAKI, S; TSUCHIDO, T. - **Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate.** Applied and Environmental Microbiology. 69:7 (2003) 4278–4281.
- MEERS, P; NEVILLE, M; MALINIM, V; SCOTTTO, A. W; SARDARYAN, G; KURUMUNDA, R; MACKINSON, C; JAMES, G; FISHER, S; PERKINS, W. R. - **Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 61:4 (2008) 859–868.
- NICOLOSI, D; CUPRI, S; GENOVESE, C; TEMPERA, G; MATTINA, R; PIGNATELLO R - **Nanotechnology approaches for antibacterial drug delivery: Preparation and microbiological evaluation of fusogenic liposomes carrying fusidic acid.** International Journal of Antimicrobial Agents. 45:6 (2015) 622–626.
- PAN, X; REDDING, J. E; WILEY, P. A; WEN, L; MCCONNELL, J. S; ZHANG, B. - **Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay.** Chemosphere. 79:1 (2010) 113–116.
- PELGRIFT, R. Y; FRIEDMAN, A. J. - Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 65:13-14 (2013) 1803–1815.
- POLLINI, M; PALADINI, F; CATALANO, M; TAURINO, A; LICCIULLI, A; MAFFEZZOLI, A; SANNINO, A. - **Antibacterial coatings on haemodialysis catheters by photochemical deposition of silver nanoparticles.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 22:9 (2011) 2005–2012.
- POMA, A; GIORGIO, M. L. D. - **Toxicogenomics to improve comprehension of the mechanisms underlying responses of in vitro and in vivo systems to nanomaterials: a review.** Current genomics. 9:8 (2008) 571–585.
- QIN, H; CAO, H; ZHAO, Y; JIN, G; CHENG, M; WANG, J; JIANG, Y; AN, Z; ZHANG, X; LIU, X - **Antimicrobial and Osteogenic Properties of Silver-Ion-Implanted Stainless Steel.** ACS Applied Materials and Interfaces. 7:20 (2015) 10785–10794.
- RADOVIC-MORENO, A. F; LU, T. K; PUSCASU, V. A; YOON, C. J; LANGER, R; FAROKHAZAD, O. C. - **Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics.** ACS Nano. 6:5 (2012) 4279–4287.
- SHIMANOVICH, U; GEDANKEN, A. - **Nanotechnology solutions to restore antibiotic activity.** Journal Materials Chemistry B. (2016) 824–833.
- SHRIVASTAVA, S; BERA, T; ROY, A; SINGH, G; RAMACHANDRARAO, P; DASH D, -

- Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles.** *Nanotechnology*. 18:22 (2007) 1–9.
- SONDI, I; SALOPEK-SONDI, B. - **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.** *Journal of Colloid and Interface Science*. 275:1 (2004) 177–182.
- TIN, S; SAKHARKAR, K. R; LIM, C. S; SAKHARKAR, M. K. - **Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*.** *International Journal of Biological Sciences*. 5:2 (2009) 153–160.
- TUROS, E; REDDY, G. S. K; GREENHALGH, K; RAMARAJU, P; ABEYLATH, S. C; JANG, S; DICKEY, S; LIM, V. D. - **Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics against MRSA.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 17:12 (2007) 3468–3472.
- VENTOLA, C. L. - **The antibiotic resistance crisis: part I: causes and threats.** *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management* 40:4 (2015) 277–83.
- XIE, S; TAO, Y; PAN, Y; QU, W; CHENG, G; HUANG, L; CHEN, D; WANG, X; LIU, Z; YUAN, Z - **Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents.** *Journal of Controlled Release*. (2014) 101–117.
- YOKOYAMA, M. - **Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows.** *Journal of Drug Targeting*. 22:7 (2014) 576–583.
- ZAZO, H; COLINO, C. I; LANA, J. M. - **Current applications of nanoparticles in infectious diseases.** *Journal of Controlled Release*. (2016) 86–102.
- ZHANG, L; PORNATTANANGKUL, D; HU, C; HUANG, C. - **Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery.** *Current medicinal chemistry*. 17:6 (2010) 585–594.
- ZHAO, L; HAIRONG, W; HUO, K; CUI, L; ZHANG, W; NI, H; ZHANG, Y; WU, Z; CHU, P. K. - **Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles.** *Biomaterials*. 32:24 (2011) 5706–5716.
- ZHAO, Y; JIANG, X. - **Multiple strategies to activate gold nanoparticles as antibiotics.** *Nanoscale*. 5:18 (2013) 8340–50.