



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PPGCB

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA CONTENDO
CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA
INFECÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES**

RECIFE

2022

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA CONTENDO
CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA
INFECÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática.

Orientadora: PROFA. DRA. NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES

Coorientadora: PROFA. DRA. ISABELLA MACÁRIO FERRO CAVALCANTI

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine C Barroso, CRB4/1728

CAMPOS, Luís André de Almeida

Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina como estratégia terapêutica para infecções bacterianas resistentes / Luís André de Almeida Campos. – 2022.

262 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães

Coorientadora: Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Nanotecnologia 2. Antibióticos 3. *Escherichia coli* I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orient.). II. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro (coorient.)

620.5

CDD (22.ed.)

FPE/CB – 2022-158

LUÍS ANDRÉ DE ALMEIDA CAMPOS

**NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA
CONTENDO CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA COMO ESTRATÉGIA
TERAPÊUTICA PARA INFECÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em 30/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Adriana Fontes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar (Examinadora Externa)
Universidade Federal da Paraíba

Dedico essa tese a todos que contribuíram com minha formação acadêmica, especialmente, à minha tia/mãe, Josefa Almeida, à minha coorientadora, Isabella Macário pelo amor, paciência, pelo companheirismo e por sempre acreditarem em mim!

AGRADECIMENTOS

A seção de agradecimentos configura-se, para mim, como um momento emocionante que traz muitas memórias e reflexões, além de uma oportunidade de escrever sobre a gratidão que tenho por todos e todas que me impulsionaram até este momento.

Primeiro, agradeço a Deus, pela oportunidade que me foi dada de finalizar o curso de doutorado, pois muitas pessoas vivem à margem da sociedade sem acesso à educação formal. Que bom ter a possibilidade de vivenciar esta experiência que trouxe muito aprendizado, crescimento e desenvolvimento na dimensão intelectual, pessoal, psicológica, profissional e espiritual. Em seguida, eu agradeço a minha mãe, Maria Lúcia de Almeida (em memória) e ao meu pai, Severino Campos, por terem possibilitado a minha reencarnação, por todo amor, carinho e por todo apoio. Também agradeço a Josefa Maria de Almeida (Tia Finha) por ter me criado e dado toda a educação no sentido intelectual, mas, principalmente, por ter ofertado os valores morais. Ela sempre traz grande ensinamentos em suas palavras, e uma frase que levo comigo até hoje é: *“Por mais alto que você chegue, em qualquer lugar que estejas, seja humilde e simples. A simplicidade e a humildade são virtudes que você deve levar para onde for. Lembre-se de quem você é e de onde você veio”*. Com Tia Finha pude aprender que a honestidade, sinceridade, a caridade, a humildade, a empatia deveriam ser construídas diariamente em mim. Ela sempre esteve ao meu lado, sofria junto com as noites que tive de virar escrevendo a tese, observava meu cansaço, minhas dificuldades e estava sempre disposta com carinho, zelo e tentando amenizar alguns desafios. Eu sou muito grato por ter tido uma base familiar sólida, pautada no amor, no respeito, na dedicação, nos valores morais que me fizeram ser quem eu sou, impactando diretamente o pesquisador, o docente e o futuro doutor que sou. Além desses três personagens, agradeço ao Jesus e a plêiade de espíritos amigos força, pelo amparo, por tudo que me foi proporcionado para que eu pudesse finalizar este curso.

Eu comecei a estudar aos 3 anos de idade, no meu primeiro dia de aula fui levado por minha mãe biológica, Maria Lúcia, nesse mesmo dia ela veio a óbito devido a um Acidente Vascular Encefálico (AVE) e a partir desse dia, minha Tia Finha, foi responsável por toda minha educação. A educação sempre foi fundamental para Maria Lúcia, ela, enquanto, professora e costureira, entendia a importância e gostaria que eu fosse Doutor, não sei bem que tipo de doutor, mas consegui e sei que ela está muito feliz com toda minha trajetória. Como havia dito, comecei a estudar aos 3 anos de idade e agradeço profundamente, a Tia Cleide que me ensinou a ler, a Tia Anjinha, Tia Rita, Tia Branca, Tia Michelle e as demais que me ensinaram nos primeiros anos

de minha vida. Talvez, elas nem saibam da importância que tem em minha vida, e que hoje estou finalizando o doutorado, porque elas me ensinaram a base para eu seguir “meus estudos”. Obviamente, eu segui avançando nas séries e chego ao Ensino Fundamental, e lembro de meus queridos professores, incluindo Lenita, Iva, Aline, Guiolanda, Eron, Careca, Eliumar, Dilson, Antônio Augusto, entre outros. Eles me ensinaram muito, especialmente, os professores de Ciências que foram inspirações para que eu continuasse na área. Segui, e cheguei ao Ensino Médio/Técnico, sob a orientação de muitos professores queridos, como Aparecida, Rejane, Lilian, Márcia, Elionais, Antônio Augusto, Vilma, Acacy, Luís Carlos, Neneu, Luís Cometti, Emileide Freire, Erica, Antônio, Nadir, Lourdinha que me auxiliaram a aprender, me ensinaram muito sobre a vida. Formei-me como técnico em Meio Ambiente e conseguir passar no vestibular, escolhendo a Licenciatura em Ciências Biológicas inspirado em todos os conhecimentos ofertados por esses Mestres. Meu muito obrigado, vocês foram fundamentais na minha vida.

Aos 17 anos, eu entrei na graduação na UFPE-CAV, e lembro-me de duas situações impulsionadoras e fundamentais para que cursasse o Mestrado/Doutorado. A primeira foi a bolsa BIA – Bolsa de Incentivo Acadêmico, na qual eu deveria desenvolver um projeto de pesquisa/extensão. Eu fui direcionado para a Profa. Dra. Silvana Gonçalves Brito de Arruda que me acolheu com muito carinho, estimulou sempre o desenvolvimento científico e de extensão. Com a ajuda do Prof. André Castelo Blanco, eu desenvolvi meu projeto e passei 4 anos como extensionista no Programa UFPE na Praça. A segunda situação foi que ao final de uma aula de biofísica, no terceiro período, a Profa. Dra. Djanah Cota Machado olhou para mim e disse: *“Você tem um perfil acadêmico. Você já ouviu falar de mestrado ou doutorado?”*. Eu disse que não, e ela continuou: *“O que você gosta de fazer? Quais áreas você gosta? Me diga que eu vou mandar uma lista de programa de pós-graduação e posso arrumar um orientador para você”*. Eu falei que gostava de meio ambiente, pois era técnico em Meio Ambiente. E ela me direcionou para Profa. Dra. Mônica Adam, e comecei a avaliar impacto ambiental estuarino a partir de análises genotóxicas e mutagênicas. Nesse meio, tive a felicidade de ser monitor do Prof. Cristiano Chagas e da Profa. Erika Freitas, e ser aluno no PIBID sob a coordenação do Prof. Dr. Gilmar Beserra e o Prof. Dr. Kênio Cavalcante Lima. Que grata oportunidade, eu tive de ser coordenado por vocês, eu aprendi tanto e hoje nutro a paixão pela Biologia Celular e Ensino pelo bom trabalho de vocês. Também tive a felicidade estudar com o Prof. Dr. Ricardo Neves, Profa. Jeanne Claine Modesto, Profa. Dra. Angelica Uejima. Esses professores me ensinaram sobre as Ciências Biológicas e a arte de ensinar, mas também sobre quem eu queria ser, sempre acreditando em meu potencial, me estimulando, ficando felizes com minhas conquistas e são referências para mim. Meu

muito obrigado, hoje eu sou o que sou pela boa influência de vocês. Na graduação também conheci a minha co-orientadora Profa. Dra. Isabella Macário, mas teremos um momento só para agradecê-la.

Em 2016, eu me graduei com a Láurea Universitária, e ingressei no Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS) no LIKA. Que felicidade ter vivenciado esses dois anos, eu conheci pessoas fantásticas, começando pelo Prof. Dr. Luiz Bezerra, o Prof. Dr. Beltrão e minha turma, chamada carinhosamente de NB4 formado por Priscila Santos, Aline Larissa, Geilza Carla, Mirella Monteiro, Anna Oliveira, Anthony Alves e Wilson Lima. Os melhores momentos, as melhores risadas, os perrengues que sobrevivemos juntos foram experiências maravilhosas, vocês tão maravilhosos e maravilhosas que até hoje eu faço questão de manter o cont Obrigado pelo apoio e por tudo.

Além de todo apoio acadêmico, eu tive a felicidade de contar com familiares e amigos, por isso, aos meus familiares, eu agradeço por toda a ajuda, por todo apoio, por toda dedicação, por acreditarem e confiarem em mim e principalmente por todo o amor que me foi dado, sem esse amor eu não teria conseguido essa conquista. Costumo dizer que os amigos/amigas são os irmãos/irmãs que escolhemos, ou melhor, são anjos enviados para nos apoiar e compartilhar momentos de nossas vidas. E nesse sentido, eu não poderia deixar de agradecer minhas amigas de infância, Raysa Monfort, Mayara Yasmin, Taciara Suzart e Fernanda Renata que sempre estiveram comigo, me apoiando, me escutando, me aconselhando, me acolhendo e me dando força para seguir através de seu amor. Aos amigos de juventude também, incluindo Renata Nelly, Isabely Lustosa, Marcela Thamires, Rodrigo Alves, Isabelle Oliveira, Erique Santos, Fernanda Ramalho que sempre me apoiaram, me incentivaram e me trazem muita alegria. Aos amigos da fase adulta, como Rayssa Acioly, João Rodrigues e Elenilda Almeida que foram presentes que o destino me deu recentemente, e que me apoiam, me dão forças, se preocupam e são maravilhosos. Aos amigos da Graduação, como Steliane Lima, Patrícia Vasco e Ana Beatriz que compartilharam todos os momentos da graduação até os dias atuais, me dando amor, carinho, apoio, segurança e muita força. Aos amigos que encontrei na FAESC, incluindo Cláudia Bandeira, Marcelo Nascimento, Diná Lyra, Ana Helena, Rosseline Maryá, Leônidas Valle Neto, Daniella Gomes, Julia Lyra e Alice Ferreira que me deram as primeiras oportunidades no âmbito profissional, que me adotaram, me acolheram e que torcem por mim incondicionalmente. Eu não tenho palavras para agradecer o apoio, o carinho, o companheirismo, o amor e tudo que vocês fazem por mim. Uma música que me faz lembrar de vocês diz o seguinte: *“Nem se eu pudesse ter o pôr do sol, a lua, as estrelas, toda natureza. Nem se eu tivesse todo o ouro e não tivesse um amigo, nada teria”*. Eu amo vocês!

Desde o ventre de minha mãe, eu tive a grata oportunidade de conhecer a Doutrina Espírita, e eu vivi, toda a minha vida, imerso no Espiritismo e ele em mim, e nestes anos, pude conhecer muitos amigos/irmãos e muitas amigas/irmãs. Primeiro, eu agradeço as minhas mães, Maria Lúcia e Josefa Almeida, por terem me levado desde a infância aos encontros de Evangelização Espírita. Agradeço a Alice Sena, Cristiano Antônio, Maria de Jesus (Zui), Robélia Araújo, Verônica Ferreira, Ivanilda Silva (Neném), Maria José (Zetinha), Anailde, Sírio Henrique, João Lustosa, Jonas Arruda, Romildo César por terem me ajudado a relembrar os ensinamentos espíritas e o Evangelho de Jesus, por ter me ensinado através do exemplo, e por acreditar que o plantio da semente para iria germinar, fincar raízes, formar uma árvore e dar bons frutos. O Espiritismo trazido por intermédio de vocês me auxiliou muito nesse processo de conquista do título, e da busca constante em ser um homem de bem. Nessa caminhada, eu encontrei amigos valorosos do Grupo Espírita Luz no Caminho que compartilham a jornada comigo, incluindo Maria Ramalho, Walter Lacerda, Adja Cristina, Adriana Ferreira, Beatriz Ribeiro, Edvaldo Levino, Elisabete Ana. Os momentos desafiadores vivenciados entre 2020 e 2022 só foram superados com a força, garra e determinação desse grupo tão belo que compreende o sentido de trabalhar em equipe, em ser uma única voz, únicos braços. Nos últimos anos pude me envolver mais na Federação Espírita Pernambucana, e reencontrar corações amigos, como o de Julliane Tinôco, Anna Lúcia Miranda, Eveline Calderia e Catarine Santos que são simplesmente fantásticas, que eu compartilho minhas experiências, que eu amo, que são também fazem parte da rede de apoio e de amor, e que eu posso chamar de irmãs para toda uma minha vida. Também temos os membros da Mocidade Espírita Meimei – MEM/FEP, incluindo Edson Caldeira, Daniel Macedo, Alice Sant’anna, João Paulo, Marcos Capella e Diego Santos que estão sempre comigo. Mas além dos meus queridos da FEP, esbarrei com muitos outros corações amigos no Movimento Espírita Brasileiro, e agradeço muito a Jade Neves, Lanuza Carnaúba, Mayara Maya, Vanda Farache, Leonardo William, Rômulo Miranda, Maria Clara Chaves, Cirne Araújo e Miriam Dusi que me apoiaram, que me ensinaram muito, que compartilharam as minhas dores e felicidades e que acima de tudo, me lembravam o verdadeiro sentido da vida. Quantas reuniões, quantas noites, quanto trabalho e quanto amor. Vocês fazem da minha vida mais leve, fizeram esse período ser mais difícil, me apoiaram sempre, e onde estiver, em qualquer lugar do Brasil, do m ou em esferas espirituais diferentes, eu os levarei em meu coração.

Nesse processo, foco agora nos meus 4 anos do doutorado, e não posso deixar de agradecer ao grupo do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - LNFARM e ao grupo em Microbiologia Clínica e Novas Abordagens Terapêuticas – MicroNAT, os quais faço parte. Agradeço, especialmente, a Milena Ferraz, a Marcela Araújo, a

Sarah Palácio, a Sandrelli Meridiana, a Maria Helena Menezes e a Clara Barros por contribuir diretamente no campo da nanotecnologia, pelo carinho, pelo apoio e pela amizade que se estendeu para fora do ambiente profissional. O apoio, as “dicas”, a presença de vocês foi de fundamental importância. Agradeço também a Iago Cavalcanti, Daniel Macedo, Thaiane Siqueira, Samilly Sales, Alessandra Araújo pelas conversas no laboratório, pelo auxílio mútuo e por todo apoio. A Cecília Noronha, Taina Pereira, Milena Silva por me auxiliarem diretamente nos experimentos, na escrita e no desenvolvimento em geral, pela amizade e por todo companheirismo. E por fim, agradeço a Profa. Mariane Cajubá, a Rafaela Ferraz e ao Azael Neto que são meu porto seguro, os dois estiveram comigo sempre. A Profa. Mariane Cajubá sempre contribuindo, aconselhando, conversando sobre ciência e sobre as possibilidades que existiam, sempre dando força, impulsionando e acreditando. A Rafaela com grande conhecimento, com vasta experiência no campo da nanotecnologia trazia reflexões dos resultados, compartilhava muitas experiências, dava conselhos valiosos e demonstrava uma preocupação, uma disponibilidade, um acolhimento gigante e fundamental, eu só agradeço e digo que amo demais. E Azael, não tenho nem como agradecer, estive o doutorado todo comigo, uma pessoa fantástica, dedicada, disponível, de coração enorme e extremamente competente, um PIBIC maravilhoso e compartilhou todos os momentos comigo, levo você para toda minha vida, amo você também. Agradeço a todos e todas por todo auxílio, pela amizade construída, pelas novas aprendizagens, por terem me acolhido com tanto carinho, pela oportunidade de aprendizado e troca de conhecimentos. Agradeço a todos do MICRONAT, em especial, a João Oliveira e Sérgio Dias que estão comigo desde 2016, juntos, compartilhando muitos momentos, muito obrigado por todo auxílio, pela amizade e por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos no momento dos experimentos. Agradeço a colaboração com a central analítica na USP e com a Fiocruz, no Aggeu Magalhães em nome da Profa. Maria Carolina Accioly.

Costumo dizer que este processo de quatro anos foi muito relevante, pois realizar Doutorado é bastante desafiador e com a pandemia devido a COVID-19, tornou-se mais ainda. Nesse tempo, precisei repensar e prezar pela saúde mental que é de extrema importância, e pude realizar psicoterapia com Márcia Almeida, e foi de fundamental relevância, e por isso, eu agradeço o profissionalismo, por todo auxílio nesse campo, confesso que sem esses momentos não teria conseguido. Por isso, meu muito obrigado.

Sabemos que um doutorado não se faz sozinho, tive muito auxílio de todos meus PIBICs, os estagiários, as pós-doutorandas e das minhas orientadoras, Profa. Dra. Nereide Stela Santos-Magalhães e Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti. Neste sentido, eu agradeço à Profa. Nereide pelo acolhimento, pela oportunidade de

realizar o doutorado, por todo conhecimento que me foi oportunizado, a senhora é um exemplo de dedicação, competência, força e perseverança. Agradeço imensamente à Profa. Isabella por tudo! Eu conheci a Profa. Isabella no sétimo período da graduação, lembro-me que ela ministrou uma aula de introdução a Microbiologia e Imunologia. Nessa aula, eu havia decidido que queria trabalhar com ela. Então, pude ser monitor de Microbiologia, passei na seleção do projeto de extensão sob sua coordenação e fui aluno de TCC. E lembro que ela chegou para mim e disse: *“André, abriu a seleção de mestrado do PPGBAS e do PPGCB, você quer tentar? Você disse que queria ser professor do ensino superior, não é?”*. Eu logo aceitei, e comecei minha jornada na pós-graduação com ela e com a Profa. Nereide. Na seleção do doutorado, eu estava apreensivo, nervoso com medo de que não passaria, e a Profa. Isabella olhou para mim bem naturalmente e disse: *Não tem necessidade de estar assim, eu conheço você e não tenho a menor dúvida de que você entrará*. Consegui, e hoje estou concluindo e saiba que a senhora tem papel fundamental nessa conclusão. Acompanhei muitas fases da Profa. Isabella, e pude ver como ela cresceu e se tornou essa profissional admirável, gigante, acolhedora, e por isso, agradeço por todo apoio, por todo conhecimento que pela amizade sincera, pela boa companhia, por toda compreensão, pelo auxílio nos momentos ruins de minha vida. Muito obrigado por sempre inspirar o meu melhor e por acreditar em mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em nome do Profa. Dra. Márcia Vanusa e Prof. Dr. Thiago Napoleão, e em especial a Adenilda, pela paciência, pelo carinho, pela disponibilidade, pelos seminários de acompanhamento, por todo acolhimento, por contribuírem na minha formação de pesquisador, e pelo auxílio durante esses quatros anos. Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, em nome do Prof. Dr. José Luiz, e dos funcionários, incluindo Edson, Verinha, Rafael, Gabriel e todos os outros pelo acolhimento, pela oportunidade de realização dos experimentos e pelos ensinamentos. À Universidade Federal de Pernambuco por tudo desde a graduação até o doutorado, e a todos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, pela mediação e oportunidade de construção dos conhecimentos.

Por fim, agradeço a todos que puderam contribuir para que eu conseguisse ser doutor, desde a minha infância até esse momento. Afirmo que este é o término de uma fase e começo de uma nova em minha carreira acadêmica, em minha vida profissional e em minha vida pessoal. Fecho esse capítulo com muita felicidade e gratidão.

Se Deus, em seus desígnios, vos fez nascer num meio onde pudestes desenvolver a vossa inteligência, é que quer a utilizeis para o bem de todos; é uma missão que vos dá! – Ferdinando, Espírito protetor (KARDEC, 2013, p. 121).

RESUMO

O objetivo deste estudo foi encapsular separadamente e em coencapsulação a ceftazidima e tobramicina em nanopartículas de zeína com e sem revestimento pela quitosana, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme. As nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e revestidas com quitosana por interação eletrostática. Em seguida, foram caracterizadas e analisadas durante o armazenamento por tamanho de partículas ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ), pH e eficiência de encapsulação (%EE), além das caracterizações físico-químicas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). A estabilidade das nanopartículas revestidas foi analisada em meio gástrico (pH=1,2) e intestinal (pH=6,8) simulados, além da estabilidade ao armazenamento por até 6 meses. A cinética de liberação foi avaliada utilizando o método de diálise em meio gástrico (1,2) e intestinal (6,8) simulados e tampão salina-fosfato (pH 7,4), e o ensaio de citotoxicidade pelo método MTT utilizando linhagens de fibroblastos L929 e hepatócitos HEPG2. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo seguindo protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os ensaios antibiofilme foram realizados pelo método de cristal violeta. As nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP) apresentaram $\emptyset$ entre 196,1 nm e 187,2 nm, PDI $<0,1$, ζ entre $-31,4 \pm 0,8$ mV e $-32,0 \pm 1,5$ mV, pH de 7,1 e %EE entre $83,94 \pm 0,4\%$ e $59,76 \pm 0,3\%$. Enquanto as nanopartículas de zeína revestidas por quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), tobramicina (TOB-ZNP-CH), e ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH) apresentaram $\emptyset$ entre 314,6 nm e 330,6 nm, PDI $\leq 0,2$, ζ entre $+39,2 \pm 0,7$ mV e $+45,1 \pm 1,0$ mV, pH de 5 e %EE entre $57,47 \pm 0,5\%$ e $87,28 \pm 0,2\%$. As caracterizações por MEV, DRX, FTIR, DSC e TGA indicaram morfologia esférica, encapsulação dos fármacos e estabilidade térmica das nanopartículas. As nanopartículas apresentam estabilidade ao armazenamento durante 6 meses e estabilidade em meio pH gástrico e intestinal simulados. Os ensaios de cinética comprovaram a liberação controlada de CAZ e TOB encapsuladas em nanopartículas de zeína por 24h em condições pH gastrointestinais simuladas, e por 48h (pH 7,4) nas nanopartículas revestidas com

quitosana. Os ensaios de citotoxicidade comprovaram uma redução entre 9 e 25 vezes da citotoxicidade das nanopartículas comparado aos fármacos livres. CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH exibiram atividade antibacteriana, inibiram a formação do biofilme e erradicaram biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes, contudo, CAZ-ZNP+TOB-ZNP e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram essas atividades biológicas potencializadas devido à combinação e co-encapsulação dos antibióticos. Assim, as nanopartículas desenvolvidas apresentam características físico-químicas ideais para estudos *in vivo*, liberando os fármacos de forma controlada, reduzindo a citotoxicidade, potencializando a atividade antibacteriana e antibiofilme dos de ceftazidima e tobramicina frente as cepas sensíveis e resistentes de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* produtoras de biofilme.

Palavras-chave: Antibióticos; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Nanocarreadores; *Pseudomonas aeruginosa*; Terapia Combinada.

ABSTRACT

The aim of this study was to encapsulate ceftazidime and tobramycin separately and in co-encapsulation in zein nanoparticles with and without chitosan coating, to characterize and evaluate the antibacterial and antibiofilm activity. The nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation method and coated with chitosan by electrostatic interaction. Then, they were characterized and analyzed during storage by particle size ($\emptyset$), polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), pH and encapsulation efficiency (%EE), in addition to physical-chemical characterizations by microscopy. scanning electron (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TGA). The stability of the coated nanoparticles was analyzed in simulated gastric (pH=1.2) and intestinal (pH=6.8) media, in addition to storage stability for up to 6 months. The release kinetics was evaluated using the dialysis method in simulated gastric (1.2) and intestinal (6.8) media and saline-phosphate buffer (pH 7.4), and the cytotoxicity assay by the MTT method using strains of L929 fibroblasts and HEPG2 hepatocytes. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were performed by the broth microdilution method following the protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Antibiofilm assays were performed using the crystal violet method. Ceftazidime (CAZ-ZNP) and tobramycin (TOB-ZNP) containing zein nanoparticles presented $\emptyset$ between 196.1 nm and 187.2 nm, PDI <0.1, ζ between -31.4 ± 0.8 mV and -32.0 ± 1.5 mV, pH 7.1 and %EE between $83.94 \pm 0.4\%$ and $59.76 \pm 0.3\%$. While chitosan-coated zein nanoparticles containing ceftazidime (CAZ-ZNP-CH), tobramycin (TOB-ZNP-CH), and ceftazidime and tobramycin (CAZ-TOB-ZNP-CH) presented $\emptyset$ between 314.6 nm and 330, 6 nm, PDI ≤ 0.2 , ζ between $+39.2 \pm 0.7$ mV and $+45.1 \pm 1.0$ mV, pH of 5 and %EE between $57.47 \pm 0.5\%$ and $87.28 \pm 0.2\%$. Characterizations by SEM, XRD, FTIR, DSC and TGA indicated spherical morphology, drug encapsulation and thermal stability of the nanoparticles. The nanoparticles have storage stability for 6 months and stability in simulated gastric and intestinal pH media. The kinetic assays confirmed the controlled release of CAZ and TOB encapsulated in zein nanoparticles for 24h under simulated gastrointestinal pH conditions, and for 48h (pH 7.4) in chitosan-coated nanoparticles. The cytotoxicity assays showed a reduction between 9 and 25 times in the cytotoxicity of nanoparticles compared to free drugs. CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-

ZNP-CH and TOB-ZNP-CH exhibited antibacterial activity, inhibited biofilm formation and eradicated resistant *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* biofilms, however, CAZ-ZNP+TOB-ZNP and CAZ-TOB-ZNP-CH showed these potentiated biological activities due to the combination and co-encapsulation of antibiotics. Thus, the developed nanoparticles present ideal physicochemical characteristics for in vivo studies, releasing drugs in a controlled manner, reducing cytotoxicity, potentiating the antibacterial and antibiofilm activity of ceftazidime and tobramycin against sensitive, resistant and biofilm-producing strains of *K. pneumoniae*, *E. coli* and *P. aeruginosa*.

Keywords: Antibiotics; Combined Therapy; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Nanocarriers; *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 –	Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar MacConkey (B) de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
Figura 2 –	Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar sangue (B) de <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 3 –	Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar MacConkey (B) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 4 –	Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos.....	35
Figura 5 –	Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	35
Figura 6 –	Microscopia dos biofilmes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (A e B) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (C e D).....	38
Figura 7 –	Etapas de formação do biofilme bacteriano.....	38
Figura 8 –	Estrutura básica de uma cefalosporina.....	40
Figura 9 –	Cefalosporinas de terceira geração.....	41
Figura 10 –	Estrutura química da ceftazidima.....	43
Figura 11 –	Estrutura de aminoglicosídeos de acordo com base na fração aminociclitol.....	45
Figura 12 –	Estrutura química da tobramicina.....	48
Figura 13 –	Mecanismo de ação da tobramicina (A) na região ribossômica 30S e (B) na região rRNA 16S através da ligação no sítio A no ribossomo.....	49
Figura 14 –	Campos das aplicações e contribuições da nanotecnologia.....	54
Figura 15 –	Farmacocinética de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada.....	55
Figura 16 –	Representação de nanoestruturas para entrega de fármacos.....	56
Figura 17 –	Estrutura de nanoesferas e nanocápsulas.....	57
Figura 18 –	Esquema do método de emulsificação-evaporação do solvente....	59

Figura 19 –	Esquema do método de nanoprecipitação.....	60
Figura 20 –	Esquema do método de <i>salting-out</i>	60
Figura 21 –	Representação esquemática da estrutura da α -zeína em 2D.....	62
Figura 22 –	Representação das (A) nanopartículas de zeína e de (B) nanopartículas de zeína contendo um fármaco.....	64
Figura 23 –	Microscopia de nanopartículas de zeína contendo ácido fólico.....	64
Figura 24 –	Representação das nanopartículas de zeína estabilizadas com (A) caseinato de sódio e polissacarídeos e (B) lisina.....	65
Figura 25 –	Representação da interação e retenção das NPZs na mucosa intestinal e liberação do fármaco encapsulado nas nanopartículas.....	66
Figura 26 –	Estrutura química da quitosana.....	68

ARTIGO 2 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Figura 1 –	Morfologia de ZNP (A e B), CAZ-ZNP (C e D) e TOB-ZNP (E e F) obtida por microscopia eletrônica de varredura.....	135
Figura 2 –	Espectros de FTIR das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).....	136
Figura 3 –	DRX das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).....	137
Figura 4 –	Curvas termogravimétricas das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).....	138
Figura 5 –	Termogramas de DSC das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).....	139
Figura 6 –	Perfil de liberação de ceftazidima (A) e tobramicina (B) a partir das nanopartículas em meio PBS por 24 h.....	140
Figura 7 –	Inibição da formação do biofilme de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 e <i>Escherichia coli</i> H100407 após exposição a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.....	149

Figura 8 –	Erradicação do do biofilme pelas cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 e <i>Escherichia coli</i> H100407 após exposição a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas.....	152
-------------------	--	-----

ARTIGO 3 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA CONTENDO CEFTAZIDIMA/TOBRAMICINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL E NASAL FRENTE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E PRODUTORAS DE BIOFILME

Figura 1 –	Morfologia de ZNP-CH (A e B), CAZ-ZNP-CH (C e D), TOB-ZNP-CH (E e F) e CAZ-TOB-ZNP-CH (G e H) obtida a partir de microscopia eletrônico de varredura.....	179
Figura 2 –	Espectro de FTIR das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana. (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).....	180
Figura 3 –	DRX das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).....	182
Figura 4 –	Termograma das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).....	183
Figura 5 –	DSC das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).....	184

Figura 6 –	Diâmetro médio (A), PDI (B) e potencial zeta (C) das ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em pH 1,2.....	186
Figura 7 –	Diâmetro médio (A), PDI (B) e potencial zeta (C) das ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em pH 6,8.....	186
Figura 8 –	Perfil de liberação de ceftazidima a partir de CAZ-ZNP-CH (A) e CAZ-TOB-ZNP-CH (B) e da tobramicina a partir de TOB-ZNP-CH (C) e CAZ-TOB-ZNP-CH (D) em meio gastrointestinal.....	189
Figura 9 –	Inibição da formação do biofilme de isolados clínicos resistentes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> após o tratamento a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas revestidas com quitosana.....	198
Figura 10 –	Figura 10 – Erradicação do biofilme de isolados clínicos resistentes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e de <i>Klebsiella pneumoniae</i> após o tratamento a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas revestidas com quitosana.....	201

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 –	Propriedades físico-químicas da ceftazidima.....	44
Tabela 2 –	Propriedades físico-químicas da tobramicina.....	49

ARTIGO 1 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL: MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Tabela 1 –	Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por precipitação de antissolvente.....	78
Tabela 2 –	Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por nanoprecipitação.....	81
Tabela 3 –	Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas pelo método pH-driven.....	83
Tabela 4 –	Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por eletropulverização, emulsificação-evaporação de solvente e automontagem induzida pelo calor.....	85
Tabela 5 –	Método de preparo e potencial anti-inflamatório de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.....	90
Tabela 6 –	Método de preparação e potencial antioxidante de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.....	92
Tabela 7 –	Método de preparo e potencial antibacteriano de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.....	97
Tabela 8 –	Método de preparação e potencial antibiofilme de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.....	99
Tabela 9 –	Método de preparação e potencial anticancerígeno de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.....	103

ARTIGO 2 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Tabela 1 –	Caracterização de nanopartículas de zeína contendo ceftazidima ou tobramicina.....	133
Tabela 2 –	Estabilidade das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima.....	141
Tabela 3 –	Estabilidade das nanopartículas de zeína contendo tobramicina.....	141
Tabela 4 –	Citotoxicidade de ZNP, CAZ-ZNP e TOB-ZNP em hepatócitos HepG2 e fibroblastos L929.....	142
Tabela 5 –	Atividade antibacteriana da ceftazidima e tobramicina encapsulada em nanopartículas de zeína.....	144
Tabela 6 –	Classificação das cepas quanto a produção de biofilme.....	147
Tabela 7 –	Concentração inibitória mínima do biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.....	150
Tabela 8 –	Concentração de erradicação mínima de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas.....	153

ARTIGO 3 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA CONTENDO CEFTAZIDIMA/TOBRAMICINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL E NASAL FRENTE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E PRODUTORAS DE BIOFILME

Tabela 1 –	Caracterização de nanopartículas revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina.....	176
Tabela 2 –	Estabilidade das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima.....	187
Tabela 3 –	Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo tobramicina.....	187
Tabela 4 –	Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo ceftazidima e tobramicina.....	188

Tabela 5 –	Atividade antibacteriana da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.....	191
Tabela 6 –	Classificação das isolados resistentes de <i>K. pneumoniae</i> e <i>P. aeruginosa</i> quanto a produção de biofilme.....	194
Tabela 7 –	Concentração inibitória mínima de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.....	196
Tabela 8 –	Concentração de erradicação mínima de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.....	200

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	- American Type Culture Collection
BGNs	- Bacilos Gram-negativos
CAZ	- Ceftazidima
CAZ-TOB-ZNP	- Nanopartículas de zeína contendo ceftazidima e tobramicina
CAZ-TOB-ZNP-CH	- Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina
CAZ-ZNP	- Nanopartículas de zeína contendo ceftazidima
CAZ-ZNP-CH	- Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CC ₅₀	- Concentração correspondente a 50% de inibição da viabilidade celular
CEMB	- Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CIMB	- Concentração Inibitória Mínima da Inibição de Biofilme
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DRX	- Difração de raios-X
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
EPS	- Exopolissacarídeos
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
FTIR	- Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

MDR	- Multidroga-resistente
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
Mg	- Miligrama
MHA	- Ágar Müeller Hinton
MHC	- Caldo Müeller Hinton
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
MTT	- Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
mV	- Milivolt
NaCl	- Cloreto de sódio
NCTC	- National Collection of Type Cultures
Nm	- Nanômetro
NPs	- Nanopartículas poliméricas
NPZ	- Nanopartículas de zeína
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PBP	- Proteína ligadora de penicilina
PBS	- Tampão salino-fosfato
PDI	- Índice de polidispersão
RNA	- Ácido ribonucleico
TGA	- Termogravimetria
TOB	- Tobramicina
TOB-ZNP	- Nanopartículas de zeína contendo tobramicina

TOB-ZNP-CH - Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina

TSB - Caldo triptona de soja

UFC - Unidade formadora de colônia

ZNP - Nanopartículas de zeína

ZNP-CH - Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 OBJETIVOS.....	30
1.1.1 Objetivo Geral.....	30
1.1.2 Objetivos Específicos.....	30
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	31
2.1 BACILOS GRAM-NEGATIVOS.....	31
2.1.1 Resistência bacteriana.....	34
2.1.2 Biofilmes.....	37
2.2 TERAPIA ANTIMICROBIANA.....	40
2.2.1 Cefalosporinas	40
2.2.1.1 Ceftazidima.....	42
2.2.2 Aminoglicosídeos.....	45
2.2.2.1 Tobramicina.....	47
2.2.3 Terapia combinada	50
2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA.....	53
2.3.1 Nanopartículas poliméricas.....	56
2.3.2 Nanopartículas de zeína.....	62
2.3.3 Quitosana.....	67
3 ARTIGO 1 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL: MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	70

4 ARTIGO 2 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO CEFTAZIDIMA E TOBRAMICINA: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	122
5 ARTIGO 3 – NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA REVESTIDAS COM QUITOSANA CONTENDO CEFTAZIDIMA/TOBRAMICINA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL E NASAL FRENTE CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS E PRODUTORAS DE BIOFILME.....	163
6 CONCLUSÕES.....	215
REFERÊNCIAS.....	217
APÊNDICES.....	259

1 INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas causadas por cepas resistentes e produtoras de biofilme causam altos índices de morbimortalidade impactando negativamente a economia e a saúde pública mundial (SUN et al., 2021; COSTA-FERNANDEZ et al., 2021). O tratamento dessas infecções é oneroso e complexo devido ao espectro limitado de antimicrobianos eficazes, em especial, para eliminar bacilos Gram-negativos (BGNs) como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BASSETTI et al., 2019; KOFTERIDIS et al., 2020). Esses BGNs causam infecções do trato urinário, do trato digestivo, no sistema nervoso central, pneumonia, bacteremia, septicemias e infecções nas unidades de terapia intensiva (UTI) (KOFTERIDIS et al., 2020).

As infecções causadas por bactérias resistentes levam a óbito cerca de 700.000 pessoas anualmente no mundo, e alguns especialistas estimam que esse número poderá crescer para 10 milhões até o ano de 2050 (WILLYARD, 2017). Além da resistência, outro fator limitante para eficácia da terapia antimicrobiana é a produção de biofilmes. Os biofilmes são aglomerados sésseis compostos por uma mesma espécie ou por espécies diferentes de bactérias imersas numa matriz polimérica extracelular autoproduzida composta por exopolissacarídeos (EPS), proteínas, lipídeos e DNA, aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (NÚÑEZ et al., 2013; HOBLEY et al., 2015).

As infecções bacterianas tornam-se mais difíceis de tratar quando as cepas são produtoras de biofilmes, e sabe-se, que 65% das infecções microbianas estão relacionadas à formação de biofilme (CHUNG, 2016; JAMAL et al., 2018; WYRES et al., 2020). A terapia antimicrobiana convencional não é eficaz para o tratamento dos biofilmes uma vez que a penetração dos agentes antimicrobianos se torna limitada pela estrutura do biofilme, e devido à escassez de antimicrobianos para tratar os pacientes acometidos por estes microrganismos, retomou-se o uso de terapia combinada de β -lactâmicos e aminoglicosídeos (GABRILSKA; RUMBAUGH, 2015; BASSETTI et al., 2019).

Dentre os β -lactâmicos, destaca-se a ceftazidima (CAZ), uma cefalosporina que atua inibindo a síntese da parede celular bacteriana (JONES et al., 2019) e dentre

os aminoglicosídeos, destaca-se a tobramicina (TOB), um aminoglicosídeo com atividade antibacteriana através da inibição da síntese de proteínas (KRAUSE, 2016). Esses antimicrobianos são utilizados na terapia contra infecções bacterianas causadas pelos BGNs, contudo, esses fármacos apresentam baixa biodisponibilidade, toxicidade, sensibilidade à degradação pelas enzimas digestivas, a dificuldade de atravessar a barreira epitelial do intestino (DE LEO et al., 2010; MICHELON et al., 2019).

Com o objetivo de sobrepor essas limitações, a encapsulação desses fármacos em nanopartículas poliméricas a base de proteínas apresenta-se como estratégia terapêutica promissora, especialmente, quando revestidas com polissacarídeos. Dentre os polímeros proteicos estudados pela comunidade científica, a zeína tem se destacado por ser natural, gastrorresistente, mucoadesiva, de fácil obtenção, baixo custo e permite a encapsulação de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO et al., 2017; PASCOLI et al., 2018).

A quitosana, um polissacarídeo catiônico linear, apresenta-se como polissacarídeo promissor para o revestimento de nanocarreadores, principalmente, por possibilitar a adesão à superfície das mucosas (intestinal e nasal), e a alteração transitória das junções celulares entre os enterócitos. Dessa forma, a quitosana é um dos polímeros promissores para aplicações pela via intravenosa, nasal e oral (LUO, 2011; VOZZA, 2018; LANG, 2020).

Assim, a coencapsulação de ceftazidima e tobramicina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana pode ser uma alternativa promissora como estratégia para liberação controlada dos antimicrobianos por via oral no tratamento de infecções causadas por BGNs resistentes a antibióticos e produtoras de biofilme.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e/ou tobramicina para potencial uso pela via nasal e oral.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanopartículas de zeína revestidas e não revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH, CAZ-ZNP), tobramicina (TOB-ZNP-CH, TOB-ZNP) e ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP);
- Realizar a caracterização físico-química e estudo de estabilidade das formulações quanto ao tamanho, distribuição e índice de polidispersão, carga de superfície das partículas (potencial zeta), pH, doseamento e eficiência de encapsulação dos fármacos encapsulados;
- Realizar análises de morfologia, difração de raio X, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas desenvolvidas;
- Realizar ensaios de cinética de liberação *in vitro* da ceftazidima e da tobramicina a partir das nanopartículas de zeína revestidas revestida e não revestida com quitosana;
- Determinar a cinética de liberação e a estabilidade das formulações em condições simuladas do trato gastrointestinal;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de zeína revestida e não revestida com quitosana em linhagens celulares de hepatócitos e fibroblastos;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em de zeína revestida e não revestida com quitosana frente a cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com perfil de resistência antimicrobiana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Os bacilos Gram-negativos (BGNs) são bactérias em forma de bastão que, geralmente, constituem a microbiota do intestino e podem colonizar pele e trato digestivo superior de forma assintomática (MEHRAD et al., 2015). As infecções causadas por BGNs estão comumente associadas a outra doença subjacente, lesão ou hospitalização e são difíceis de tratar, podendo levar o paciente ao óbito (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015; WIELAND; CHHATWAL; VONBERG, 2018).

Os BGNs estão envolvidos em grande parte das infecções intra-abdominais, do trato urinário (ITU), do sistema nervoso central, pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), bacteremia, septicemias e infecções nas unidades de terapia intensiva (UTI) (ESTERLY et al., 2012; CAMPOS et al., 2016; MACVANE, 2017).

Esse grupo de bactérias reúne as espécies da ordem Enterobacterales e os bacilos não-fermentadores dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* e *Achromobacter*. Em particular, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são importantes patógenos responsáveis por infecções associadas à assistência à saúde (MEHRAD et al., 2015; RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

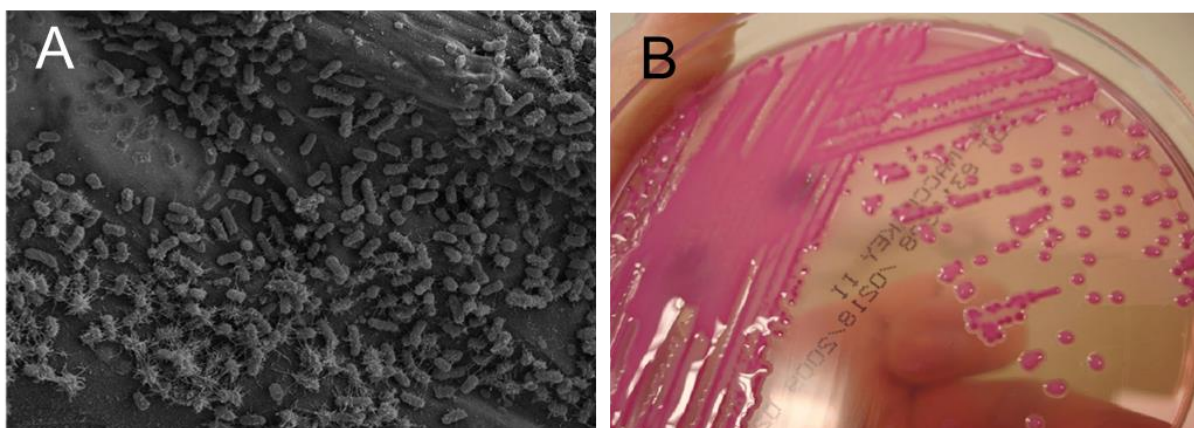
Klebsiella pneumoniae é uma bactéria não móvel, encapsulada, anaeróbia facultativa, fermentadora de lactose e sacarose, hidrolisa ureia, apresenta forma de bastonete e colônias mucoides (Figura 1) (VUOTTO et al., 2017). Essa bactéria é membro da ordem Enterobacterales e faz parte da microbiota residente do trato gastrointestinal de humanos (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; LENCHENKO et al., 2020).

K. pneumoniae está envolvida em infecções intestinais e urogenitais, da corrente sanguínea, pneumonia, cistite, conjuntivite, endocardite, meningite e septicemia, além de causar infecções secundárias que podem levar ao aumento no número de mortes (CHUNG, 2016; WANG et al., 2018).

Em geral, este patógeno tem causado cerca de um terço de todas as infecções por bactérias Gram-negativas e aproximadamente 14 a 20% das infecções

relacionadas ao trato respiratório, ducto biliar inferior, feridas cirúrgicas e trato urinário nos ambientes hospitalares (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017; VUOTTO et al., 2017). Este microrganismo tornou-se relevante no campo da saúde, em especial quando se trata de infecções nosocomiais (CLEGG; MURPHY, 2016; LENCHENKO et al., 2020).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar MacConkey (B) de *Klebsiella pneumoniae*.



Fonte: CHAUDHARY et al. (2016) e BIOQUELL (2018).

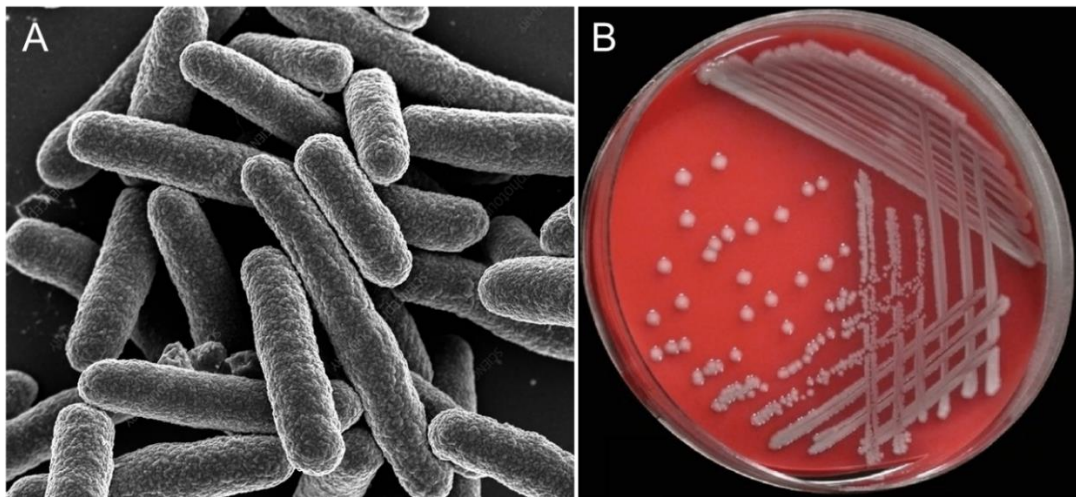
Escherichia coli é um BGN pertencente a ordem Enterobacteriales, anaeróbico facultativo, apresenta forma de bastonete e pode replicar-se rapidamente em ótimas condições, sendo facilmente cultivada em laboratório (Figura 2) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SHARMA et al., 2016). Esta bactéria é um dos microrganismos constituintes da microbiota intestinal humana e dificulta a colonização de outras bactérias patogênicas neste órgão (SANNES et al., 2004; COOPER et al., 2019).

E. coli apresenta cepas comensais do trato gastrointestinal e cepas patogênicas isoladas de pacientes com infecções (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; VILA et al., 2016; CHANDRAN; MAZUMDER, 2016). Este patógeno humano apresenta uma variedade de cepas patogênicas intestinais e extraintestinais capazes de causar diferentes infecções com quadros clínicos específicos (VOGELEER et al., 2014; JANG et al., 2017; ALIZADE et al., 2019).

Pseudomonas aeruginosa apresenta forma de bastonete, aeróbio estrito, móvel, não esporulado, produtor de citocromo-oxidase, arginina dehidrolase e ornitina descarboxilase, facilmente identificado em laboratório, pois sintetiza pigmentos de cor esverdeada como a pioverdina e a piocanina, e tornou-se causa comum de infecções

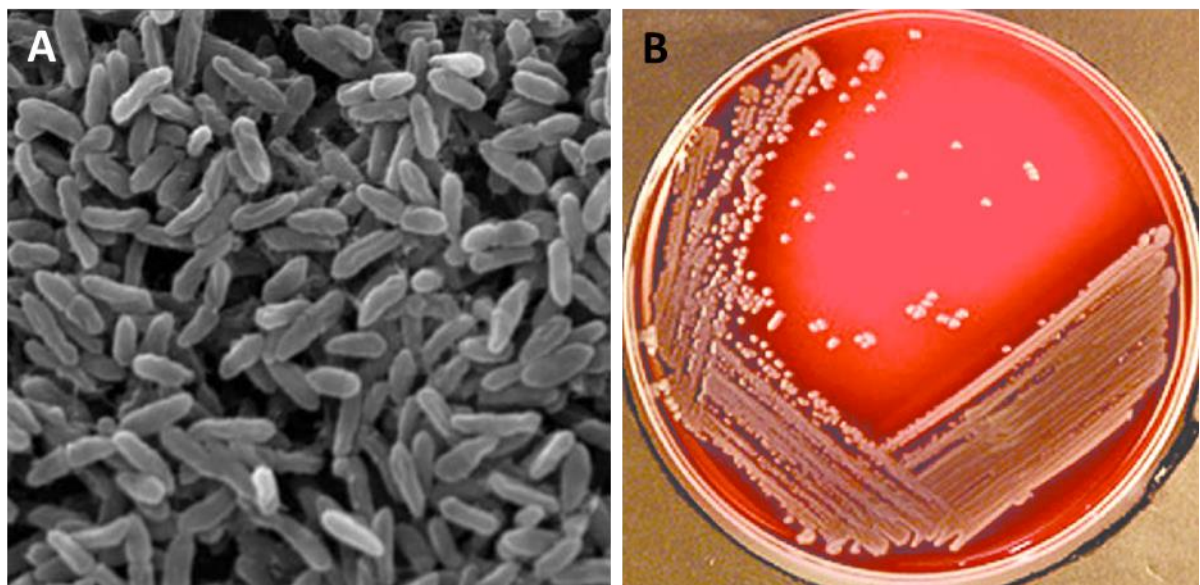
hospitalares (Figura 3) (STREETER; KATOULI, 2016; PACHORI; WU et al., 2015; GOTHALWAL; GANDHI, 2019).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar sangue (B) de *Escherichia coli*.



Fonte: CHAUDHARY et al. (2016) e SPL (2019).

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura (A) e colônias em meio ágar MacConkey (B) de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: VINAY et al. (2016) e PHILLIPS (2019).

Essa bactéria é um importante patógeno oportunista, causador de infecções, especialmente, em pessoas imunocomprometidas (RASAMIRAVAKA et al., 2015; PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019). *P. aeruginosa* é prevalente nos pulmões de pacientes com fibrose cística e causa infecções em feridas e no trato urinário associado ao cateterismo e à instrumentação cirúrgica (CHAUDHRY et al., 2017; PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019). Outro local frequente de infecção é a corrente sanguínea, a região ocular e o conduto auditivo externo (WAGNER et al., 2016; WIELAND; CHHATWAL; VONBERG, 2018).

As infecções causadas pelos BGNs podem ser graves e com complicações clínicas resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente, as cepas com perfil de resistência aos múltiplos antimicrobianos (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014; CHANDRAN; MAZUMDER 2016; HAWKEY et al., 2018).

2.1.1 Resistência bacteriana

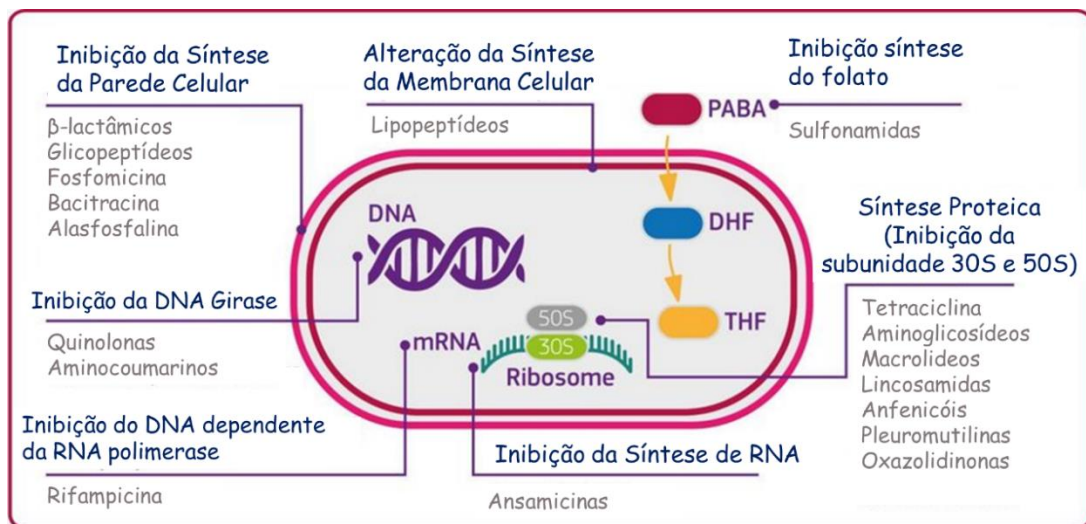
Os agentes antimicrobianos podem apresentar amplo espectro ou espectro limitado e podem ter como alvo a parede celular, a membrana celular bacteriana, a síntese proteica, a inibição da síntese de DNA ou inibição de vias do metabolismo bacteriano envolvendo o ácido paraaminobenzóico (PABA), o ácido dihidrofólico (DHF) e ácido tetrahidrofólico (THF) (Figura 4) (TENOVER, 2006; BROWN; WRIGHT, 2016; HAWKEY et al., 2018).

A resistência é um processo biológico que se apresenta de forma intrínseca, quando as características estruturais e funcionais inerentes do microrganismo impedem a ação do fármaco, ou como resistência adquirida, quando o microrganismo obtém uma nova característica por meio de mutações em genes cromossômicos ou por transferência horizontal de genes em elementos genéticos, por transformação, conjugação e transdução móveis (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015; XU et al., 2018).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos (Figura 5) podem ser classificados em três grupos: a) aqueles que reduzem as concentrações intracelulares do antibiótico através da alteração das proteínas canais, impedindo a entrada do

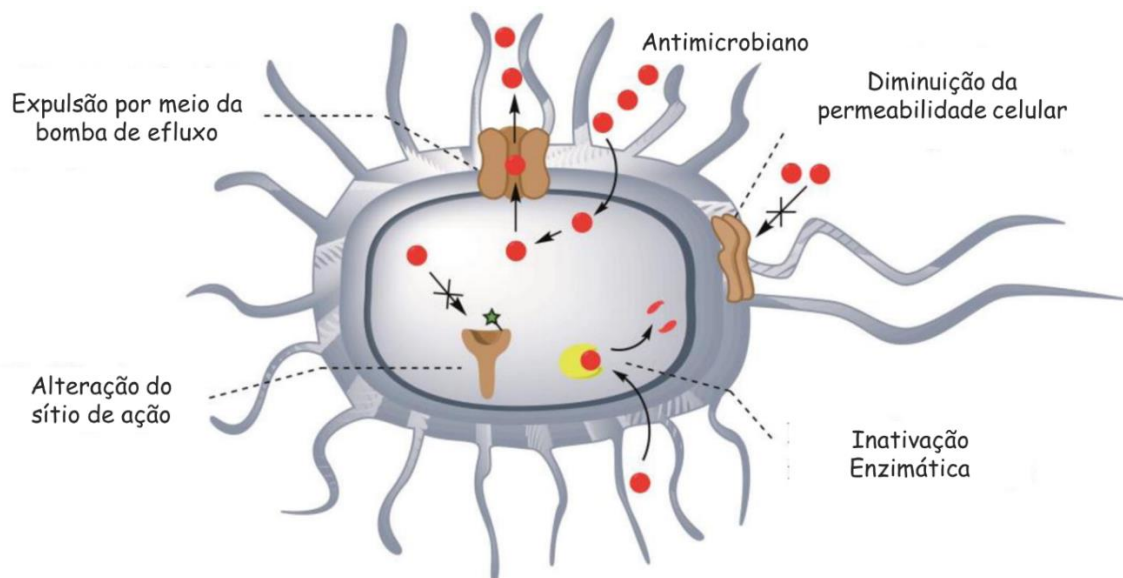
fármaco ou aumento das bombas de efluxo que expulsam o fármaco da célula; b) aqueles que modificam o alvo do antibiótico por mutação genética ou modificação pós-traducional alterando e/ou eliminando o sítio de ligação, e c) aqueles que inativam os antibióticos por hidrólise ou modificação pela ação das enzimas bacterianas (Figura 5) (TENOVER, 2006; MARSTON et al., 2016; HAWKEY et al., 2018).

Figura 4 – Mecanismo de ação dos agentes antimicrobianos.



Fonte: SANSEVERINO et al. (2018).

Figura 5 – Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.



Fonte: GONZÁLEZ-BELLO (2017).

Estes mecanismos tornam as cepas bacterianas resistentes uma ameaça global à saúde humana, pois essas infecções promovem óbito de cerca de 700.000 pessoas anualmente no mundo, e alguns especialistas estimam que esse número poderá crescer para 10 milhões até o ano de 2050 (BLAIR et al., 2015; ROCA et al., 2015; WILLYARD, 2017).

Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma lista contendo as bactérias resistentes que apresentam um maior risco para saúde humana. Dentre elas, destacam-se alguns BGNs como *Pseudomonas aeruginosa* MDR, Enterobacterales produtoras de β -lactamase de espectro estendido e carbapenemase, *Acinetobacter baumannii* resistente aos carbapenêmicos, *Campylobacter* spp., *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. resistentes às fluoroquinolonas (WILLYARD, 2017).

No Brasil, 44% das cepas de *K. pneumoniae* eram resistentes aos carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira e quarta geração e 42,9% das cepas de *P. aeruginosa* foram classificadas como resistentes aos carbapenêmicos e 31% das cepas de *E. coli* como resistentes a cefalosporinas de terceira e quarta geração (ANVISA, 2018). Em infecções com cateter de acesso venoso central em pacientes adultos em UTI prevalecem infecções por *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (ANVISA, 2018).

Em Pernambuco, as infecções do sítio cirúrgico (ISC), as PAV, ITU associadas ou não à sonda vesical e infecções da corrente sanguínea associadas a cateter venoso (IPCS) são principalmente causadas por BGNs *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli* com perfil de resistência (ANVISA, 2019). O panorama global da resistência bacteriana é alarmante e o crescente número de novas cepas multidroga-resistentes (MDR) nos hospitais e nas comunidades está causando preocupação as autoridades competentes, aos cientistas e a população (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015; FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016).

Os BGNs desenvolvem rapidamente resistência aos antimicrobianos e consolidam-se como uma das principais causas de infecções oportunistas reincidentes em hospitais em todo o mundo (LEE et al., 2017; ISLER et al., 2019). O acúmulo de vários mecanismos de resistência pelos BGNs limita a utilização de

antimicrobianos na prática clínica, resultando em infecções com altos índices de mortalidade (WANG et al., 2018; ISLER et al., 2019).

O problema da resistência é preocupante devido à escassez de novos compostos ativos frente aos BGNs com perfil de resistência (NORDMANN, NAAS; POIREL, 2011; LUEPKE et al., 2017). Nas últimas décadas, esse grupo vem adquirindo resistência, especialmente, as quinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; ZHANG et al., 2020). Associado ao problema da multirresistência, os BGNs podem apresentar fatores de virulência, como os biofilmes, que consolidam a infecção e dificultam a terapêutica (VAN ACKER; VAN DIJCK; COENYE, 2014; DUMARU; BARAL; SHRESTHA, 2019).

2.1.2 Biofilmes

Os biofilmes são um conjunto de células microbianas aderidas às superfícies abióticas ou bióticas envoltas numa matriz complexa autoproduzida composta de substâncias poliméricas extracelulares incluindo exopolissacarídeos, DNAs extracelulares (eDNA) e proteínas (Figura 6) (RABIN et al., 2015; PAKHARUKOV et al., 2018). Esse fator de virulência apresenta em sua composição cerca de 90% de matriz extracelular e 10% de microrganismos (SATPATHY et al., 2016).

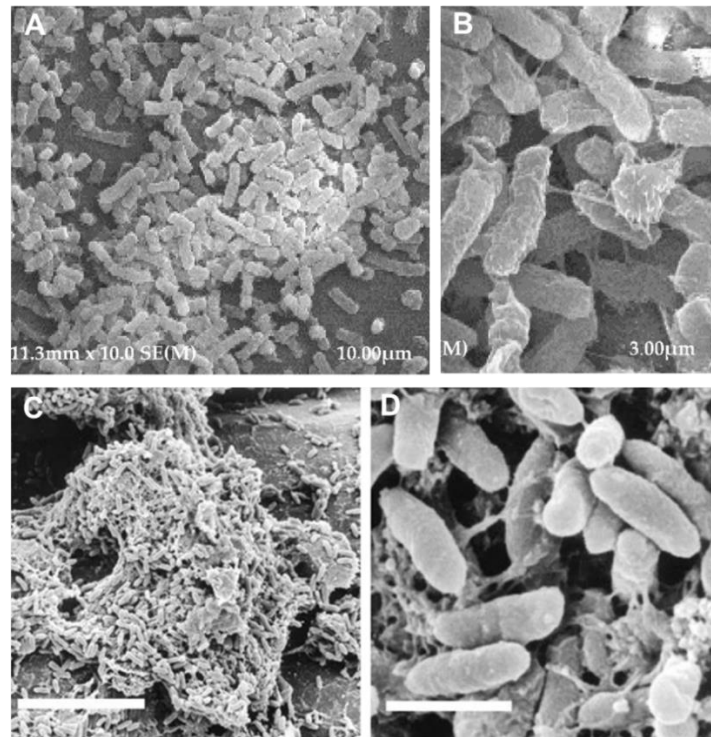
O biofilme é uma estrutura importante da ecologia bacteriana, pois propicia proteção para comunidade microbiana, tornando-as resistentes ao ambiente hostil, aos métodos convencionais de desinfecção, a lavagem física e ao tratamento antimicrobiano (HANCOCK; BRINKMAN, 2002; VASUDEVAN, 2014).

A formação do biofilme bacteriano é um processo regulado e complexo com uma série de fases sequenciais, envolve fatores genéticos, ambientais e mecanismos complexos guiados por processos químicos, físicos e biológicos (CHATTERJEE; OTTO, 2013; COUGHLAN et al., 2016).

A formação de biofilme bacteriano segue as seguintes etapas (Figura 7): 1) adesão inicial das células planctônicas ao substrato; 2) adsorção, multiplicação bacteriana e produção de exopolissacarídeos; 3) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme com formação das microcolônias e produção de moléculas

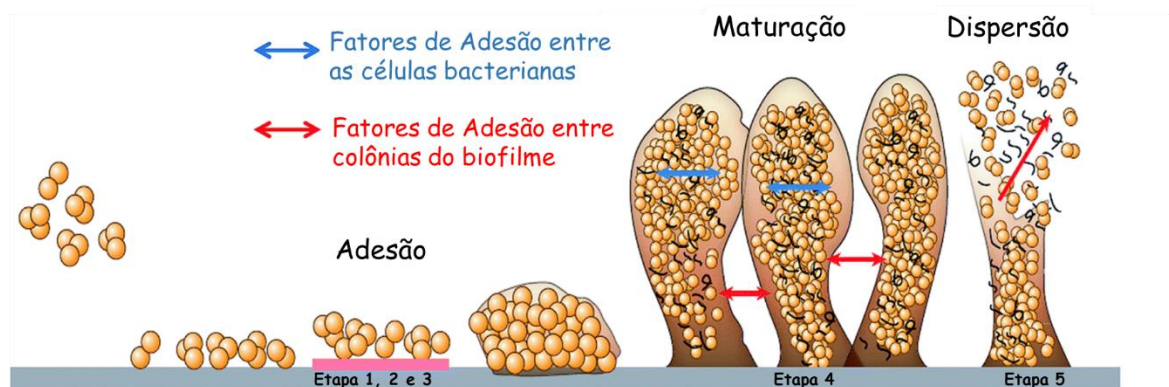
sinalizadoras; 4) expansão, consolidação e maturação da arquitetura com substâncias poliméricas extracelulares e 5) dispersão das células bacterianas ou partes do biofilme maduro e colonização de novas superfícies (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013; SATPATHY et al., 2016; FAN et al., 2020).

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *Klebsiella pneumoniae* (A e B) e *Pseudomonas aeruginosa* (C e D).



Fonte: ROCA-SUBIRÀ et al. (2012) e OCHOŃSKA, ŚCIBIK, BRZYCHCZY-WŁOCH, et al. (2021).

Figura 7 – Etapas de formação do biofilme bacteriano.



Fonte: ZHAO et al. (2017).

Na formação do biofilme, os BGNs utilizam o sistema *quorum sensing* (QS), um tipo de sinalização química que estimula a síntese e secreção de substâncias auto indutoras que aumentam a densidade celular e estimulam a formação e a maturação do biofilme (STURBELLE et al., 2015; SUN et al., 2020). Outras estruturas fundamentais para adesão e formação inicial de biofilme são as fímbrias de adesão das superfícies abióticas e bióticas e as proteínas com função adesiva inseridas na membrana externa (VIJAYAKUMAR et al., 2016; PAKHARUKOV et al., 2018; DE OLIVEIRA-JUNIOR; FRANCO, 2020).

Para estruturação e estabilidade da estrutura do biofilme, destacam-se os exopolissacarídeos, pois são elementos que permitem a adesão entre as células no biofilme (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; REICHHARDT; PARSEK, 2019). Já o eDNA é essencial para manutenção da matriz dos biofilmes, devido a sua capacidade de conectar as células, facilitar o desenvolvimento inicial e a expansão do biofilme mantendo alinhamentos celulares coerentes (RASAMIRAVAKA et al., 2015; SOO-KYOUNG; JOON-HEE, 2016). Além dessas estruturas, a expressão de marcadores de resistência e as limitações de difusão na matriz extracelular no biofilme tornam as bactérias do biofilme resistentes ao tratamento com antibióticos (SHARMA et al., 2016; VILA et al., 2016; SUN et al., 2020).

A eliminação de biofilme produzido pelos BGNs é relevante, pois eles podem sobreviver à exposição prolongada a condições adversas especialmente, em superfícies abióticas (REISNER et al., 2014; EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; WILLIAMS et al., 2020). Os biofilmes desses microrganismos estão relacionados a infecções associadas a assistência à saúde causando preocupação para os profissionais de saúde e a população (BODELÓN et al., 2016; PIPERAKI et al., 2017; SIMON et al., 2019).

Com o problema da falha terapêutica devido aos biofilmes, as infecções microbianas consolidam-se como um problema mundial, pois causam hospitalização, sofrimento do paciente e redução da qualidade de vida (WU et al., 2015; CIOFU et al., 2015; RAMASAMY; LEE, 2016). O tratamento de infecções causadas por BGNs resistentes e produtores de biofilme é dispendioso e difícil devido ao espectro limitado de antimicrobianos. Com a escassez de antimicrobianos, atualmente, retoma-se o uso de terapia combinada de antimicrobianos comerciais, como os β -lactâmicos e aminoglicosídeos (BASSETTI et al., 2019).

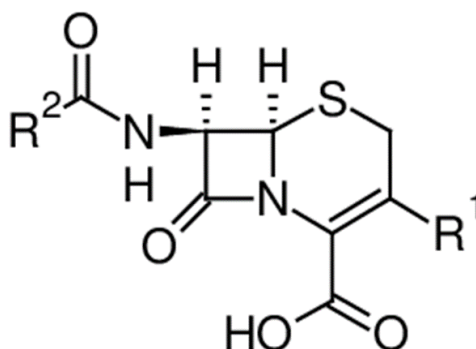
2.2 TERAPIA ANTIMICROBIANA

2.2.1 Cefalosporinas

As cefalosporinas pertencem a uma classe de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. A estrutura do núcleo da cefalosporina foi isolada pela primeira vez em 1945 a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* (SADER; JONES, 1992; KLEIN; CUNHA, 1995). A modificação da estrutura básica da cefalosporina resultou em um grupo antimicrobiano com propriedades antibacterianas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas únicas (HARIRI et al., 2017).

Na estrutura química básica desses antimicrobianos encontramos um anel β -lactâmico central associado a um ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) e dois substituintes localizados na posição C3 (R1) e C7 (R2) (Figura 8) (ANDES; CRAIG, 2005; RIBEIRO; SURES; SCHMIDT, 2018). Essa estrutura permite a ação antibacteriana através da interferência na síntese da parede celular inibindo a ligação cruzada de peptidoglicano e inativando as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (KLEIN; CUNHA, 1995).

Figura 8 – Estrutura básica de uma cefalosporina.



Fonte: WORTHINGTON e MELANDER (2013).

A atividade antibacteriana dos compostos dessa classe decorre da presença do anel β -lactâmico e dos grupos químicos na posição C7, enquanto os substituintes

das posições C3 e C4 são responsáveis pelo perfil farmacocinético da molécula (SADER; JONES, 1992; EL-SHABOURY et al., 2007; ARRUDA et al., 2019). As cefalosporinas são tradicionalmente divididas em agentes de primeira, segunda o, terceira, quarta e quinta gerações (EL-SHABOURY et al., 2007; ANDES; CRAIG, 2005; WHO, 2017).

Dentre as cefalosporinas, as de terceira geração destacam-se pelo espectro de ação mais amplo, possuindo atividade predominante frente a microrganismos Gram-negativos e apresentam estabilidade a hidrólise por algumas β -lactamases (MITSCHER; LEMKE; GENTRY, 2008; PETRI JR, 2017; HUGHES, 2017). Atualmente, os principais agentes de terceira geração são cefixima, cefpodoxima, cefatamet, cefmenoxima, cefoperazona, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona e cefsulodina (figura 9) (ARUMUGHAM; CASCELLA, 2020).

Figura 9 – Cefalosporinas de terceira geração.

CEFALOPORINAS	R ₁	R ₂	CEFALOPORINAS	R ₁	R ₂
CEFIXIMA H		CH = CH ₂	CEFTAZIDIMA H		
CEFPODOXIMA CH ₃ CH-OCOOCH(CH ₃) ₂		CH ₂ -OCH ₃	CEFTIZOXIMA H		H
CEFATAMET CH ₂ -O-COC(CH ₃) ₃		CH ₃	CEFTRIAXONA H		
CEFMENOXIMA H			CEFSULODINA H		
CEFOPERAZONA H					

Fonte: PEHOURCQ e JARRY (1998) e AJEET (2013).

Apenas alguns desses agentes têm ação frente aos BGNs não fermentadores. A CAZ e a cefoperazona apresentam atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* e a ceftizoxima, a cefotaxima, a ceftazidima e a ceftriaxona frente a cepas de *A. baumannii* (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014; PETRI JR, 2017; ARUMUGHAM; CASCELLA, 2020).

Esses agentes de terceira geração apresentam meia-vida curta, são inativados no estômago e têm absorção limitada no duodeno, portanto, a administração oral é limitada (ROBERTS, 2000; PETRI JR, 2017). Entretanto, eles são considerados seguros para administração devido à baixa incidência de efeitos adversos (3%) como erupções cutâneas e febre. Além disso, essas cefalosporinas são menos alergênicas e menos suscetíveis a β -lactamases (KLEIN; CUNHA, 1995; RIBEIRO; SURES; SCHMIDT, 2018).

Comumente, eles são usados em associação com outros fármacos como penicilinas, aminoglicosídeos, quinolonas ou inibidores de β -lactamase. Dentre as cefalosporinas de terceira geração, destaca-se a ceftazidima pelo seu amplo espectro de ação e estabilidade frente a ação de algumas β -lactamases (JONES et al., 2019; ARUMUGHAM; CASCELLA, 2020).

2.2.1.1 Ceftazidima

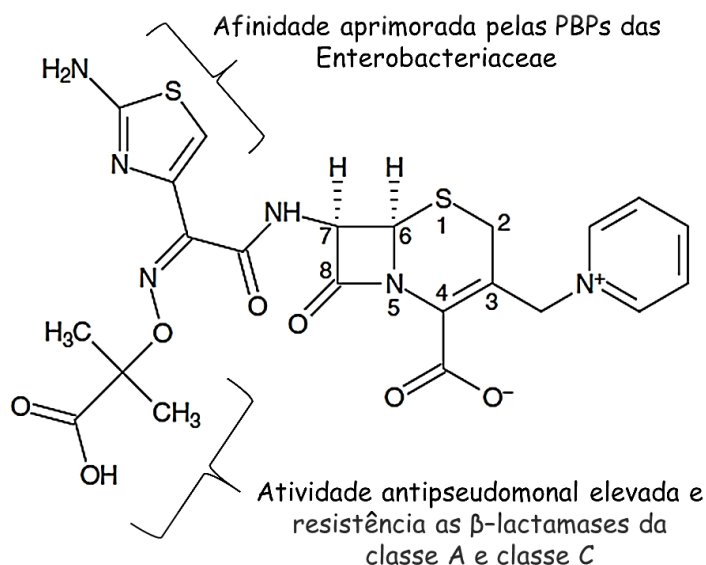
A ceftazidima (CAZ) é uma cefalosporina de terceira geração usada há décadas na prática clínica (Figura 10) (SHARMA; PARK; MOY, 2016). Este antimicrobiano é amplamente utilizado no tratamento de infecções leves, moderadas e graves causadas por cepas bacterianas Gram-negativas produtoras de biofilme sensíveis ou resistentes a algumas cefalosporinas e alguns aminoglicosídeos (RIBEIRO; SCHMIDT, 2017; SUN et al., 2020).

Esse antibiótico é utilizado na terapia de infecções do trato respiratório inferior, do trato geniturinário, da pele, do sistema nervoso central, infecções ósseas e articulares, intra-abdominais, pneumonia, bacteremia e infecções nosocomiais (KLEIN; CUNHA, 1995; RIBEIRO; SCHMIDT, 2017). Este fármaco apresenta atividade frente a BGNs, sendo um dos únicos agentes de terceira geração com atividade frente *P. aeruginosa* (KLEIN; CUNHA, 1995; SHARMA; PARK; MOY, 2016).

A CAZ apresenta uma estrutura química complexa com diversos grupos funcionais e múltiplas frações ionizáveis (RIBEIRO; SCHMIDT, 2017). Ela possui um anel β -lactâmico em seu núcleo, característica comum as cefalosporinas, uma cadeia lateral na posição 7 (grupo aminoacil), formada por um anel de aminotiadiazol e um

grupo carboxipropil-oximino (Figura 10) (ZHANEL et al., 2013; LAGACÉ-WIENS; WALKTY; KARLOWSKY, 2014).

Figura 10 – Estrutura química da ceftazidima.



Fonte: ZHANEL et al. (2013) e ZASOWSKI, RYBAK e RYBAK (2015).

Nessa molécula é encontrado um grupo metilpiridínio na posição 3, que quando hidrolisado é liberado uma piridina produzindo odor característico de sulfeto (JONES et al., 2019). Ela apresenta também um ácido dimetilacético (Figura 11), diferente de outras cefalosporinas que apresentam, comumente, um grupo metoxi-imino (DUNN, 1982; ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015).

A estrutura química da CAZ permite o efeito bactericida pela inibição da síntese da parede celular através da inativação das PBPs levando a alterações morfológicas, lise e morte celular (GUTMANN et al., 1986; SAUVAGE et al., 2008; ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015). A atividade antibacteriana deste fármaco é tempo dependente e ocorre principalmente devido a presença do anel β -lactâmico (MCKINNON; DAVIS, 2004; RIBEIRO; SCHMIDT, 2017; JONES et al., 2019). O anel aminotiadiazol aumenta a afinidade de ligação pela PBP-3 nos BGNs e torna esta molécula um substrato difícil para inativação por algumas β -lactamases (figura 10) (NEU, 1986; LAGACÉ-WIENS; WALKTY; KARLOWSKY, 2014).

A presença do grupo carboxipropil-oximino promove forte atividade antipseudomonal devido a afinidade pela PBP, além de reduzir a indução da produção de β -lactamases de classe A e C (DUNN, 1982; ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015).

O grupo metilpiridínio também aumenta atividade antipseudomonal e aumenta a solubilidade em água deste fármaco (BEALE, 2011; ZHANEL et al., 2013). A CAZ apresenta propriedades físico-químicas particulares evidenciadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas da ceftazidima.

CEFTAZIDIMA	
Ligação a proteínas	< 10%
Ponto de fusão	103-113 °C
Solubilidade em água	396 mg/L
Log P	-1,60
Peso molecular	546.6 g/mol
pKa (ácido mais forte)	2,77
pKa (básico mais forte)	4,26
Carga Fisiológica	-1

Fonte: PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE (2020) e DRUGBANK (2020).

A CAZ é administrada por via intravenosa ou intramuscular a cada 8 ou 12 h, sua farmacocinética em humanos é linear no intervalo de doses de 50 mg a 2 g (BULITTA et al., 2010; SY et al., 2019). A ligação da CAZ às proteínas do plasma varia entre 10% e 17% e o grau de ligação é independente da dose administrada, sua distribuição *in vivo* e penetração da barreira hematoencefálica é aproximadamente de 25% (ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015; FALCONE; PATERSON, 2016; SY et al., 2019).

Ela apresenta meia-vida curta (~ 1,8 h) e sua eliminação é via renal com 80-90% da dose eliminada no período de 24 horas em pacientes com função renal normal, sendo necessário o ajuste da dose em pacientes com insuficiência renal moderada e grave (PARADIS et al., 1992; ANDES; CRAIG, 2010; ZHANEL et al., 2013). CAZ é instável e facilmente hidrolisada por enzimas digestivas em resíduos sem potencial antimicrobiano. Esta molécula perde a sua estabilidade através da variação do pH e da temperatura, sendo pouco administrada por via oral devido a estas particularidades (FALCONE; PATERSON, 2016; JONES et al., 2019).

Uma característica importante no tratamento de algumas infecções é a necessidade de coadministração de CAZ com outro antimicrobiano (BODEY, 1989; KLEIN; CUNHA, 1995; ZASOWSKI; RYBAK; RYBAK, 2015). Além disso, CAZ é um

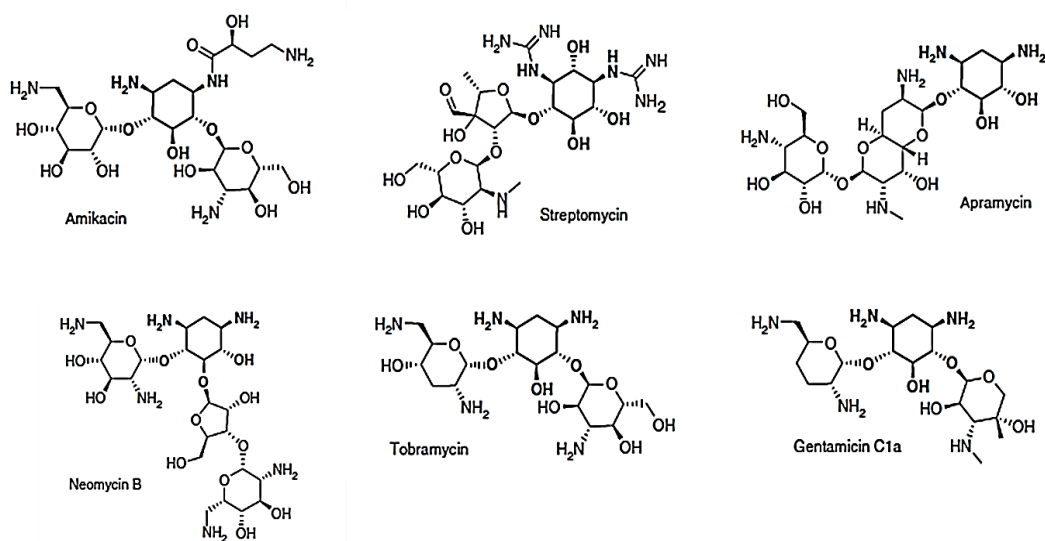
fármaco promissor no tratamento de infecções causadas por BGNs produtores de biofilme devido ao seu amplo espectro de ação, bem como a possibilidade de uma terapia combinada com outros fármacos (JONES et al., 2019; SUN et al., 2020).

2.2.2 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (AGs) são antimicrobianos descobertos desde a década de 40 e continuam sendo amplamente utilizados no combate a infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016; KRAUSE et al., 2016). O primeiro aminoglicosídeo identificado foi a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus* por Waksman em 1944 (EDSON; TERRELL, 1991; HOUGHTON et al., 2010).

Os AGs são formados por oligossacarídeos básicos, amino-açúcares e pseudo-açúcares, como ciclitóis e/ou aminociclitóis (Figura 11). Eles são solúveis em água e são alcalinos (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016; TAKAHASHI; IGARASHI, 2018). Esses antimicrobianos apresentam um anel com dois ou mais amino-açúcares associados a um núcleo aminociclitol, que geralmente está em uma posição central, destacado em negrito na figura 12 (JIANG; KARASAWA; STEYGER, 2017).

Figura 11 – Estrutura de aminoglicosídeos de acordo com base na fração aminociclitol.



Fonte: KRAUSE et al. (2016) e CHILDS-KEAN et al. (2019).

O aminociclitol pode ser uma estreptidina, encontrada na estreptomicina, ou uma 2-desoxistreptamina encontrada em outros AGs (Figura 11) (KRAUSE et al., 2016; MACDOUGALL; CHAMBERS, 2017). Os AGs podem apresentar um anel de desoxistreptamina mono-substituído como a apramicina, um anel de desoxistreptamina 4,5-di-substituído como na neomicina e ribostamicina ou um anel de desoxistreptamina 4,6-di-substituído como encontramos na gentamicina, amicacina, tobramicina e plazomicina (Figura 11) (MAGNET; BLANCHARD 2005; WACHINO; ARAKAWA 2012).

Os AGs desenvolvem sua atividade bactericida através da inibição ou alteração da síntese proteica causando danos à membrana celular ou a outras estruturas bacterianas (LORTHOLARY et al., 1995; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; WILSON, 2014). Esses fármacos têm um amplo espectro antimicrobiano com atividade bactericida frente às bactérias Gram-negativas, incluindo as Enterobacteriales e *P. aeruginosa* (LORTHOLARY et al., 1995; HOUGHTON et al., 2010).

Eles são utilizados também no tratamento de bactérias Gram-negativas resistentes a β -lactâmicos e outras classes de antibióticos de primeira linha (JACKSON; CHEN; BUISING, 2013; RICHTER et al., 2019). É relatado o efeito sinérgico dos AGs quando combinados com β -Lactâmicos, especialmente, no tratamento de infecções causadas por membros da ordem Enterobacteriales, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (LEEKHA; TERRELL; EDSON, 2011; BOYER et al., 2013).

Esses fármacos são cátions altamente polares, desempenham sua atividade antibacteriana em função da concentração e são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, não sendo utilizados pela via oral (LORTHOLARY et al., 1995; MACDOUGALL; CHAMBERS, 2017). Os AGs são eliminados pelos rins por filtração glomerular, sendo uma parte reabsorvida pelas células tubulares renais proximais (EDSON; TERRELL, 1991; NAGAI; TAKANO, 2004; ROBERTS et al., 2012).

Os AGs são nefrotóxicos podendo causar lesão renal aguda com danos geralmente reversíveis (PELOQUIN et al., 2004; AL-MALKY ET AL., 2015). Esses medicamentos se acumulam nas células tubulares proximais renais e interrompem vários processos intracelulares, levando à morte de células epiteliais tubulares e necrose tubular (DORTCH et al., 2011; MAY, 2016).

Os AGs também são ototóxicos promovendo perda auditiva permanente pela danificação das células ciliadas da cóclea do aparelho vestibular (cocleotoxicidade) e/ou distúrbios do equilíbrio devido a alteração de células (vestibulotoxicidade) (JIANG; KARASAWA; STEYGER, 2017; OGIER; LOCKHART; BURT, 2020). A ototoxicidade está diretamente associada à dose administrada e alguns pacientes são geneticamente mais suscetíveis que outros (O'SULLIVAN et al., 2017; ZADA et al., 2020).

Dentre os AGs comercializados, a tobramicina (TOB) destaca-se pela sua ampla utilização na clínica devido seu espectro de ação, ao conhecimento de suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, bem como pela sua atividade frente aos BGNs (FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015; MACDOUGALL; CHAMDBERS, 2017).

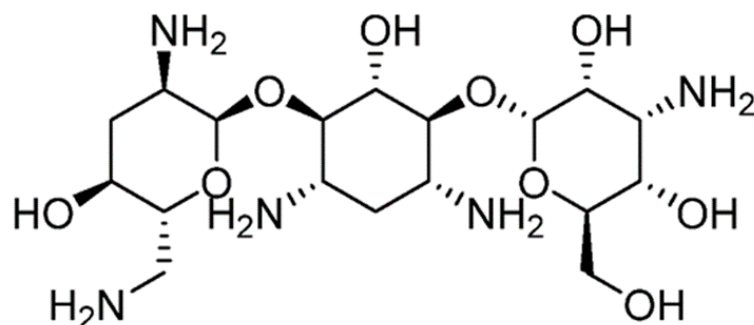
2.2.1.2 Tobramicina

A TOB é um aminoglicosídeo de amplo espectro e um dos componentes do complexo nebramicina produzido por *Streptomyces tenebrarius*, sendo introduzida na prática clínica desde a década de 1970 (LODE, 1998). Ela está relacionada diretamente aos derivados da canamicina e difere no número de grupos hidroxila no açúcar 2,6-diamino-2,6-didesoxi, sendo sua fórmula estrutural $C_{18}H_{37}N_5O_9$ (figura 13) (NEU, 1976; LODE, 1998).

Esse fármaco apresenta potencial antibacteriano e antibiofilme frente a bactérias Gram-negativas, destacando-se pela sua ação em *P. aeruginosa*, sendo utilizado frente a infecções causadas por cepas MDR em combinação com outros antibióticos (HAAGENSEN et al., 2017; ARMIJO et al., 2020).

Comumente, a TOB é administrada em combinação com outros antibióticos para tratar infecções do trato urinário, infecções dos tecidos moles, ginecológicas e infecções respiratórias, incluindo as associadas à fibrose cística, além de peritonite, endocardite, pneumonia, osteomielite, bacteremia e sepse (SHAWAR et al., 1999; KANJ; KANAFANI, 2011; TSENG et al., 2013).

Figura 12 – Estrutura química da tobramicina.



Fonte: CHILDS-KEAN et al. (2019).

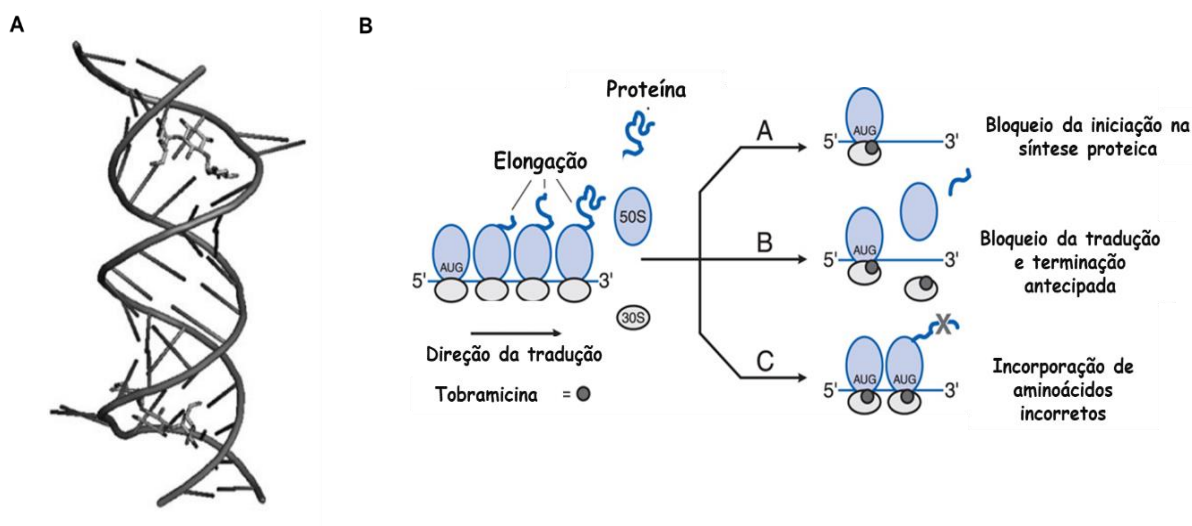
A TOB atua através da inibição da síntese proteica ocasionando a alteração da permeabilidade da membrana celular e, consequentemente, a morte celular (HARTMUTH; VORNLOCHER; LÜHRMANN, 2004; BOTHRA; LODHA; KABRA, 2012). O mecanismo de ação acontece devido à ligação irreversível na região ribossômica 30S ou ligação ao rRNA 16S na região de decodificação do sítio A no ribossomo, induzindo a leitura incorreta do códon e a síntese de proteínas defeituosas (Figura 13) (FELDMAN et al., 2010; SHRESTHA et al., 2015). A TOB também pode alterar o processo de iniciação, alongamento, terminação na tradução através da ligação ao sítio A no RNA ribossômico 16S e da subunidade 30S do ribossomo (Figura 13) (FOURMY et al., 1996; PELOQUIN et al., 2004; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

A TOB apresenta propriedades físico-químicas particulares evidenciadas na Tabela 2. Ela é administrada pela via intramuscular, intravenosa ou por inalação e é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, além de estar disponível em pomadas e soluções oftálmicas. Este fármaco é utilizado pela via inalatória no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, especialmente em pacientes com fibrose cística (RATJEN; BROCKHAUS; ANGYALOSI, 2009; MACDOUGALL; CHAMDBERS, 2017).

A concentração sérica máxima deste fármaco (4 a 6 µg/mL) é alcançada entre 30 e 90 minutos após a administração intramuscular e intravenosa. TOB apresenta meia-vida de aproximadamente 2 h após a administração intravenosa e sua eliminação ocorre quase inteiramente pelos rins via filtração glomerular podendo

variar de acordo com função renal e a distribuição tecidual em cada indivíduo (HAGERMAN; KNECHTEL; KLEPSEK, 2007; FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015).

Figura 13 – Mecanismo de ação da tobramicina (A) na região ribossômica 30S e (B) na região rRNA 16S através da ligação no sítio A no ribossomo.



Fonte: HOUGHTON et al. (2010) e MACDOUGALL e CHAMBERS (2017).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas da tobramicina.

TOBRAMICINA	
Ligação a proteínas	< 10%
Ponto de fusão	178 °C
Solubilidade em água	53,7 mg/mL
LogP	-5,8
Peso molecular	467,5 g/mol
pKa (ácido mais forte)	12,54
pKa (básico mais forte)	9,83
Carga Fisiológica	5

Fonte: PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE (2020) e DRUGBANK (2020).

Como observado em outros aminoglicosídeos, a TOB causa ototoxicidade e nefrotoxicidade, embora apresente baixo perfil de alergia (EDSON; TERRELL, 1991; MACDOUGALL; CHAMBERS, 2017; LIKINE; SELIGSON, 2019). A toxicidade causada pela administração de TOB está bem elucidada, podendo promover perda auditiva ou disfunção auditiva devido aos danos ocasionados na região coclear e nas

células tubulares no néfron (FAUSTI et al., 1999; HAGERMAN; KNECHTEL; KLEPSEK, 2007; GU et al., 2020).

Embora os danos renais sejam reversíveis na maior parte dos pacientes tratados com este fármaco, torna-se necessário a monitoração do nível sérico para minimizar os efeitos tóxicos, especialmente, em pacientes com disfunção renal, problemas auditivos e em tratamento a longo prazo (ARONSON, REYNOLDS, 1992; BOTHRA; LODHA; KABRA, 2012).

A TOB é um fármaco promissor para o tratamento de infecções causadas por BGNs produtores de biofilme devido ao seu amplo espectro de ação, bem como a possibilidade de uma terapia combinada com outros fármacos (FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015; HAAGENSEN et al., 2017; GU et al., 2020).

2.2.3 Terapia combinada

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno em escala mundial e este problema foi estimulado pelo uso excessivo de antimicrobianos comerciais (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011). O surgimento de cepas resistentes, em especial os BGNs, tornou-se um desafio global emergente (PAUL et al., 2014; CAI et al., 2017). Para sobrepor esse desafio é necessária a descoberta de novos antimicrobianos ou a utilização de alternativas como a terapia combinada de antibióticos (FAROOQUI et al., 2015; RAI, 2017).

A terapia combinada consiste na utilização de uma ou mais moléculas/compostos visando a potencialização da atividade biológica (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011). A terapia combinada na prática clínica tem sido recomendada para o tratamento de infecções por décadas, e nos hospitais, as combinações são prescritas para infecções de alta severidade ou coinfeções (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011; YORK, VARADARAJAN, BARLOW, 2020).

A terapia combinada tornou-se amplamente reconhecida sendo preferível comparado à monoterapia para doenças infecciosas com risco de vida (CHEESMAN et al., 2017). A combinação de antimicrobianos é indicada na terapêutica de pneumonia grave adquirida na comunidade ou associada à assistência à saúde,

neutropenia, infecções por *Pseudomonas* na fibrose cística, infecções intra-abdominais e infecções por bactérias Gram-negativas resistentes (TAMMA; COSGROVE; MARAGAKIS, 2012; YORK, VARADARAJAN, BARLOW, 2020).

Esta abordagem terapêutica pode ser usada para ampliar o espectro antimicrobiano, reduzir a toxicidade dos fármacos, reduzir o tempo necessário para a terapia antimicrobiana e tratar infecções mistas ou consideradas graves, pois atinge múltiplas facetas de uma doença e minimiza o estímulo à resistência (TAMMA; COSGROVE; MARAGAKIS, 2012; FAROOQUI et al., 2015; COATES et al., 2020).

Antimicrobianos extensamente utilizados anteriormente na monoterapia, como polimixinas, fosfomicina, cefalosporinas, carbapenêmicos, tigeciclina e aminoglicosídeos estão sendo utilizados de modo combinado para o tratamento de infecções causadas por BGNs resistentes (BASSETTI; RIGHI, 2015; JACOBS et al., 2017; RAI, 2017). Os estudos no campo da avaliação das interações entre os antimicrobianos através da terapia combinada estão tornando-se mais frequente, especialmente, as pesquisas voltadas ao tratamento de infecções causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (PAUL et al., 2014; BASSETTI; RIGHI, 2015).

Tumbarello et al. (2012) associaram colistina a tigeciclina, gentamicina ou meropenem e demonstraram potencialização da atividade antimicrobiana e taxas baixas de mortalidade em infecções associadas a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Pesquisas recentes avaliaram a combinação de β -lactâmicos e AGs com outros antimicrobianos frente a BGNs, como Avery et al. (2019), que comprovaram a melhora dos pacientes com o uso de daptomicina associado a um β -lactâmico no tratamento de bacteremia enterocócica. Olsson et al. (2020) observaram *in vitro* interações sinérgicas ou aditivas de polimixina B com aztreonam, cefepima ou meropenem frente a *P. aeruginosa* MDR. Em 2020, Zhao et al. demonstraram a potencialização do efeito bactericida com a combinação de levofloxacina e da ceftazidima em comparação à monoterapia desses fármacos.

O potencial da interação de β -lactâmicos e aminoglicosídeos foi descrito ao longo dos anos, e foram realizadas análises observacionais, experimentais e intervencionistas demonstrando que realizar uma terapia combinada com um aminoglicosídeo e um β -lactâmico promove benefício terapêutico, especialmente, em pacientes mais gravemente doentes (BOYER et al., 2013; MAY, 2016).

Estudos de interação entre esses antibióticos foram realizados por Korvick (1992), Den Hollander et al. (1997), Chow e Yu (1999), Chamot et al. (2003) e Kang et al. (2005), Yadav et al. (2019), El-Wafa e Ibrahim et al. (2020) Kara et al. (2020). Todos esses estudos evidenciam a eficácia da terapia antimicrobiana combinada de β -lactâmicos e AGs *in vitro* e em pacientes com infecções causadas por BGNs sensíveis e resistentes aos antimicrobianos, uma vez que houve a diminuição da mortalidade em pacientes críticos e redução da quantidade de bactérias. Essa abordagem é particularmente útil em pacientes com fatores de risco para bacteremia (AL-HASAN et al., 2009). A combinação de β -lactâmicos com aminoglicosídeos pode ser utilizada, principalmente, no tratamento de infecções grave como bacteremia, infecções oculares, infecções nosocomiais e infecções polimicrobianas causadas por BGNs (LORTHOLARY et al., 1995; TAKAHASHI; IGARASHI, 2018).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas indicam que a utilização de antibiótico β -lactâmico antipseudomonal associado à tobramicina é comum no combate a infecções causadas por *P. aeruginosa* inclusive no tratamento em pacientes pediátricos com fibrose cística (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2017; LECLEIR; PETTIT, 2017). A CAZ é um β -lactâmico antipseudomonal muito utilizado em coadministração com outro antimicrobiano, principalmente, os aminoglicosídeos antipseudomonais (KLEIN; CUNHA, 1995; ZASOWSKI et al., 2015).

Estudos demonstram o potencial da terapia combinada de TOB (aminoglicosídeo) e CAZ (β -lactâmico) para eliminar as infecções causadas pelos BGNs (DEN HOLLANDER et al., 1997; BLUMER et al., 2005; SHRIVASTAVA; DUNDAR; OTKUN, 2016; VESTERGAARD et al., 2016). Além desses estudos, pesquisas recentes demonstram o potencial sinérgico de CAZ e TOB. Vestergaard et al. (2016) observaram a atividade sinérgica da combinação CAZ com TOB e a ausência de estimulação da resistência nas concentrações testadas frente a cepas MDR de *P. aeruginosa*.

Mataraci-Kara et al. (2020) observaram sinergismo em combinações de antimicrobianos, dentre eles a ceftazidima/avibactam com tobramicina frente as cepas de Enterobacterales (KPC). De forma similar, Almarzoky-Abuhussain, Sutherland e Nicolau (2020) avaliaram a susceptibilidade de cepas de *P. aeruginosa* a combinações

de alguns antimicrobianos. A combinação de CAZ e TOB aumentou a porcentagem de isolados suscetíveis.

CAZ e TOB são fármacos promissores no tratamento de infecções causadas por BGNs produtores de biofilme devido ao seu amplo espectro de ação, suas características farmacodinâmica e farmacocinética, bem como a possibilidade de uma terapia combinada entre si que potencializa sua atividade antibacteriana (FAROUK; AZZAZY; NIESSEN, 2015; HAAGENSEN et al., 2017; JONES et al., 2019; SUN et al., 2020).

Contudo, a administração desses antimicrobianos apresenta limitações como baixa biodisponibilidade, toxicidade e ausência de formas farmacêuticas para administração pela via oral devido à sensibilidade a degradação pelas enzimas digestivas e a dificuldade de atravessar a barreira epitelial do intestino (DE LEO et al., 2010; MICHELON et al., 2019).

Assim, o desenvolvimento de novas estratégias ou tecnologias para administração destes fármacos torna-se imprescindível e tem sido o foco de pesquisas atuais que objetivam a eliminação de infecções causadas por bactérias resistentes (MORENO-SASTRE et al., 2016; SANS-SERRAMITJANA et al., 2017; FARZAMPANAH et al., 2017; MOYÁ et al., 2019).

2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A Nanotecnologia é a ciência relacionada ao desenvolvimento de materiais na escala nanométrica (1 a <1000 nm) (DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018). Nos últimos anos, essa ciência destacou-se pelas contribuições e aplicações dos nanomateriais nos campos da Física, Química, Engenharia e Saúde (Figura 14) (LIN et al., 2015; SULTANA et al., 2020).

A nanotecnologia possibilita a manipulação das propriedades mecânicas, magnéticas, ópticas e catalíticas de materiais e contribui no suprimento de energia, na produção de alimentos, no armazenamento de dados e Biotecnologia (SAFARI; ZARNEGAR, 2014; JEEVANANDAM et al., 2018). No campo das Ciências Biológicas

e da Saúde, ela torna-se relevante devido às aplicações na prevenção, diagnóstico e terapia de muitas doenças (LAM et al., 2018; SULTANA et al., 2020).

Figura 14 – Campos das aplicações e contribuições da nanotecnologia.



Fonte: MESQUITA (2018).

Nas últimas décadas, a nanotecnologia aplicada à área de saúde, em especial a área farmacêutica, trouxe inovações desafiadoras (VAUTHIER; CABANE; LABARRE, 2008). A nanotecnologia farmacêutica é voltada para o design, construção e utilização de estruturas funcionais com foco no desenvolvimento, caracterização e aplicação dos nanocarreadores no tratamento de doenças, incluindo infecções, câncer, distúrbios metabólicos, asma e doenças cerebrais (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; PATRA et al., 2018; SULTANA et al., 2020).

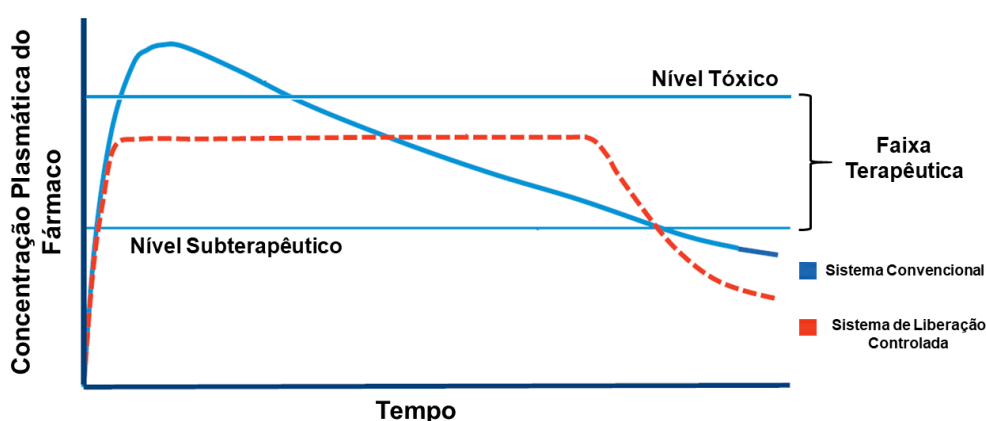
Desde o início da década de 1970, os nanocarreadores tinham como objetivo manter a dose constante na faixa terapêutica (Figura 15), fornecer medicamentos com períodos predefinidos ao mesmo tempo que minimizariam os efeitos colaterais em outros tecidos (JAHANGIRIAN et al., 2017; LAM et al., 2018). Além de permitir administração de fármacos por um período mais longo com dosagens menos frequentes, os nanocarreadores podem penetrar as células e interagir com membranas ou estruturas celulares (RUDRAMURTHY et al., 2016; JAHANGIRIAN et

al., 2017). Essas possibilidades decorrem das características versáteis e únicas como o tamanho nanométrico, a proporção superfície/massa, a possibilidade de direcionamento e a capacidade de adsorver e transportar outros compostos (SAFARI; ZARNEGAR, 2014; JEEVANANDAM et al., 2018).

Os estudos envolvendo as nanoestruturas estão crescendo e são estimulados pelas características e vantagens apresentadas por esses materiais quando comparadas às formas farmacêuticas convencionais, dentre elas, pode-se destacar a permanência no sistema circulatório sanguíneo por um período prolongado, a liberação controlada de fármacos evitando flutuações plasmáticas e manutenção da dose constante na faixa terapêutica (VILLIERS; ARAMWIT; KWON, 2008; LAM et al., 2017).

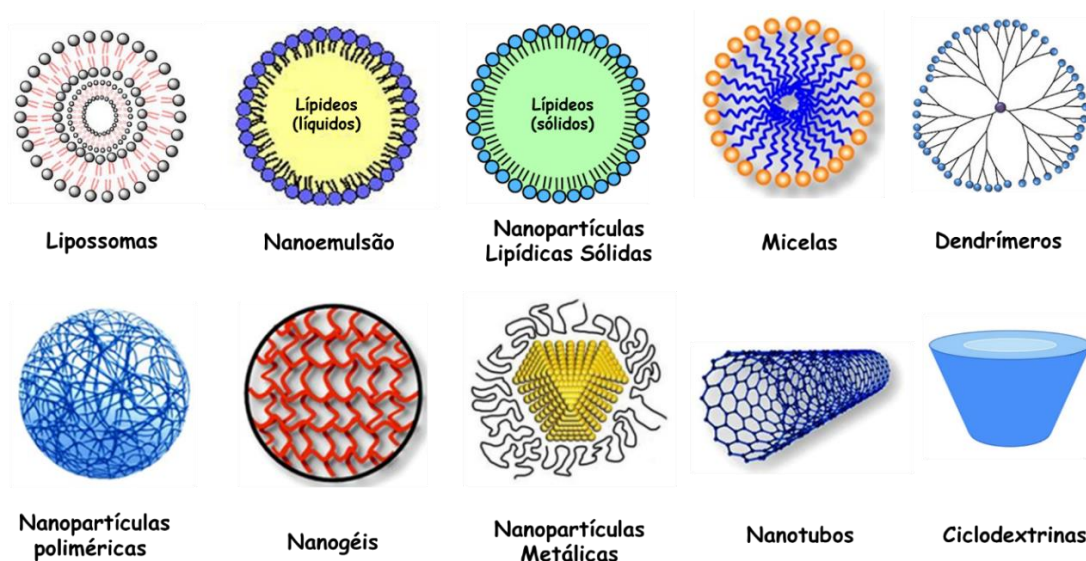
Outras vantagens são a vetorização e o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, a proteção dos princípios ativos da degradação, aumento da absorção celular de fármacos, a biocompatibilidade com as membranas celulares, redução do número de administrações do fármaco, redução dos efeitos adversos do fármaco e consequentemente, melhor qualidade e adesão do paciente à terapêutica (LAM et al., 2017; MATTEUCCI et al. 2018). Nos últimos anos, as principais nanoestruturas usados são dendrímeros, micelas, lipossomas, nanoemulsões, nanotubos, ciclodextrinas, nanogéis, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas metálicas e nanopartículas poliméricas (Figura 16) (DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

Figura 15 – Farmacocinética de formas farmacêuticas convencionais e de sistemas de liberação controlada.



Fonte: CAMPOS (2018).

Figura 16 – Representação de nanoestruturas para entrega de fármacos.



Fonte: Adaptado de KHODABANDEHLOO; ZAHEDNASAB; HAFEZ, (2016), SINGH et al. (2019) e ADEKIYA et al. (2020).

Dentre esses nanocarreadores, destacam-se as nanopartículas poliméricas (NPs) pela eficácia e segurança para aplicação de fármacos, em especial, para administração nasal e oral (VAUTHIER; CABANE; LABARRE, 2008; KHALID; EL-SAWY, 2017).

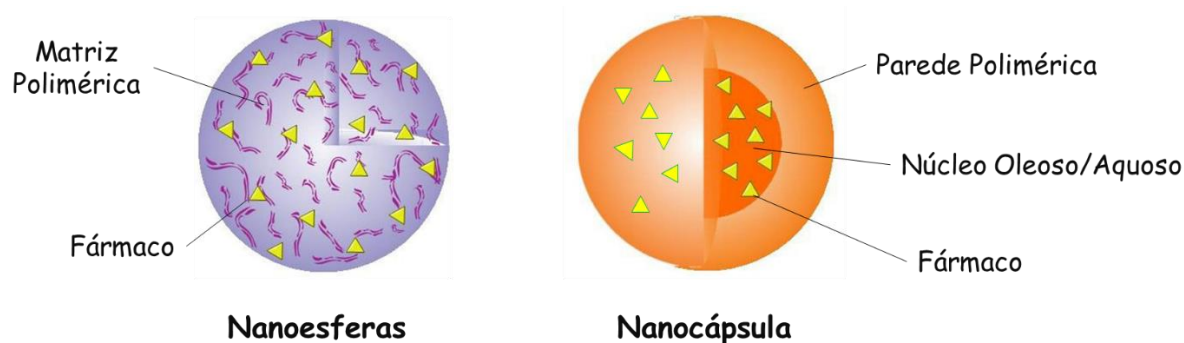
2.3.1 Nanopartículas poliméricas

Na década de 1970, as nanopartículas poliméricas (NPs) foram adquirindo notoriedade e sendo consideradas materiais adequados devido ao tamanho pequeno e pela capacidade de direcionamento de fármacos (VAUTHIER; PONCHEL, 2016). Ao longo dos anos, as NPs tiveram um papel marcante devido às características observadas como design particular, biocompatibilidade e ampla variedade de estruturas (BISWAS et al., 2014; KHALID; EL-SAWY, 2017).

As nanopartículas poliméricas podem ser definidas como partículas sólidas estruturadas por um polímero com tamanho inferior a 1000 nm que podem transportar substâncias bioativas (VAUTHIER; PONCHEL, 2016). O termo nanopartícula é um

nome coletivo para designar as nanocápsulas e as nanoesferas (Figura 17) (BISWAS et al., 2014; DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018).

Figura 17 – Estrutura de nanoesferas e nanocápsulas.



Fonte: Adaptado de PALÁCIO (2018) e de CAVALCANTI (2020).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares formados por um envoltório polimérico sólido com um núcleo líquido ou semissólido à temperatura ambiente. As nanocápsulas podem apresentar o núcleo oleoso, permitindo a encapsulação de moléculas lipossolúveis ou núcleo aquoso capaz de encapsular compostos hidrossolúveis (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

Nas nanocápsulas as substâncias ativas estão encapsuladas no núcleo interno, mas também podem estar adsorvidas na superfície da cápsula (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017). Nesse nanocarreador ocorre a liberação controlada pela difusão do fármaco através da camada polimérica. Se houver interações iônicas entre o composto e o polímero, eles formarão complexos que retardam a liberação do medicamento a partir da cápsula (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; RIZVI; SALEH, 2018).

As nanoesferas são sistemas matriciais cuja massa inteira é sólida e o composto está interagindo diretamente com o polímero podendo estar adsorvido na superfície da esfera ou encapsulado dentro da partícula (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017). O composto pode estar disperso uniformemente e é liberado pela erosão da matriz. Inicialmente, ocorre uma rápida liberação do fármaco associado a grande área superficial das nanopartículas,

seguida por uma liberação controlada (LEE; YEO, 2015; DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018).

As NPs apresentam vantagens como a possibilidade de manipulação das características superficiais e do tamanho de partículas para controlar a penetração nos tecidos, ajustar a solubilidade, aprimorar a elasticidade, gerenciar o padrão de liberação e impedir a degradação pelas enzimas endógenas (ZHANG; SALTZMAN, 2013; RIZVI; SALEH, 2018).

As NPs podem ser consideradas ideais para administração de vacinas, terapia contra câncer, além de fornecerem soluções para entrega de proteínas recombinantes, oligonucleotídeos e antibióticos (KAYSER; LEMKE; HERNANDEZ-TREJO, 2005; KHALID; EL-SAWY, 2017). Além dessas características, esses nanocarreadores destacam-se pela versatilidade das vias de administração, incluindo oral, nasal, parenteral e intraocular (MOHANRAJ; CHEN, 2006; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

A administração por via oral é a forma de administração de fármacos amplamente utilizada uma vez que está associada ao maior grau de adesão do paciente, permite a autoadministração, oferece grande flexibilidade no regime posológico e não necessitam de condições estéreis para sua fabricação (DATE; HANES; ENSIGN, 2016; SON; LEE; CHO, 2017). Embora a administração pela via oral apresente diversas vantagens, a utilização de fármacos com alta hidrofobicidade e hidrofiliabilidade como taxanos, aminoglicosídeos, antibióticos de polieno, é desafiadora devido à baixa solubilidade, permeabilidade e estabilidade metabólica desses compostos no trato gastrointestinal (GAO et al., 2013; DATE; HANES; ENSIGN, 2016). Como estratégia, as NPs podem ser usadas, pois elas protegem os fármacos e os liberam de maneira controlada (PLAPIED et al., 2011; SON; LEE; CHO, 2017).

As NPs podem ser obtidas por muitos métodos, destacando-se a emulsificação-evaporação de solvente, nanoprecipitação e *salting-out* (MASOOD, 2016). Na emulsificação-evaporação do solvente (Figura 18), o polímero é solubilizado em solvente orgânico (fase orgânica), enquanto o estabilizador/surfactante é solubilizado em água (fase aquosa). Os métodos de emulsificação simples (óleo em água) e emulsificação dupla (água em óleo em água) são utilizados para formação de emulsão

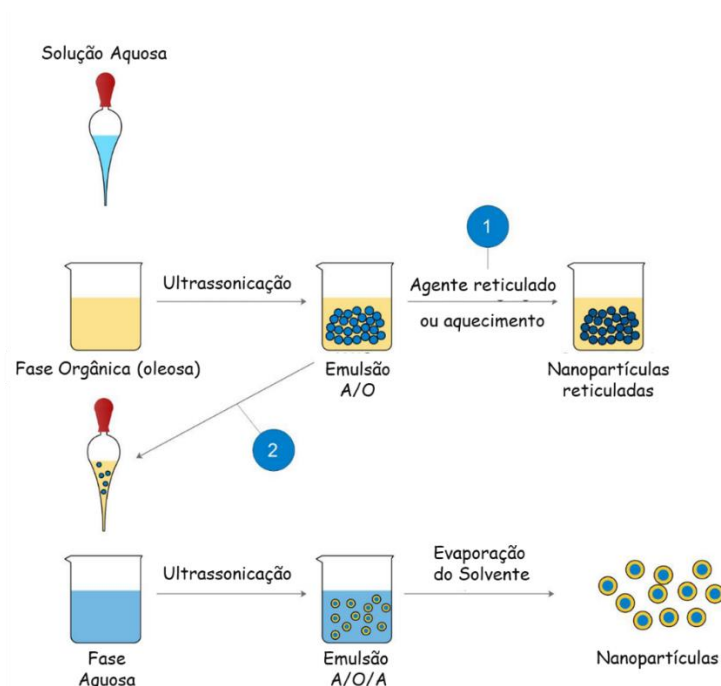
via homogeneização de alta velocidade, seguida de evaporação do solvente (REIS et al., 2006; DALPIAZ et al., 2016).

A evaporação do solvente é alcançada por agitação contínua à temperatura ambiente ou pressão reduzida. Comumente, esta técnica é utilizada para encapsulação de fármacos ou moléculas lipofílicas e exige níveis altos de energia para homogeneização (SURASSMO et al., 2015; MASOOD, 2016).

O método de nanoprecipitação (Figura 19) é baseado na adição gota a gota de fase orgânica, constituída do polímero solubilizado em solvente miscível em água e uma fase aquosa com ou sem estabilizador/surfactante. Essa técnica apresenta alta eficiência de encapsulação, distribuição de tamanho homogêneo e fácil expansão para escala industrial (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; DALPIAZ et al., 2016).

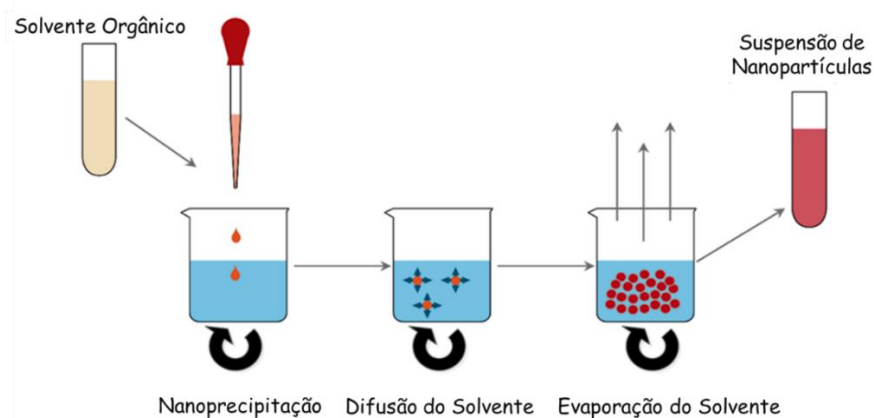
A técnica de *salting-out* (Figura 20) fundamenta-se na emulsificação de uma fase orgânica composta por um polímero solubilizado em solvente orgânico em fase aquosa através da adição de uma alta concentração de um agente (sal ou sacarose). Nesse método, não é necessário o uso de cisalhamento de alta velocidade e solventes clorados, contudo é preciso uma lavagem extensiva das nanopartículas (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; MASOOD, 2016).

Figura 18 – Esquema do método de emulsificação-evaporação do solvente.



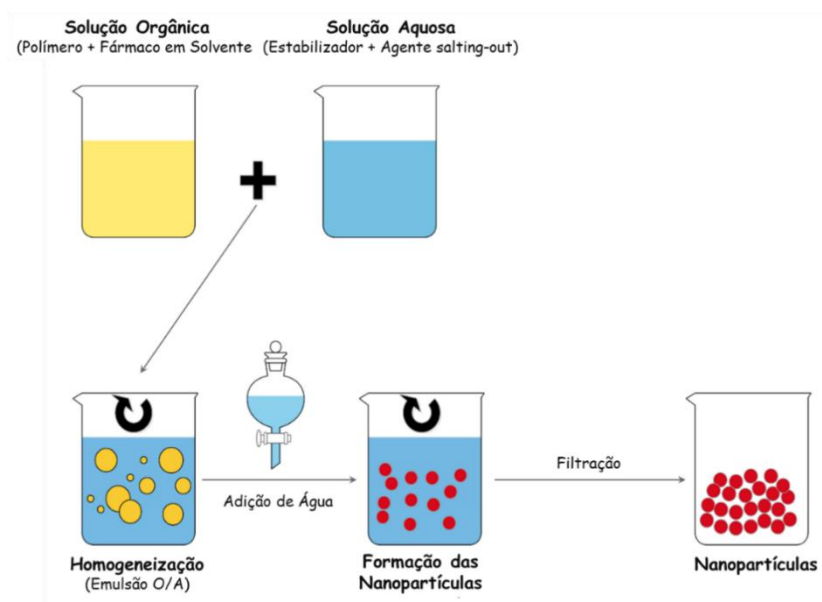
Fonte: TARHINI, GREIGE-GERGES, ELAISSARI (2017).

Figura 19 – Esquema do método de nanoprecipitação.



Fonte: TARHINI, GREIGE-GERGES, ELAISSARI (2017).

Figura 20 – Esquema do método de *salting-out*.



Fonte: TARHINI, GREIGE-GERGES, ELAISSARI (2017).

Além dos diversos métodos para síntese de NPs, a composição da partícula, especialmente o tipo do polímero, é um fator de extrema relevância. Os polímeros podem ser classificados quanto a sua origem como naturais, quando extraídos de um organismo, e sintéticos. A escolha do material para formação das NPs depende de

alguns fatores incluindo a via de administração, as propriedades físico-químicas do fármaco e o alvo desejado (KHALID; EL-SAWY, 2017; SULTANA et al., 2020).

Os polímeros naturais mais aplicados para constituição de NPs são o alginato de sódio, albumina, quitosana e gelatina enquanto os polímeros sintéticos comumente usados são os polilactídeos (PLA), poli (co-glicolídeos de lactídeo) (PLGA), policianoacrilatos, policaprolactona (PCL), ácido poliglutâmico (PGA), poli (N-vinil pirrolidona) (PVP) e poli (álcool vinílico) (PVA) (KHALID; EL-SAWY, 2017; SULTANA et al., 2020). Além dos polímeros citados acima, outros polímeros formados a partir de proteínas como colágeno, seda, caseína, zeína, gliadina e proteínas da soja e do leite estão sendo utilizados para formulação de nanopartículas (ELZOGHBY; ELGOHARY; KAMEL, 2015; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

As nanopartículas à base de proteína estão destacando-se no cenário da pesquisa em nanotecnologia, pois estes nanocarreadores são biodegradáveis, não antigênicos, metabolizáveis, além de apresentarem diversas possibilidades de alteração da superfície e/ou modificação para fixação covalente de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos (WEBER; KREUTER; LANGER, 2000; LEE; LEE; KIM, 2016).

As proteínas utilizadas na síntese de NPs podem ter origem animal ou vegetal. As proteínas animais apresentam baixa toxicidade comparado aos polímeros sintéticos, entretanto podem ser um risco de infecção (PATHAK; THASSU, 2016; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017). As proteínas vegetais, geralmente, apresentam caráter hidrofóbico, algumas são anfifílicas, e a síntese utilizando-as excluem o uso de agentes reticuladores químicos tóxicos, além de serem menos caras que as proteínas animais (DAVIDOV-PARDO; JOYE; MCCLEMENTS, 2015; LUO, 2020).

As nanopartículas a base de proteínas permitem a regulação da concentração de proteínas, solventes, temperatura, pH e reticulador de modo que seja possível ajustar as propriedades adequando para a aplicação final (DAVIDOV-PARDO; JOYE; MCCLEMENTS, 2015; PATHAK; THASSU, 2016). Além disso, essas partículas permitem encapsular um amplo espectro de moléculas ativas e podem ser modificadas para atingir uma área específica (LEE; LEE; KIM, 2016; LUO, 2020).

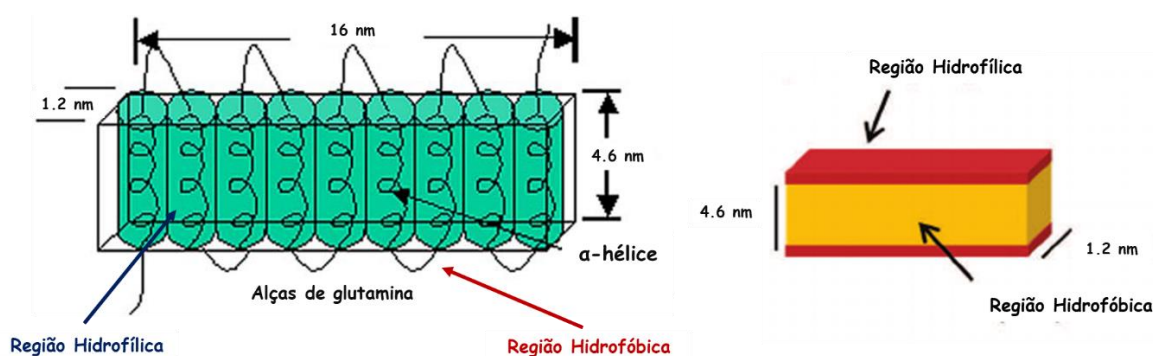
Dentre as proteínas utilizadas para síntese das nanopartículas, a zeína possui propriedades significativas e únicas, incluindo repetibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de fixação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos em sua superfície em comparação com outras nanopartículas baseadas em proteínas (DEMIR et al., 2017; HEEP et al., 2019).

2.3.2 Nanopartículas de zeína

A zeína é uma proteína vegetal proveniente do milho (*Zea mays* L.), isolada e caracterizada por John Gorman em 1821 (WANG; ESEN, 1986; GUO; HEINÄMÄKI; YLIRUUSI, 2008). Esta proteína é utilizada na fabricação de produtos, como fibras têxteis, filmes e plásticos biodegradáveis, revestimentos de alimentos e em formas farmacêuticas para liberação controlada (ZOU et al., 2012; PALIWAL; PALAKURTHI, 2014; ZARGAR et al., 2016). A zeína é formada por quatro principais peptídeos (α -, β -, γ - e δ -zeína) com solubilidade distinta e única (SHUKLA; CHERYAN, 2001; ANDERSON; LAMSAL, 2011; DEMIR et al., 2017).

A α -zeína (Figura 21) é a fração mais abundante, constituindo 80% da zeína total, e inclui dois grupos prolamina com pesos moleculares de 24 e 27 kDa. A β -zeína constitui cerca de 10 a 20% da zeína total, possui abundância do aminoácido metionina e apresenta tamanho de 17 kDa (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PEÑALVA et al., 2015a). A fração γ -zeína apresenta peso molecular de 27 kDa e δ -zeína de 10 kDa e as duas frações totalizam cerca 5-10% de zeína total (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018).

Figura 21 – Representação esquemática da estrutura da α -zeína em 2D.



Fonte: DE VRIES, NIKIFORIDIS e SCHOLTEN, (2014) e LUO e WANG, (2014).

A zeína está classificada no grupo das proteínas prolaminas, proteínas solúveis em ambiente não aquoso com similaridade conformacional a proteínas globulares (MOROS et al., 2002; TRAN et al., 2019). Esta proteína é composta, principalmente, por ácido glutâmico (21 a 26%), leucina (20%), prolina (10%) e alanina (10%), apresentando quantidade relativamente alta de aminoácidos não polares e relativamente baixa de aminoácidos básicos e ácidos (SHUKLA; CHERYAN, 2001; PEÑALVA et al., 2015a).

Do ponto de vista físico-químico, a principal característica da zeína é sua insolubilidade em água, exceto em condições extremas de pH (≥ 11) ou na presença de altas concentrações de ureia, álcool ou detergentes aniônicos (SHUKLA; CHERYAN, 2001). A zeína também se apresenta solúvel na presença de soluções do tipo água-álcool, água-glicóis e água-acetona (LUO; WANG, 2014). O caráter hidrofóbico e a solubilidade única da zeína resultam na fácil obtenção de nanocarreadores de zeína. Ela destaca-se também para síntese de nanopartículas por ser um polímero natural, anfifílico (Figura 22), não imunogênico, de fácil obtenção e baixo custo (PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018; TRAN et al. 2019).

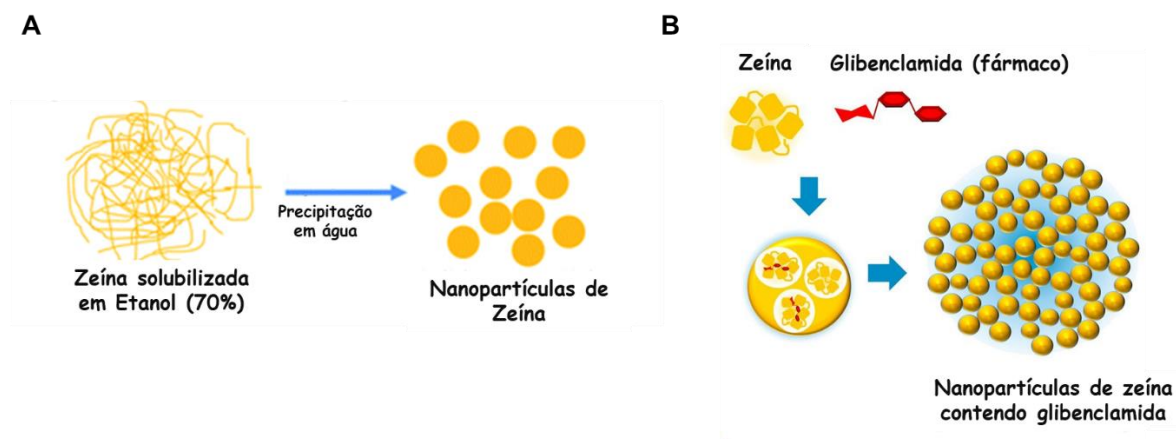
De fato, desde 1985, a zeína foi considerada um excipiente seguro (GRAS) para produtos farmacêuticos orais pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; ZHANG et al., 2015). No desenvolvimento de nanomateriais deve-se levar em consideração a disponibilidade do material base, o baixo custo, o perfil de segurança para uso humano e as propriedades físico-químicas (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014).

Nesse sentido, as nanopartículas sintetizadas a partir da zeína (Figuras 22 e 23) demonstraram essas características desejáveis, bem como a capacidade de liberar controladamente os fármacos e/ou compostos bioativos, a absorção melhorada e a ausência de toxicidade comparada com as formulações sintéticas (LAI; GUO, 2011; ZOU et al, 2012; HASHEM et al., 2015).

As nanopartículas de zeína (NPZs) são consideradas como recursos renováveis e permitem a encapsulação de uma grande variedade de compostos (PEÑALVA et al., 2017). As NPZs podem ser produzidas por método dessolvatação ou coacervação, anti-solvente, nanoprecipitação e por tecnologias de atomização

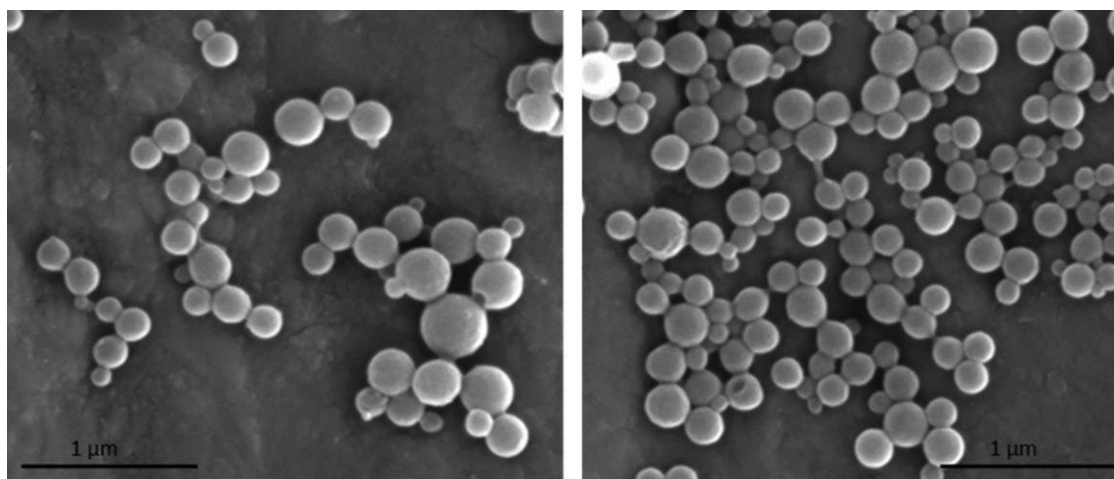
eletro-hidrodinâmica. Essas abordagens de fabricação das NPZs fornecem base para escalonamento industrial (ZHONG et al., 2009; HU et al., 2012; LI et al., 2014).

Figura 22 – Representação das (A) nanopartículas de zeína e de (B) nanopartículas de zeína contendo um fármaco.



Fonte: PALIWAL, PALAKURTHI (2014) e LUCIO et al. (2017).

Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de zeína contendo ácido fólico.



Fonte: PEÑALVA et al. (2015).

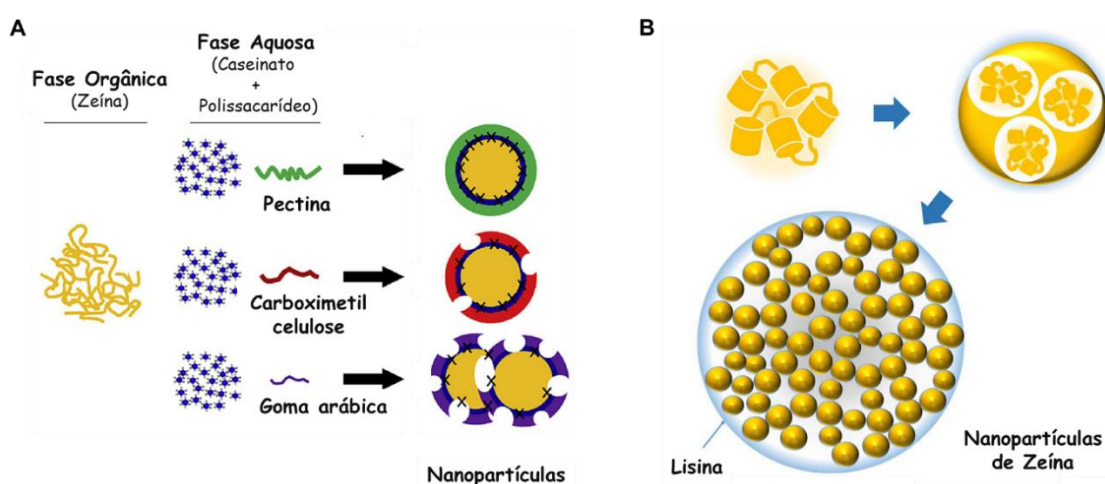
As NPZs sintetizadas pela técnica de nanoprecipitação permitem a formação nanopartículas estáveis (PALIWAL, PALAKURTHI, 2014; HEEP et al., 2019). Contudo, após a formação das partículas, elas devem ser liofilizadas por pulverização para evitar degradação (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017).

As NPZs demonstram tendência à agregação em meio aquoso e/ou a aglomeração durante a etapa de secagem (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017). Com objetivo de evitar agregação, elas devem ser estabilizadas usando proteínas

como a caseína, polissacarídeos como a quitosana ou aminoácidos como a lisina (Figura 24) (PATEL; BOUWENS; VELIKOV, 2010; LUO; TENG; WANG, 2012; PEÑALVA et al., 2015a; CHANG et al., 2017).

Uma característica importante da zeína é a digestibilidade mais lenta, tornando os sistemas de entrega à base de zeína apropriados para a via oral (LABIB, 2018; HEEP et al., 2019). No trato gastrointestinal, as NPZs movem-se lentamente, interagindo com a camada protetora de muco que reveste o epitélio intestinal no qual permanecem retidas (Figura 25) (PEÑALVA et al., 2015b; TRAN et al. 2019).

Figura 24 – Representação das nanopartículas de zeína estabilizadas com (A) caseinato de sódio e polissacarídeos e (B) lisina.

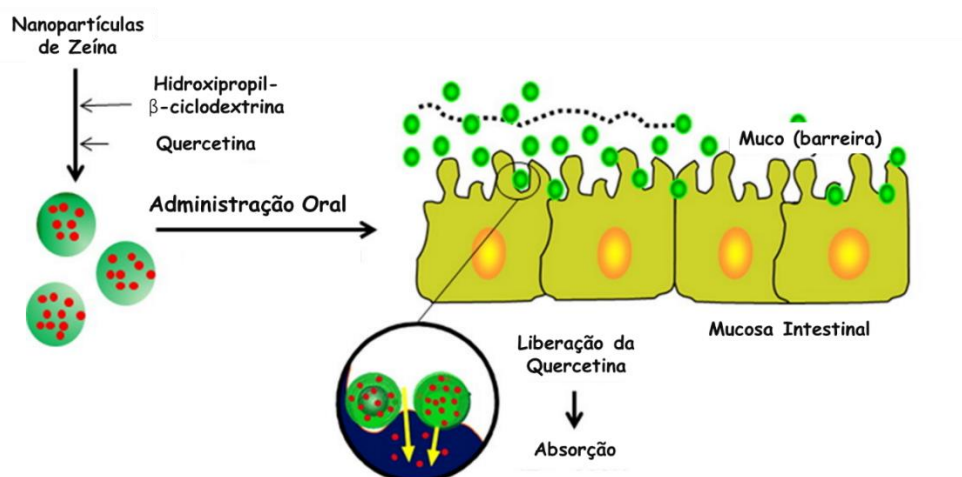


Fonte: CHANG et al. (2017) e LUCIO et al. (2017).

Elas permanecem um longo tempo no intestino, cerca de 24 a 48 h, antes de serem degradadas e/ou eliminadas (PATEL; VELIKOV, 2014). Devido a propriedade de gastrorresistência e a mucoadesão, uma variedade de bioativos foram encapsulados em NPZs para administração oral, incluindo abamectina, ciprofloxacina, 5-fluorouracil, DNA, óleos essenciais, enzimas e polifenóis (LUO; WANG, 2014).

Em 2017, estudos foram realizados encapsulando a quercetina em NPZs. Peñalva et al. (2017) observaram níveis elevados de quercetina no plasma e o aumento da biodisponibilidade oral, além de comprovar o aumento do potencial anti-inflamatório. Moreno et al. (2017) observaram também a melhora na biodisponibilidade e níveis significativos de quercetina no cérebro após a administração pela via oral, bem como a diminuição do comprometimento cognitivo e de memória de camundongos PRONE8 com envelhecimento acelerado (SAMP8).

Figura 25 – Representação da interação e retenção das NPZs na mucosa intestinal e liberação do fármaco encapsulado nas nanopartículas.



Fonte: PEÑALVA et al. (2017).

Em outros estudos, como o realizado por Lucio et al. (2017) foram produzidas nanopartículas de zeína com lisina encapsulando glibenclâmida, fármaco comercial antidiabético, para aplicação pela via oral. Foi observada a melhora da biodisponibilidade e o efeito hipolipidêmico do medicamento encapsulado nas NPZs. Já Ruan et al. (2018) encapsularam o ácido elágico em NPZs, demonstrando boa estabilidade para formulação, atividade anti-inflamatória, além de possibilitar a administração pela oral do ácido elágico.

Em estudos recentes, Shinde et al. (2019) sintetizaram nanopartículas de zeína contendo luteolina e demonstraram atividade antiproliferativa frente as células cancerígenas do cólon SW480 pela via da apoptose. Heep et al. (2019) obtiveram nanopartículas de zeína-caseína-lisina contendo ácido ferúlico para liberação controlada com absorção intestinal pela via oral. Similarmente, Ji et al. (2019) demonstraram que a encapsulação de insulina em NPZs revestidas com quitosana aumentaram a biodisponibilidade da insulina pela via oral.

Em 2019, Bautista et al. encapsularam a limonina e a nomilina (*Citrus máxima*) em nanopartículas de zeína e demonstraram a atividade antiangiogênica e liberação do composto encapsulado no intestino. Em outro estudo, Li et al. (2020) desenvolveram nanopartículas de zeína contendo luteína para administração via oral e foi observado que houve biodisponibilidade aumentada com a encapsulação.

Todos os estudos anteriores demonstram o potencial das NPZs para uso como ingrediente para a formulação de bebidas ou alimentos funcionais, na entrega de fármacos peptídicos/proteicos com baixa biodisponibilidade e/ou insolúveis em água e na entrega de fármacos comerciais (MORENO et al., 2017; LUCIO et al., 2017; RUAN et al., 2018; JI et al., 2019; BAUTISTA et al., 2019; LI et al., 2020).

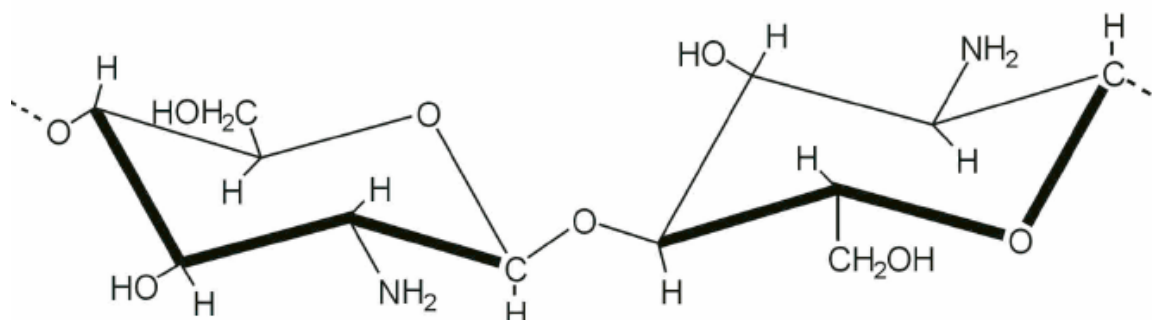
A encapsulação em NPZs aumenta a biodisponibilidade dos compostos quando administrados pela via oral em comparação aos compostos não encapsulados, tornando esse nanocarreador promissor para encapsulação de fármacos, inclusive os comerciais (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017; LABIB, 2018; HEEP et al., 2019; LI et al., 2020).

2.3.3 Quitosana

A quitosana (figura 26) é um polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante obtido de forma natural do exoesqueleto de insetos e crustáceos, além de estar presente na parede celular de fungos (KUMAR, 2000; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009; CHEUNG et al., 2015). A quitosana é um copolímero de estrutura β -1,4-D-glucosamina que apresenta solubilidade depende do seu grau de desacetilação, peso molecular e da distribuição dos grupos acetila ao longo de sua cadeia estrutural, composta majoritariamente por carbono, nitrogênio e hidrogênio (RINAUDO, 2006; HALIM et al., 2016; KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

As principais propriedades da quitosana são viscosidade, mucoadesividade, baixa toxicidade, baixa antigenicidade, biocompatibilidade, formação de polioxissal, comportamento de polieletrólitos, capacidade de formar filmes e quelação de metais. A quitosana também tem o potencial de se ligar a células microbianas e de mamíferos (HIRANO et al., 1991; KUMAR, 2000; SHUKLA et al., 2013). Devido a esta propriedade, a quitosana pode ser utilizada como polímero constituinte de nanocarreadores para liberação controlada de fármacos, especialmente, como revestimento de superfície para nanopartículas de uso oral, ocular, transdérmica, nasal e intravenoso (SHUKLA et al., 2013; IBRAHIM; EL-ZAIRY, 2015).

Figura 26 – Estrutura química da quitosana.



Fonte: LÓPEZ-GARCÍA et al. (2014).

Estudos foram desenvolvidos com objetivo de produzir nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana. Nesse sentido, De Lima et al. (2021) desenvolveram e comprovaram que as nanopartículas de policaprolactona (PCL) revestidas com quitosana contendo 5-fluorouracil promoveram inibição significativa da proliferação de células cancerígenas câncer oral humano CAL27 e HSC3 através da ativação da autofagia. Berni et al. (2022) produziram e evidenciaram o aumento da atividade acaricida de nanopartículas de PCL revestidas com quitosana contendo amitraz e fluazuron, especialmente, quando foram associados numa única administração.

Azzazy et al. (2021) produziram e mostraram que nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) revestidos com quitosana contendo alcaloides de harmala potencializaram as propriedades antibacterianas e cicatrizantes sinérgicas em feridas infectada por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Fong et al. (2022) produziram e comprovaram que nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana contendo Stattic, inibidor do transdutor de sinal antimetastático e ativador de transcrição 3, aumentaram a anti-migração celular *in vitro* das células de câncer de mama 4T1 e MDA-MB-231 e a supressão do crescimento tumoral *in vivo*.

Estudos com nanopartículas de base proteica revestidas com quitosana, assim, Piazzini et al. (2019) sintetizaram nanopartículas de albumina sérica humana revestidas com quitosana e comprovaram que o revestimento potencializou a abertura pelas junções oclusivas e comunicantes permitindo o transporte de moléculas através da barreira e maior potencial de penetração para entrega no cérebro via nasal. Pauluk

et al. (2019) desenvolveram nanopartículas de zeína revestidas com quitosana para administração oral de resveratrol comprovando que o revestimento melhorou as propriedades mucoadesivas e potencializou a atividade antioxidante do resveratrol. Song et al. (2022) desenvolveram nanopartículas de zeína revestidas com dextrano sulfato/quitosana carregadas com crocina que exibiram liberação controlada do carotenóide, maior atividade antioxidante e redução da proteína amilóide- β ($A\beta$), melhorando o quadro clínico de doença de Alzheimer. Assim, o revestimento de nanopartículas com quitosana é promissor para estabilidade das nanopartículas, proteção e liberação controlada dos fármacos e permite a administração via nasal e oral (PIAZZINI et al., 2019; PAULUK et al., 2019; FONG et al., 2022).

3 ARTIGO 1

NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL: MÉTODOS DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.

Luís André de Almeida Campos ^{1,2}, Azael Francisco Silva Neto¹, Milena Ferreira de Lima¹, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{2,3}, Nereide Stela Santos-Magalhães¹

¹Setor de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Setor de Microbiologia Clínica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

³Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV), Rua Alto do Reservatório, Alto José Leal, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A zeína é uma proteína vegetal proveniente do milho (*Zea mays* L.) com característica gastrorresistente, mucoadesiva, de fácil obtenção, baixo custo e permite a encapsulação de bioativos com de caráter hidrofílico e hidrofóbico. Os métodos utilizados para síntese dessas nanopartículas são precipitação antissolvente, nanoprecipitação, pH-driven, eletropulverização, emulsificação-evaporação de solvente e auto-montagem induzida por calor. Cada método apresenta vantagens particulares na preparação dessas nanopartículas, embora todas as técnicas possibilitem a produção de nanocarreadores de zeína estáveis e resistentes aos fatores ambientais que podem ser utilizados na áreas agrícola, cosmética, de alimentos e produtos farmacêuticos com a aplicação para diversas atividades biológicas. Nesse sentido, as nanopartículas de zeína são nanocarreadores promissores para encapsular uma variedade de bioativos com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e antidiabética para

administração oral. Assim, o objetivo deste artigo foi descrever os principais métodos para obtenção de nanopartículas de zeína contendo bioativos, apresentando suas vantagens e características de cada método, além das principais aplicações biológicas dessas formulações.

Palavras-chave: Anticâncer; antimicrobiano; antioxidante; eletropulverização; pH driven; precipitação antissolvente.

Abstract

Zein is a vegetable protein from corn (*Zea mays* L.) with gastro-resistant, mucoadhesive, easy-to-obtain, low-cost characteristics and allows the encapsulation of bioactives with hydrophilic and hydrophobic character. The methods used for the synthesis of these nanoparticles are anti-solvent precipitation, nanoprecipitation, pH-driven, electrospray, emulsification-solvent evaporation and heat-induced self-assembly. Each method has advantages in the preparation of these nanoparticles, although all techniques allow the production of stable zein nanocarriers that are resistant to environmental factors that can be used in agricultural, cosmetic, food and pharmaceutical areas with application for various biological activities. In this sense, zein nanoparticles are promising nanocarriers to encapsulate a variety of bioactives with anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anticancer and antidiabetic properties for oral administration. Thus, the objective of this article was to describe the main methods for obtaining zein nanoparticles containing bioactives, presenting their advantages and characteristics of each method, in addition to the main biological applications of these formulations.

Keywords: Anticancer; antimicrobial; antioxidant; electrospray; pH driven; anti-solvent precipitation.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é a ciência relacionada ao desenvolvimento e uso de sistemas e materiais na escala nanométrica, e, nas últimas décadas, esta ciência está sendo aplicada na área de saúde, em especial, na área farmacêutica (VAUTHIER;

CABANE; LABARRE, 2008; SAFARI; ZARNEGAR, 2014; JEEVANANDAM et al., 2018). A nanotecnologia farmacêutica é voltada para o design, construção e utilização de nanoestruturas funcionais com foco no desenvolvimento, caracterização e aplicação dos nanocarreadores na conservação de alimentos e na prevenção, diagnóstico e terapia de doenças (BOISSEAU; LOUBATON, 2011; DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018; PATRA et al., 2018; SULTANA et al., 2020).

Os nanocarreadores apresentam vantagens como a permanência no sistema circulatório por um período prolongado, a liberação controlada de fármacos evitando flutuações plasmáticas e manutenção da dose constante na faixa terapêutica, a vetorização e o aumento da biodisponibilidade dos fármacos, a proteção dos princípios ativos da degradação, aumento da absorção celular de fármacos, a biocompatibilidade com as membranas celulares, redução do número de administrações do fármaco, redução dos efeitos adversos do fármaco e consequentemente, melhor qualidade e adesão do paciente à terapêutica (VILLIERS; ARAMWIT; KWON, 2008; LAM et al., 2017; MATTEUCCI et al. 2018).

Dentre os nanocarreadores desenvolvidos, destacam-se as nanopartículas poliméricas (NPs). As nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) podem ser definidas como partículas sólidas estruturadas por um polímero que podem transportar substâncias bioativas (VAUTHIER; CABANE; LABARRE, 2008; VAUTHIER; PONCHEL, 2016). Esses nanocarreadores destacam-se pela versatilidade na encapsulação de bioativos hidrofílicos e hidrofóbicos, bem como pela possibilidade nas vias de administração, incluindo oral, nasal, parenteral e intraocular (MOHANRAJ; CHEN, 2006; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

As nanopartículas poliméricas podem ser produzidas a partir de diferentes polímeros, incluindo os proteicos formado por colágeno, seda, caseína, zeína, gliadina e proteínas da soja e do leite (ELZOGHBY; ELGOHARY; KAMEL, 2015; TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017). As nanopartículas à base de proteína estão se destacando no cenário da pesquisa em nanotecnologia, pois estes nanocarreadores são biodegradáveis, não antigênicos, metabolizáveis, além de possibilitarem a funcionalização da superfície (WEBER; KREUTER; LANGER, 2000; LEE; LEE; KIM, 2016).

A zeína, uma proteína vegetal, é considerada promissora na síntese de nanopartículas por possuir propriedades significativas e únicas, incluindo repetibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade de encapsulação de fármacos e a possibilidade da complexação de ligantes hidrofóbicos e hidrofílicos em sua superfície (DEMIR et al., 2017; HEEP et al., 2019). Devido às propriedades apresentadas pelo polímero de zeína, uma variedade de bioativos foram encapsulados em nanopartículas de zeína para administração oral, incluindo abamectina, ciprofloxacina, limonina, nomilina luteína, insulina, quercetina, glibenclamida, ácido elágico, DNA, óleos essenciais, enzimas e polifenóis (LUO; WANG, 2014; MORENO et al., 2017; RUAN et al., 2018; JI et al., 2019; BAUTISTA et al., 2019 LI et al., 2020)

Os métodos mais comuns utilizados para síntese dessas nanopartículas são precipitação antissolvente, nanoprecipitação, pH-driven, eletropulverização, emulsificação-evaporação de solvente e auto-montagem induzida por calor, e cada método apresenta suas vantagens na preparação desses nanocarreadores (WEI et al., 2018; RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019; WANG, ZHANG, 2019; LI, YU, 2020; YUAN et al., 2020; ZHAN et al., 2020; CUI et al., 2021; DE ARAUJO et al., 2021; TAVARES et al., 2021).

Nesse sentido, as nanopartículas de zeína são nanocarreadores promissores para encapsular uma variedade de bioativos com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e antidiabética para administração intravenosa, nasal e oral (ZHANG et al., 2014; LI et al., 2018; RUAN et al., 2018; SOE et al., 2019; GAGLIARDI et al., 2019; INCHAURRAGA et al., 2020; LIU et al., 2020; MENG et al., 2021; DE SOUZA TAVARES et al., 2021). Assim, o objetivo deste artigo foi revisar, com base em estudos publicados entre 2015 e 2021, os principais métodos para obtenção de nanopartículas de zeína contendo bioativos e descrever as principais aplicações biológicas dessas formulações de base nanotecnológica.

NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA

Zeína

A zeína é uma proteína proveniente do milho (*Zea mays* L.), inicialmente, isolada e caracterizada por John Gorman em 1821 (WANG; ESEN, 1986; GUO; HEINÄMÄKI; YLIRUUSI, 2008). Esta proteína é utilizada na fabricação de produtos, como fibras têxteis, filmes e plásticos biodegradáveis, revestimentos de alimentos e em formas farmacêuticas para liberação controlada (ZOU et al., 2012; PALIWAL; PALAKURTHI, 2014; ZARGAR et al., 2016).

A zeína é formada por quatro principais peptídeos (α -, β -, γ - e δ -zeína) com solubilidade e sequência de aminoácidos distintas (SHUKLA; CHERYAN, 2001; ANDERSON; LAMSAL, 2011; DEMIR et al., 2017). A α -zeína é a fração mais abundante, constituindo 80% da zeína total, e inclui dois grupos prolamina com pesos moleculares de 24 e 27 kDa. A β -zeína constitui cerca de 10 a 20% da zeína total, possui abundância do aminoácido metionina e apresenta tamanho de 17 kDa (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PEÑALVA et al., 2015). A fração γ -zeína apresenta peso molecular de 27 kDa e δ -zeína de 10 kDa, as duas frações totalizam cerca 5-10% de zeína total (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018).

A zeína está classificada no grupo das proteínas prolaminas, proteínas solúveis em ambiente não aquoso com similaridade conformacional a proteínas globulares convencionais (SHUKLA; CHERYAN, 2001; TRAN et al., 2019). A composição principal da zeína é ácido glutâmico (21 a 26%), leucina (20%), prolina (10%), alanina (10%), apresentando quantidade relativamente alta de aminoácidos não polares e relativamente baixa de aminoácidos básicos e ácidos (SHUKLA; CHERYAN, 2001; PEÑALVA et al., 2015).

Do ponto de vista físico-químico, a principal característica da zeína é sua insolubilidade em água, exceto em condições extremas de pH (≥ 11) ou na presença de altas concentrações de ureia, álcool ou detergentes aniônicos (SHUKLA; CHERYAN, 2001). A zeína também se apresenta solúvel na presença de soluções do tipo água-álcool, água-glicóis e água-acetona (Luo; Wang, 2014). O caráter hidrofóbico e a solubilidade única da zeína resultam na fácil obtenção nanocarreadores de zeína. Ela destaca-se na síntese de nanopartículas por ser um polímero natural, anfifílico, não imunogênico, de fácil obtenção e baixo custo (PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018; TRAN et al. 2019).

De fato, desde 1985, a zeína foi considerada um excipiente seguro (GRAS) para produtos farmacêuticos orais pelo Food and Drug Administration (FDA) (ZHANG

et al., 2015). No desenvolvimento de nanomateriais, deve-se levar em consideração a disponibilidade do material base, o baixo custo, o perfil de segurança para uso humano e as propriedades físico-químicas (PALIWAL; PALAKURTHI, 2014).

Nesse sentido, as nanopartículas sintetizadas a partir da zeína demonstraram características desejáveis, bem como a capacidade de liberar controladamente os fármacos e/ou compostos bioativos, a absorção melhorada e a ausência de toxicidade comparada com as formulações sintéticas (LAI; GUO, 2011; ZOU et al., 2012; HASHEM et al., 2015).

Características das nanopartículas de zeína

As nanopartículas de zeína (ZNPs) são consideradas como recursos renováveis e permitem a encapsulação de uma grande variedade de ativos. Essas nanopartículas apresentam-se estáveis após sua obtenção, contudo, após a formação das partículas, elas devem ser liofilizadas por pulverização para evitar degradação (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017; PEÑALVA et al., 2017; HEEP et al., 2019).

As ZNPs demonstram tendência a agregação em meio aquoso e/ou a aglomeração durante a etapa de secagem. Com objetivo de superar essa limitação e evitar a agregação, elas podem ser estabilizadas usando proteínas como a caseína, aminoácidos, como a lisina e polissacarídeos como uma segunda camada de polímero, incluindo a quitosana, pectina, alginato, fucana e dextrana (LUO; TENG; WANG, 2012; CHANG et al., 2017; IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017; LI, YU, 2020).

Uma característica importante das ZNPs é a digestibilidade mais lenta, tornando-as sistemas de entrega apropriados para a via oral (LABIB, 2018; HEEP et al., 2019). No trato gastrointestinal, as ZNPs movem-se lentamente, interagindo com a camada protetora de muco que reveste o epitélio intestinal no qual permanecem retidas por cerca de 24 a 48 h, antes de serem degradadas e/ou eliminadas (PEÑALVA et al., 2015; TRAN et al. 2019).

As ZNPs podem ser produzidas por métodos associados a precipitação dos polímeros, emulsificação-evaporação e por tecnologias de atomização eletro-hidrodinâmica. Essas abordagens de fabricação das NPZs fornecem base para escalonamento industrial (ZHONG et al., 2009; HU et al., 2012; LI et al., 2014).

MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS ZEÍNA

Os métodos utilizados para síntese de nanopartículas podem ser classificados em top-down, quando ocorre a produção de nanopartículas quebrando materiais a granel ou partículas maiores em menores, e o bottom-up, quando as nanopartículas são formadas a partir da montagem de moléculas ou partículas menores (ZHANG, CHIU LI, MAO, 2014; DU et al., 2015; CUI et al., 2021).

Comumente, as nanopartículas de zeína são sintetizadas a partir do método bottom-up pelas técnicas de precipitação antissolvente, nanoprecipitação, pH-driven, eletropulverização, emulsificação-evaporação de solvente e automontagem induzida por calor (WEI et al., 2018; RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019; WANG, ZHANG, 2019; LI, YU, 2020; YUAN et al., 2020; ZHAN et al., 2020; CUI et al., 2021; DE ARAUJO et al., 2021; TAVARES et al., 2021).

Método de precipitação antissolvente

Essa técnica é simples, dispensando equipamentos especializados e condições operacionais complexas, com baixo risco de contaminação da amostra, de baixo custo, e pode ser facilmente ampliada por isso é muito utilizada na indústria (KAKRAN et al., 2012; JOYE, MCCLEMENTS, 2013; YUAN et al., 2020). Esse método baseia-se na utilização de dois solventes líquidos totalmente miscíveis, onde o soluto é solúvel no primeiro solvente, mas não solúvel no segundo solvente. Portanto, a adição do antissolvente induz a formação de uma solução dos dois líquidos, a supersaturação e precipitação do soluto (REVERCHON, 1999; KAKRAN et al., 2012).

Na síntese de ZNPs, comumente, uma solução orgânica contendo o biopolímero e o princípio ativo solubilizados é adicionada a uma solução aquosa. Devido à mudança na polaridade, o polímero se automontará formando uma camada externa de grupo hidrofílico e um núcleo hidrofóbico interno, encapsulando o princípio ativo. Em seguida, o solvente orgânico é removido por evaporação ou extração e, assim, ocorre a precipitação do biopolímero e as nanopartículas são produzidas (STEWART et al., 2014; WANG et al., 2018).

Esse método é bastante utilizado para a produção de ZNPs, pois a zeína forma nanopartículas pela alteração da solubilização do solvente primário por meio da

diluição com um não solvente (YUAN et al., 2019). Para fabricação de ZNPs a partir desse método, comumente, a zeína é solubilizada em solução de etanol em água variando entre 60% e 90%. Os fármacos são adicionados a solução de zeína em etanol. A água ultrapura é adicionada a esta solução para formação das nanopartículas e o solvente orgânico é removido, comumente, por evaporação a vácuo (DAI et al., 2017; WANG et al., 2018; YUAN et al., 2019; YUAN et al., 2020; CUI et al., 2021).

Para a mistura da fase orgânica com a aquosa, alguns estudos utilizam o gotejamento com o auxílio de seringa sob agitação magnética (DAI et al., 2017; MORENO et al., 2017; WANG et al., 2018; YUAN et al., 2019; YUAN et al., 2020), enquanto outros realizam este processo sob cisalhamento ultrassônico com um homogeneizador (CUI et al., 2021).

Após a síntese das partículas, alguns estudos realizam a liofilização para manutenção da estabilidade desses sistemas de entrega (YUAN et al., 2020; CUI et al., 2021). As características físico-químicas como diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação de nanopartículas de zeína produzidas a partir da precipitação antissolvente estão descritas na tabela 1.

Estudos realizado pelo método de precipitação antissolvente exibiram liberação controlada de benzoato de emamectina (CUI et al., 2021), melhoraram a estabilidade de curcumina frente a variação térmica, irradiação UV e alta força iônica (DAI et al., 2017), permitiram a liberação controlada de β -caroteno e melhor estabilidade em condições gastrointestinais simuladas (WANG et al., 2018), mantiveram a estabilidade em pH 3,0 a 8,0, frente a variação térmica, a alta força iônica e não foram citotóxicas para células epiteliais renais humanas (células 293) (YUAN et al., 2019), a curcumina continuou estável frente a variação de pH, ao aquecimento, ao armazenamento e não exibiram toxicidade frente as células epiteliais normais do cólon (células NCM460) (YUAN et al., 2020).

Tabela 1 – Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por precipitação antissolvente.

ZNPs	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE%	Referências
Nanopartículas de curcumina carregadas com zeína/lecitina	228 a 428	-	+ 26 a +5	42.03 a 99.83	Dai <i>et al.</i> , 2017.
Nanopartículas de zeína carregadas de β -caroteno	420,9 $\pm$ 2,34	0.225	-32,7 $\pm$ 0,29	32 a 50	Wang <i>et al.</i> , 2018.
Nanopartículas de zeína revestida com carboximetil quitosana carregadas com β -caroteno	150,7 $\pm$ 0,89	0.201	-44,6 $\pm$ 0,21	75 a 81	Wang <i>et al.</i> , 2018.
Nanopartículas de zeína revestida com carboximetilquitosana e polifenóis encapsulando β -caroteno	70,41 $\pm$ 0,67	0.195	-45,1 $\pm$ 0,19	89,5 a 91,5	Wang <i>et al.</i> , 2018.
Sulfato de condroitina revestindo nanopartículas de zeína	148,0	0.200	-38,1	-	Yuan <i>et al.</i> , 2019.
Nanopartículas de zeína revestido com sulfato de dextrano contendo curcumina	199,27 $\pm$ 3,48	0.17	-34,07 $\pm$ 1,20	85,37	Yuan <i>et al.</i> , 2020.
Nanopartículas de zeína carregadas com benzoato de emamectina	197 $\pm$ 2	0.124	+11,8 $\pm$ 2,2	87	Cui <i>et al.</i> , 2021.

Fonte: O autor (2022).

PDI: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação.

Como evidenciado nos estudos citados acima, a precipitação do antissolvente é uma técnica promissora para a produção de nanopartículas, especialmente, por polímeros proteicos alimentares para entrega controlada de bioativos. Por essa técnica pode-se controlar as propriedades das partículas, como tamanho, morfologia e estado físico. Além disso, os processos antissolventes são simples, escalonáveis e aplicáveis para encapsular diversos bioativos, sendo amplamente utilizados na indústria para a produção de nanopartículas para fins alimentares e farmacêuticos (JOYE, MCCLEMENTS, 2013; WANG *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2021).

Nanoprecipitação

O método de nanoprecipitação é baseada na deposição interfacial devido ao deslocamento de um solvente com o não solvente. Nesse método, pode-se obter as nanopartículas via diálise e gotejamento (RIVAS *et al.*, 2017). Na técnica de gotejamento ocorre a adição gota a gota de fase orgânica, constituída do polímero solubilizado em solvente miscível em água e uma fase aquosa com ou sem estabilizador/surfactante (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; RIVAS *et al.*, 2017).

Para síntese de ZNPs utilizando o método de nanoprecipitação, a zeína é solubilizada em solução de etanol em água variando entre 70% e 96%. Os fármacos, óleos e compostos são adicionados a solução de zeína em solução de etanol sob agitação magnética. A água ultrapura com os surfactantes (fase aquosa), normalmente, contendo pluronic, é adicionada e homogeneizada sob cisalhamento ultrassônico usando um Ultraturrax para formação das nanopartículas, e ao final, o solvente orgânico é removido (GAGLIARDI *et al.*, 2018; DE MELO *et al.*, 2019; NUNES *et al.*, 2020; ROSA *et al.*, 2020; DE ARAUJO *et al.*, 2021; DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021).

Para a remoção do solvente orgânico, é observado a utilização de rotaevaporação sob pressão reduzida a vácuo (MORENO *et al.*, 2017), agitação mecânica em placa magnética (GAGLIARDI *et al.*, 2018), evaporação sob agitação magnética (DE MELO *et al.*, 2019; DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021; DE ARAUJO *et al.*, 2021) e em coifa com exaustão (ROSA *et al.*, 2020) ou centrifugação utilizando filtro de peso molecular de 30 kDa seguida de ressuspensão para recuperar as NPs (NUNES *et al.*, 2020). Após a síntese das partículas, pode ser realizada a liofilização e purificação por meio diálise ou centrifugação (MORENO *et al.*, 2017; GAGLIARDI *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2020).

Pela técnica de nanoprecipitação, pode-se obter características físico-químicas como diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação de nanopartículas desejáveis e promissoras como evidenciadas na tabela 2.

As nanopartículas de zeína desenvolvidas via nanoprecipitação apresentam estabilidade de armazenamento, térmica até 50 °C, frente as alterações de pH, a liofilização, aos fluidos biológicos, além de não ser tóxica para células de câncer de pulmão humano (A549) e células de leucemia mielóide crônica humana (K562) (GAGLIARDI *et al.*, 2018). As OG-NPT e PR-NPT exibiram boa estabilidade físico-química e de armazenamento durante os 180 dias de armazenamento (DE MELO *et al.*, 2019). Enquanto, EOO-NPT e EOT-NPT mostraram estabilidade física e química em armazenamento por 90 dias, liberação controlada e resistência térmica aos processos de panificação, protegendo o pão da proliferação de bolores e leveduras (DA ROSA *et al.*, 2020). As RSV-loaded NPs apresentaram estabilidade por 28 dias a 4 ° C, baixa toxicidade para as linhagens de células Caco-2 e HT29-MTX colorretais humanas e capacidade de proteger o RSV de eventos do metabolismo (NUNES *et al.*, 2020).

E as ZA mostraram estabilidade com a dimetilglioxima, agente estabilizador, e alta eficiência de encapsulação do ácido anacárdico (AA), bem como aumento da atividade antimicrobiana devido a associação da zeína ao AA pelas porções aromáticas e alifáticas (DE ARAUJO *et al.* 2021). Enquanto as NEA apresentaram aumento no potencial antioxidante e antibacteriana devido a interação entre EA e zeína, pois os grupos fenólicos ativos desta molécula tornam-se acessíveis após a encapsulação (DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021).

Como observado nos estudos, a nanoprecipitação é método usado para encapsulação de compostos naturais, hidrofóbicos ou hidrofílicos e uma boa estratégia para a produção de nanopartículas em laboratório e em escala industrial (RIVAS *et al.*, 2017; PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018). Essa técnica é econômica, verde, pouco complexa, de fácil reprodutibilidade e é amplamente aplicável sem quaisquer aditivos para a fabricação de nanoesferas. Ela apresenta a alta eficiência de encapsulação, distribuição de tamanho homogêneo e fácil expansão para escala industrial (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; DALPIAZ *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por nanoprecipitação.

ZNPs	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE%	Referências
Nanopartículas de zeína revestidas com desoxicolato encapsulando ácido todo-trans-retinóico	93.5 a 127	0.1	-34 ± 2,9 a 21 ± 2,4	14 a 28	Gagliardi <i>et al.</i> 2018
Nanopartículas de zeína contendo <i>Ocimum gratissimum</i>	140	0.15	+26	70	De Melo <i>et al.</i> 2019
Nanopartículas de zeína contendo <i>Pimenta racemose</i>	130	0.2	+30	55	De Melo <i>et al.</i> 2019
Nanopartículas de zeína contendo Resveratrol	120 a 180	<0.150	+20	77	Nunes <i>et al.</i> 2020
Nanocápsulas de zeína contendo óleo essencial de orégano	162.1 ± 6.6	0.165	+20,9 ± 1,2	79.6 ± 1.9	Rosa <i>et al.</i> 2020
Nanocápsulas de zeína contendo óleo essencial de tomilho	138.2 ± 5.0	0.191	+22,1 ± 0,5	93.2 ± 5.0	Rosa <i>et al.</i> 2020
Nanopartículas de zeína contendo ácido anacárdico	381.6	0.215	-15,9	-	De Araujo <i>et al.</i> , 2021
Nanopartículas de zeína contendo ácido elágico	370.8 ± 6.4	0.232	+37,0 ± 0,1	95.2 ± 0.9	Tavares <i>et al.</i> , 2021

Fonte: O autor (2022).

PDI: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação.

Estudos demonstram o desenvolvimento das atividades biológicas em baixas concentrações, bem como boa biodistribuição das nanopartículas em diferentes órgãos após a administração por meio de várias vias, sendo considerada uma alternativa promissora para estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, a nanoprecipitação tornou-se uma importante estratégia para obtenção de nanopartículas para aplicação na indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e cosmética (PODARALLA, PERUMAL, 2010; Rivas *et al.*, 2017).

Método de pH-driven

O método de pH-driven é uma abordagem de nanoencapsulação que através da alteração do pH de uma solução de proteína em condições básicas ou ácidas extremas promove a mudança conformacional da proteína, e quando ajustada ao pH neutro, ocorre o redobramento das proteínas devido a alteração estrutural dos biopolímeros e suas interações intermoleculares, induzindo a formação das nanopartículas (YILDIZ *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2019). Essa técnica apresenta vantagens como o baixo custo e ausência de solvente orgânico (DAI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Para obtenção de nanopartículas de zeína a partir do método de pH-driven complexadas com glicolipídios ou isolado proteico encapsulando princípios ativos solubiliza-se a zeína, o isolado proteico, e o fármaco em água deionizada sob agitação magnética no pH 12,0, e em seguida, o pH final será reduzido para pH 7,0, promovendo a formação das nanopartículas.

Outra forma de sintetizar esses nanocomplexos, é solubilizar a zeína em água deionizada em pH 12,0, solubilizar os glicolipídios ou isolado proteico em água deionizada sob agitação magnética em pH 2,0. Em seguida, mistura-se as soluções e ajusta-se o pH para 7,0 promovendo a formação das nanopartículas (DAI *et al.*, 2019; WANG, XUE, ZHANG, 2019; WEI *et al.*, 2020; ZHAN *et al.*, 2020). Após a preparação das dispersões por este método, elas podem ser centrifugadas ou filtradas em papel de filtro ou vácuo para remover agregados, sólidos insolúveis e bolhas de ar (DAI *et al.*, 2019; WANG, XUE, ZHANG, 2019; WEI *et al.*, 2020; ZHAN *et al.*, 2020).

As nanopartículas de zeína produzidas a partir do método de pH-driven apresentaram diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação promissores para entrega de bioativos (tabela 3).

Tabela 3 – Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por método pH-driven.

ZNPs	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE%	Referências
Nanopartículas de zeína/ramnolipídio contendo curcumina	103	<0,4	-30	96,2 a 81,8	Dai <i>et al.</i> , 2019
Nanocompósito de zeína/NaCas contendo curcumina	183,1 ± 6,6 a 120,9 ± 8,9	-	-43,0 ± 1,0 a -40,7 ± 0,6	95,5 a 57,1	Wang, Xue, Zhang, 2019
Nanopartículas de WPI-zeína contendo curcumina	92,4 ± 1,6	<0.3	-25	68,13 ± 2,18	Zhan <i>et al.</i> , 2020
Nanopartículas de WPI e zeína	90 a 150 nm	0.200 a 0.300	-25	-	Wei <i>et al.</i> , 2021

Fonte: O autor (2022).

PDI: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação.

Os estudos utilizando a técnica de pH-driven demonstraram estabilidade das nanopartículas quando submetidas as forças iônicas, a temperatura elevada (55 °C) e protegeu do fármaco (curcumina) da degradação durante o armazenamento por 30 dias (DAI *et al.*, 2019). Além disso, foi observado a estabilidade da curcumina sob temperaturas elevadas e armazenamento por longo tempo após a encapsulação (WANG, XUE, ZHANG, 2019). Em outros estudos, as nanopartículas apresentaram estabilidade de armazenado e térmica da curcumina encapsulada frente a temperatura elevada (80 ° C), bem como foi observado o aumento da solubilidade em água (ZHAN *et al.*, 2020). Também foi evidenciado a estabilidade de armazenamento por 28 dias e frente aos estresses ambientais como calor, alteração de pH e força iônica (WEI *et al.*, 2021).

Com os resultados dos estudos, é possível inferir que o método pH-driven permite a fabricação de nanopartícula de modo simples, seguro, direto, não requer aquecimento ou uso de solventes orgânicos e apresenta baixo custo. Nesse sentido, esse método é uma alternativa viável para síntese de nanopartículas à base de zeína para entrega de compostos bioativos (DAI *et al.*, 2019; ZHAN *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2021).

Eletropulverização

A eletropulverização é baseada na separação de um líquido em gotículas carregadas sob a influência de um campo elétrico. Neste método, uma baixa concentração de polímero é necessária para desenvolver um jato e formar gotículas finas. Podem ser utilizados surfactantes na preparação de partículas por eletropulverização para equilibrar as forças intermoleculares e intramoleculares e reduzir a tensão superficial de soluções aquosas para estabilizar o processo (NGUYEN, CLASEN, VAN DEN MOOTER, 2016; DROSOU *et al.*, 2017; COELHO, ESTEVINHO, ROCHA, 2021).

Para síntese de nanopartículas de zeína a partir da técnica de eletropulverização, a solução de zeína com o fármaco é transferida para uma seringa de plástico. Em seguida, é utilizada uma bomba acoplada a seringa com objetivo de regular o fluxo da solução polimérica. Uma tensão de alta voltagem é aplicada, comumente, por meio de uma fonte de alimentação de alta tensão e uma placa de alumínio é utilizada para a coleta das nanopartículas (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019).

As nanopartículas de zeína produzidas a partir da eletropulverização apresentaram diâmetro médio de partícula entre, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação influenciados pelas técnicas utilizadas para obtenção das nanopartículas (tabela 4).

A partir da síntese de nanopartículas de zeína pelo método de eletropulverização, foi observado alterações conformacionais indicando formação de ligações de hidrogênio (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Além das alterações químicas, foi observada a liberação gastrointestinal controlada da quercetina durante 240 min, o aumento da biodisponibilidade e da estabilidade do fármaco no trato gastrointestinal (RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019).

Tabela 4 – Características físico-químicas de nanopartículas de zeína produzidas por a partir da eletropulverização, emulsificação-evaporação do solvente e Automontagem induzida por calor.

ZNPs	Técnica	Tamanho de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	EE%	Referências
Nanopartículas de zeína contendo GA	Eletropulverização	126,5 ± 17,12 a 306,3 ± 11,5	-	-	-	Tapia-Hernández <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de zeína contendo quercetina	Eletropulverização	70,4 ± 14,4 a 100,0 ± 17,9	0,147	-	87,9 ± 1,5 a 9,0 ± 2,6	Rodríguez-Félix, 2019
Nanopartículas de zeína carregadas de β-caroteno	Emulsificação-evaporação	361,90 ± 2,87	-	+34,47 ± 1,27	-	Wei <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas de zeína/PGA contendo β-caroteno	Emulsificação-evaporação	441,37 ± 7,61 a 756,57 ± 37,71	-	- 25,93 ± 3,36	37,10 ± 0,01 a 69,37	
Nanopartículas de zeína Revestido com goma arábica	Automontagem induzida por calor	179,3 ± 8,3	0,22	-33,7 ± 1,5	-	Wang, Zhang, 2019
Nanopartículas de zeína com alginato de sódio	Automontagem induzida por calor	171,4 ± 9,3	0,15	-49,3 ± 3,1	-	

Fonte: O autor (2022).

PDI: índice de polidispersão; EE%: eficiência de encapsulação.

Portanto, a eletropulverização é uma técnica viável para fabricar nanopartículas de zeína carregadas com fármacos, contudo, para obtenção de características físico-químicas desejadas e promissoras é preciso ajustar os parâmetros do equipamento, como tensão, vazão e distância do coletor, e analisar a viscosidade, densidade e alta condutividade elétrica para formação de cone-jato estável, pois estes impactam diretamente na morfologia, tamanho da partícula e no comportamento newtoniano, parâmetros necessários para prever a estabilidade da solução eletropulverizada e obter morfologia desejada (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019).

Com esse método pode-se sobrepor as limitações associadas ao escalonamento, a polidispersão e a eficiência de encapsulação, possibilitando a produção de nanopartículas pequenas, uniformes com alta eficiência de encapsulação (GUTIÉRREZ, 2018; COELHO, ESTEVINHO, ROCHA, 2021; ROSTAMABADI *et al.*, 2021). Assim, esta técnica permite obter nanopartículas biopoliméricas de zeína como matrizes e que fornecem proteção potencial aos fármacos de fatores ambientais (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Emulsificação-evaporação do solvente

Na emulsificação-evaporação do solvente, o polímero é solubilizado em solvente orgânico (fase orgânica), enquanto o estabilizador/surfactante é solubilizado em água (fase aquosa). Os métodos de emulsificação simples (óleo em água) e emulsificação dupla (água em óleo em água) são utilizados para formação de emulsão via homogeneização de alta velocidade, seguida de evaporação do solvente (REIS *et al.*, 2006; DALPIAZ *et al.*, 2016). A evaporação do solvente é alcançada por agitação contínua à temperatura ambiente ou pressão reduzida. Comumente, esta técnica é utilizada para encapsulação de fármacos ou moléculas lipofílicas e exige níveis altos de energia para homogeneização (SURASSMO *et al.*, 2015; MASOOD, 2016).

Essa técnica pode ser aplicada aos polímeros hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos, e o tamanho médio das partículas, bem como a polidispersão dependem da qualidade da emulsão. As emulsões devem ser homogeneizadas em um nível ultrafino a partir do uso surfactantes e/ou sonificadores ou homogeneizadores (MASOOD, 2016; CHAUDHARY *et al.*, 2021).

Para síntese de nanopartículas de zeína por esta técnica, Wei *et al.*, (2018) solubilizaram a zeína em etanol a 70% sob agitação magnética, um co-polímero foi adicionado à solução zeína, assim como, o fármaco foi solubilizado em outro solvente orgânico e adicionado também na solução de zeína. Em seguida, utilizou-se o homogeneizador Ultraturrax para formar emulsões. A emulsão foi submetida ao tratamento por microfluidização e os solventes orgânicos foram evaporados pelo uso de um evaporador rotativo. As dispersões foram centrifugadas e o pH foi ajustado (WEI *et al.*, 2018).

Após a produção das nanopartículas de zeína contendo pigmento natural, β -caroteno, foi observado as características físico-químicas promissoras (tabela 4), a liberação controlada durante a digestão gastrointestinal simulada e a proteção do composto frente a degradação em condições ambientais, incluindo luz e calor. Assim, a utilização do método de emulsificação e evaporação utilizando o microfluidizador torna-se promissor quando comparado ao método tradicional precipitação com antissolvente (WEI *et al.*, 2018).

Automontagem induzida por calor

A automontagem refere-se ao processo pelo qual nanopartículas se organizam espontaneamente em estruturas ordenadas devido a interações específicas diretas e/ou indiretamente, por meio de seu ambiente. Essa automontagem pode ser dirigida pelo auxílio ou modulação de agentes direcionadores, campos externos ou modelos (GRZELCZAK *et al.*, 2010; TANG, 2021).

A automontagem de proteínas acontece pelo equilíbrio entre as interações intermoleculares atrativas e repulsivas, afetadas por uma série de parâmetros, por exemplo, pH, tipo e concentração de sais, solvente, temperatura e concentração de proteína (YUAN *et al.*, 2020; TANG, 2021). A automontagem induzida por calor é um processo combinado de tratamento térmico e precipitação antissolvente para indução da automontagem de nanopartículas a base de proteína (WANG; ZHANG, 2019).

Para produção de nanopartículas de zeína via automontagem induzida por calor, a zeína deve ser solubilizada em etanol, e essa solução deve ser injetada em água ultrapura pré-aquecida a 70 °C usando uma seringa BD equipada com agulha. Quando polissacarídeos são utilizados para revestimento ou complexação com a zeína, a solução de zeína é injetada nas soluções dos polissacarídeos, como por

exemplo a goma arábica e o alginato de sódio. As dispersões resultantes ficam sob agitação magnética a 70 °C para evaporar o etanol. Em seguida, as dispersões são colocadas em banho-maria por 10 min, seguido de reposição com água ultrapura até o volume original (WANG E ZHANG, 2019).

Com a utilização dessa técnica, foi observado as características físico-químicas destas nanopartículas (tabela 4). O tratamento térmico associado a remoção por evaporação do etanol durante a geração de nanopartículas de zeína induziu a redistribuição de resíduos de aminoácidos na superfície da partícula. Além disso, a associação dos polissacarídeos promoveu estabilidade frente a alteração iônica e de pH (WANG E ZHANG, 2019). Assim, a automontagem induzida por calor é considerada uma técnica promissora para produzir nanopartículas de zeína com tamanho de partícula reduzido, morfologia esférica e distribuição mais homogênea, tornando-se um método para aplicações na área de alimentos e produtos farmacêuticos (WANG, ZHANG, 2019; YUAN *et al.*, 2020; TANG, 2021).

A produção de nanopartículas de zeína a partir dos métodos precipitação antissolvente, nanoprecipitação, pH-driven, eletropulverização, emulsificação solvente-evaporação e automontagem induzida por calor possibilitaram a encapsulação e aplicação das nanopartículas para avaliação de diversas atividades biológicas (WEI *et al.*, 2018; TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-FÉLIX, 2019; YUAN *et al.*, 2020; ZHAN *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2021).

APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS ZEÍNA NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de zeína são nanocarreadores promissores para entrega de fármacos devido a possibilidade da encapsulação de princípios ativos hidrofílicos e hidrofóbicos e por apresentar a biodegradabilidade, atoxicidade, gastrorresistência e a mucoadesão como propriedades. Nesse sentido, uma variedade de bioativos com propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e antidiabética foram encapsulados em ZNPs para administração intravenosa, nasal e oral (ZHANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018; RUAN *et al.*, 2018; SOE *et al.*, 2019; GAGLIARDI *et al.*, 2019; INCHAURRAGA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2021; DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021).

Anti-inflamatória

A inflamação é um processo fisiológico essencial integrante da imunidade inata para eliminar e/ou neutralizar os patógenos invasores com objetivo de manter a homeostase. No entanto, o processo inflamatório deve ser controlado, pois a sua ação a longo prazo causa lesões nos tecidos e mutações genéticas contribuindo para o aparecimento e estabelecimento de doenças crônicas, incluindo câncer, esclerose múltipla, aterosclerose, artrite, distúrbios neurodegenerativos, diabetes e doenças cardiovasculares (RUAN *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2020).

Além de contribuir para surgimento de doenças crônicas, uma desregulação no sistema imunológico com respostas imunes anormais e desequilíbrio de mediadores e células inflamatórias pode promover o surgimento de doenças inflamatórias. Nesse sentido, a pesquisa por substâncias com a atividade anti-inflamatória consolida-se e percebe-se que os produtos naturais têm atraído grande atenção (HOTAMISLIGIL *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2020). Os produtos naturais podem apresentar instabilidade do ponto de vista físico-químico, baixa solubilidade em água e toxicidade, e, portanto, podem ser encapsulados em nanopartículas de zeína, como relatado na literatura e exposto na tabela 5.

Além do potencial anti-inflamatório evidenciado na tabela 5, Penalva *et al.* (2015) observaram que a liberação de resveratrol aconteceu independente de pH, houve o aumento em torno de 50% da biodisponibilidade oral e houve redução da hipotermia, piloereção e imobilidade, sintomas endotóxicos, induzidos em camundongos pela administração de LPS. Em outro estudo, Penalva *et al.* (2016) confirmou o aumento da biodisponibilidade oral da quercetina aproximadamente em 60%, com sintomas endotóxicos menos graves e redução da gravidade do choque endotóxico induzido por LPS quando comparados com a com solução oral.

Ruan *et al.* (2018) comprovaram a estabilidade ao armazenamento, o aumento de 3,6 e 2,1 vezes na biodisponibilidade e maior supressão de superprodução de citocinas pró-inflamatórias do ácido elágico (EA) encapsulado em comparação com a suspensão de EA. Enquanto, Liu *et al.* (2020) verificaram que a captação celular em células Caco-2 e o nível plasmático do resveratrol encapsulado apresentou aumento quatro vezes maior em comparação com o resveratrol livre, aumentando a biodisponibilidade e a manutenção no plasma. Também foi observado alta atividade anti-inflamatória com liberação de IL-10, inibição da expressão de TLR4 e da fosforilação de JNK, ERK1 / 2 e p38 MAPK.

Tabela 5 – Método de preparação e potencial anti-inflamatório de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.

Nanopartícula	Método	Redução de citocina inflamatória (%)	Referências
Nanopartículas de zeína carregadas com resveratrol	Desolvatação	TNF- α ($\approx$ 50)	Penalva <i>et al.</i> , 2015
Nanopartícula de zeína contendo 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina e quercetina	Desolvatação	TNF- α ($\approx$ 25)	Penalva <i>et al.</i> , 2016
Nanopartículas de zeína contendo ácido elágico	Precipitação anti-solvente	TNF- α ($\approx$ 66,6 e $\approx$ 83,4) IL-1 β ($\approx$ 50 both)	Ruan <i>et al.</i> , 2018
		NO ($\approx$ 80)	
		PEG2 ($\approx$ 80)	
		IL-6 ($\approx$ 70)	
Nanopartículas de zeína-pectina contendo resveratrol	Nanoprecipitação	IL-1 β ($\approx$ 20)	Liu <i>et al.</i> , 2020
		TNF- α ($\approx$ 30)	
		IL-10 ($\approx$ 20)	

Fonte: O autor (2022).

TNF- α : Fator de necrose tumoral; IL-1 β : Interleucina 1 beta; NO: Óxido Nitríco; PEG2: Prostaglandina E2; IL-6; Interleucina 6; IL-10 Interleucina 10.

A encapsulação de moléculas com potencial anti-inflamatório em nanopartículas de zeína promove melhora na administração oral, alta eficiência de encapsulação, boa estabilidade ao armazenamento, aumento da biodisponibilidade e da atividade anti-inflamatória. Estudos devem ser realizados para utilização dessas formulações de base nanotecnológica no tratamento anti-inflamatório, na proteção contra toxemia e na prevenção da sepse (PEÑALVA *et al.*, 2015; PEÑALVA *et al.*, 2016; RUAN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020).

Antioxidante

Compostos antioxidantes apresentam a capacidade de proteger o sistema biológico dos efeitos nocivos de processos ou reações envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses compostos reduzem o estresse oxidativo relacionados a doenças humanas, incluído aterosclerose, diabetes mellitus, inflamação crônica, doenças neurodegenerativas e certos tipos de câncer, possibilitando a prevenção dessas patologias (KARADAG, OZCELIK, SANER, 2009; DONTA, 2016; CHANDRA, SHARMA, ARORA, 2020).

As moléculas antioxidantes podem apresentar instabilidade físico-química e podem ser degradadas em condições extremas, nesse sentido, torna-se uma estratégia relevante a encapsulação em nanocarreadores (BILENLER *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2018; PAULUK *et al.*, 2019; MENG *et al.*, 2021). Estudos foram realizados encapsulando óleos vegetais e moléculas com potencial antioxidante em nanopartículas de zeína (tabela 6).

O potencial antioxidante das formulações de base nanotecnológica utilizando o polímero de zeína foi evidenciado na tabela 6, contudo, foram observadas outras vantagens com a encapsulação dos compostos antioxidantes pelos autores anteriormente citados. Ma *et al.* (2018) demonstraram a estabilidade e manutenção da atividade antioxidante das ZCPs-Q na faixa de temperatura de 20-100 °C e após irradiação UV por 10 h, bem como, as ZCPs-Q apresentaram potencial protetor frente ação do AAPH induzido pela hemólise de eritrócitos em baixa concentração.

Zou *et al.* (2021) produziram nanopartículas de zeína contendo quercetina e foi observado a estabilidade frente aos fluidos simulados do TGI, bioacessibilidade e atividade antioxidante. A dispersão apresentou resistência à agregação quando submetida a mudanças de pH (pH 2,0 a 8,0), ao aquecimento (90 °C por 120 min) e a adição de CaCl₂ (10 mM) e de NaCl (2,0 M). Foi observada maior potencial antioxidante *in vitro* e redução espécies reativas de oxigênio intracelular produzidas pela linhagem celular HepG2 da quercetina encapsulada quando comparada a quercetina livre.

Tabela 6 – Método de preparação e potencial antioxidante de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.

ZNPS	MÉTODO	REDUÇÃO DE DPPH (%)	REDUÇÃO DE ABTS (%)	REFERÊNCIAS
Nanopartículas de zeína	Dispersão líquido-líquido	50	-	Bilenler <i>et al.</i> , 2015.
Nanopartículas de zeína carregadas de óleo essencial de tomilho	Dispersão líquido-líquido	90	-	
Nanopartículas de caseinato de zeína-sódio	Precipitação antissolvente	22,3	24,3	Zhang, Han, 2018.
Nanopartículas de zeína e caseinato de sódio contendo rutina	Precipitação antissolvente	52,7	71,2	
Nanopartículas de zeína contendo galato de epigallocatequina (EGCG NS)	Antissolvente	20 - 55	-	Dahiya <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas de zeína contendo galato de epigallocatequina e piperina (EGCG-Pip NC)	Antissolvente	25 – 70	-	
Nanopartículas de zeína/quitosana	Antissolvente	40	38	Ma <i>et al.</i> , 2018.
Nanopartículas de zeína/quitosana carregadas de quercetina	Antissolvente	90	85	
Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana		-	17.9	Pauluk <i>et al.</i> , 2019.

Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana carregadas de resveratrol	Dispersão líquido-líquido	-	75.0	Meng <i>et al.</i> , 2021.
Nanopartículas de zeína carregadas de curcumina	Precipitação antissolvente	55	48	
Nanopartículas de zeína/carboximetil dextrina carregadas de curcumina	Precipitação antissolvente	68,25,	73.3	
Nanopartículas de zeína	Nanoprecipitação	42	24	Tavares <i>et al.</i> 2021.
Nanopartículas de zeína contendo ácido elágico	Nanoprecipitação	90	52	
Nanopartículas de Zeína/SHA	Coprecipitação antissolvente	-	16,4	Shi <i>et al.</i> , 2021.
Nanopartículas de zeína/SHA carregadas de resveratrol	Co-precipitação antissolvente	-	82,95	

Fonte: O autor (2022).

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.; ABTS: sal de diamônio de 2,2-azino-bis(ácido etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

Os estudos desenvolvidos por Huang *et al.* (2019) objetivaram a fabricação de nanopartículas de zeína contendo resveratrol para avaliação da estabilidade e do potencial antioxidante. Nesse sentido, os autores demonstram a estabilidade frente a mudanças de faixa de pH entre 2 e 7 pela exposição ao TGI simulado e ao processamento térmico 80 °C por 1 h, e foi observado a capacidade de eliminação do radical ABTS⁺, espécies reativas de oxigênio intracelular e a redução do íon férrico dos fluidos de digestão.

Enquanto Zhang *et al.* (2019) também avaliaram a atividade antioxidante de nanopartículas de zeína contendo resveratrol e α -tocoferol que reduziram o DPPH. As nanopartículas foram produzidas por pelo método de dessolvatação e apresentaram estabilidade de armazenamento por 84 dias a 45 °C e em condições dos fluidos digestivos simulados, permitiram que os princípios ativos encapsulados permanecem estáveis e demonstraram a possibilidade de desenvolvimento um sistema de entrega para a co-encapsulação de nutrientes com diferentes solubilidades.

Pauluk *et al.* (2019) desenvolveram ZNPs revestidas com quitosana contendo resveratrol e evidenciaram a atividade antioxidante com redução de radicais ABTS das formulações potencializada devido ao efeito aditivo de resveratrol e dos aminoácidos presentes na estrutura da zeína. Foi observado a liberação bifásica e prolongada, a adsorção da mucina na superfície das nanopartículas e a estabilidade do resveratrol em fluidos gastrointestinais simulados foi melhorada pelo revestimento com quitosana. Shi *et al.* (2021) analisaram o potencial antioxidante através da eliminação de radicais livres ABTS de zein-SHA contendo resveratrol e confirmaram que as ZNPs vazias exibiram propriedade antioxidante, quando comparado as zein-SHA contendo resveratrol que exibiu atividade 4,5 vezes maior que zein-SHA e maior que o fármaco livre. As nanopartículas apresentaram tamanho pequeno, distribuição uniforme e estabilidade em soluções aquosas, aumentando a dispersibilidade em água, atividade antioxidante e atividade anticâncer de resveratrol.

Com os resultados desses estudos, pode-se concluir que, em geral, os nanocarreadores a base de zeína são eficazes para encapsulação de moléculas hidrofóbicas e também que os antioxidantes, como resveratrol, α -tocoferol e quercetina encapsulados em nanopartículas de zeína tem alta eficiência de encapsulação, boa retenção e distribuição dessas moléculas, sua ação potencializada, estão protegidos da degradação no sistema digestório e, portanto, podem ser utilizados pela via oral, podendo ser usados em alimentos funcionais,

suplementos nutracêuticos e dietéticos, e em formulações/produtos farmacêuticos (MA *et al.*, 2018; PAULUK *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2021).

Bilenler *et al.* (2015) observaram que a atividade antioxidante das nanopartículas de zeína vazias e contendo o óleo essencial de tomilho através da redução do DPPH ocorre de maneira dependente da dose e de todas as concentrações testadas. Um detalhe fundamental desse estudo é que o tempo de interação entre as amostras e os radicais DPPH foi estendido com a encapsulação, permitindo o aumento da atividade biológica do composto encapsulado. Zhang, Han (2018) demonstraram que as ZNPs vazias e contendo a rutina tinham morfologia esférica e que as ZNPs reduziram DPPH, ABTS e a capacidade antioxidante total, assim como as ZNPs contendo a rutina, contudo, a presença da rutina encapsulada aumentou duas vezes a redução de DPPH, a capacidade antioxidante total e três vezes a redução de ABTS devido a potencialização da atividade antioxidante.

Dahiya *et al.* (2018) evidenciaram maior potencial de eliminação de radicais do EGCG e Piperina encapsuladas quando comparadas as formas livres. Nas EGCG-Pip NC foi observada maior atividade devido ao efeito antioxidante sinérgico de EGCG e Piperina. Além do perfil antioxidante *in vitro*, foi demonstrada a liberação controlada da droga, baixa atividade hemolítica *in vitro* e aumento da atividade anticâncer *in vitro*, tornando essa dispersão como forte candidato para entrega de drogas e para pesquisas pré-clínicas e clínicas.

Meng *et al.* (2021) produziram as nanopartículas de zeína e de zeína/carboximetil dextrina contendo curcumina para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* pela eliminação de DPPH. Os resultados mostram que as ZNPs contendo a curcumina demonstraram potencial antioxidante 2 vezes maior, as nanopartículas de zeína / CMD-Cur três vezes maior quando comparados com a curcumina livre. A presença do CMD nas nanopartículas esféricas melhorou a estabilidade fotoquímica, a térmica, a liberação retardada de Cur em fluidos gastrointestinais simulados e a atividade antioxidante de Cur. DE SOUZA TAVARES *et al.* (2021) encapsularam o EA em nanopartículas de zeína e evidenciaram que a molécula livre e encapsulada inibiu 90% após 24h de exposição, contudo, o AE apresentou imediata atividade antioxidante e o NE, uma atividade antioxidante sustentada. As nanopartículas de zeína em branco exibiram 42% de inibição após 24 h, confirmando a capacidade da zeína em combater os radicais livres. Essas nanopartículas apresentaram-se

esféricas, não agregadas e carregadas positivamente, e foi observado a interação entre EA e zeína, de modo a potencializar a atividade antioxidante, os grupos fenólicos ativos desta molécula tendem a se tornar mais acessíveis após o aprisionamento de EA nas nanopartículas de zeína.

Os estudos encapsulando óleo essencial de tomilho, rutina, EGCG, Piperina, EA e curcumina em nanopartículas a base de zeína preservaram ou aumentaram o potencial antioxidante destas moléculas no período de 24h e 48h podendo ser utilizados de entrega de compostos bioativos para reparação de pele, tratamentos tópicos, tratamento de doenças e em alimentos funcionais (BILENLER *et al.*, 2015; ZHANG, HAN, 2018; DAHIYA *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2021).

Antibacteriano e antibiofilme

As bactérias estão envolvidas em infecções do trato urinário, digestório, pneumonia, sistema nervoso central, bacteremia, septicemias e infecções nas unidades de terapia intensiva. Essas infecções podem estar associadas a resistência bacteriana e a produção de biofilme, e sabe-se que elas causam altos índices de morbimortalidade impactando negativamente a economia e a saúde pública mundial (MACVANE, 2016; BASSETTI *et al.*, 2019; KOFTERIDIS *et al.*, 2020). A encapsulação de agentes antimicrobianos em nanopartículas é uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento antibacteriano (CHENG *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2021).

Nesse sentido, estudos foram desenvolvidos com produção de nanopartículas de zeína objetivando avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme de cepas bacterianas, incluindo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (tabela 7 e 8) (LI *et al.*, 2013; DA ROSA *et al.*, 2015; MERINO *et al.*, 2019; CHENG *et al.*, 2020; BIDYARANI *et al.*, 2020; GONG *et al.*, 2021; DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021; ARAUJO *et al.*, 2021).

Nos estudos encontrados nas tabelas 7 e 8, como o de Da Rosa *et al.* (2015) que encapsularam o timol e o carvacrol em nanopartículas de zeína. Os autores comprovaram a estabilidade de armazenamento durante 90 dias a 6°C e liberação controlada. O timol e o carvacrol livre apresentaram menor atividade antimicrobiana frente bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas quando comparados às T-loaded NPT e C-loaded NPT.

Tabela 7 – Método de preparação e potencial antibacteriano de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.

ZNPs	MÉTODO	CEPAS	CIM (µg/ml)	CBM (µg/ml)	HALO (mm)	REFERENCES
Nanopartículas de zeína carregadas com timol	Precipitação antissolvente	<i>E. coli</i> <i>S. ntérica</i> <i>S. aureus</i>	-	-	8,60 ± 070 8,25 ± 0,38 7,55 ± 0,28	Li <i>et al.</i> , 2013
Nanopartículas de zeína carregadas de timol (NPT-T) e carvacrol (NPT-C)	Nanoprecipitação	<i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>S. enterica</i> <i>S. aureus</i>	-	-	5-8 1 1 5-8	Da Rosa <i>et al.</i> , 2015
Nanopartículas de zeína de óleo essencial de <i>Thymbra capitata</i> (TCEO)	Automontagem por calor	<i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	41,7 72,3	-	-	Merino <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de zeína-pectina contendo resveratrol (R/ZP) em emulsões de óleo de hortelã-pimenta (PO)	Desolvatação	<i>S. aureus</i> <i>S. typhimurium</i>	2 (Res) e 625 (PO) 2,5 (Res) e 625 (PO)	-	-	Cheng <i>et al.</i> , 2020

Nanopartículas de zeína/ ramnolipídio carregadas com carvacrol (CRZRL)	Precipitação antissolvente	<i>P. syringae</i>	135	-	-	Bidyarani et al., 2020
Nanopartículas de zeína cotendo ácido anacárdico (ZA)	Nanoprecipitação	<i>Streptococcus mutans UA159</i>	0,36	0,36		Lima et al., 2020
Nanopartículas de zeína desamidadas carregadas com timol (DZTNPs)	Precipitação antissolvente	<i>E.coli</i> <i>S. aureus</i>	-	-	11,13 10,23	Gong et al., 2021
Nanopartículas de zeína carregadas com ácido elágico (NE)	Nanoprecipitação	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	72 36	144 72		Tavares et al., 2021
Nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico (ZA)	Nanoprecipitação	<i>S. aureus</i> <i>P.aeruginosa</i>	0,05 3,12	0,20 -		Araujo et al., 2021

Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.

Tabela 8 – Método de preparação e potencial antibiofilme de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.

ZNPs	MÉTODO	CEPAS	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME (%)	ERRADICAÇÃO DO BIOFILME FORMADO (%)	REFERENCES
Nanopartículas de zeína contendo ácido anacárdico	Nanoprecipitação	<i>S. mutans</i>	99,9%	-	Lima <i>et al.</i> , 2020
Nanopartículas de zeína contendo ácido elágico	Nanoprecipitação	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	-	60% 30%	Tavares <i>et al.</i> , 2021
Nanopartículas de zeína contendo ácido anacárdico	Nanoprecipitação	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	-	60 (CIM) e 75 (2xCIM) 30 (CIM) e 50 (2xCIM)	Araujo <i>et al.</i> , 2021

Fonte: O autor (2022).

CIM: concentração inibitória mínima.

Outros estudos encapsularam terpenos, como Li *et al.* (2013) que produziram nanopartículas de zeína contendo o timol, os autores verificaram que as nanopartículas têm formato esférico, possuem redispersibilidade em água deionizada após liofilização, são estáveis ao longo de 8 meses de armazenamento, apresentam perfil de liberação controlada e a atividade antimicrobiana apresentou-se de maneira dependente da dose. Já Gong *et al.* (2021) prepararam as DZT-NPs e foi observado uma morfologia quase esférica, com distribuição homogênea, alta eficiência de encapsulação do thymol e estabilidade de redispersibilidade e de armazenamento das DZT-NPs. A encapsulação do thymol melhorou a atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* e permitiu uma atividade antibacteriana de longa ação.

Com esses estudos, observa-se que a encapsulação de thymol e carvacrol melhora as propriedades funcionais de compostos ativos hidrofóbicos, protegendo e aumentando a solubilidade em água. Essas formulações podem ser aplicadas no controle de doenças de origem alimentar, em material de embalagem de alimentos, e em produtos cosméticos e farmacêuticos (LI *et al.*, 2013; DA ROSA *et al.*, 2015; BIDYARANI *et al.*, 2020; GONG *et al.*, 2021).

Merino *et al.* (2019) desenvolveram nanopartículas de zeína carregadas com óleo essencial (EO) de *Tymbra capitata* (TCEO) e foi observado atividade antibacteriana sete vezes maior para *L. monocytogenes* e em torno de quatro vezes para *E. coli* de TCEO quando comparado ao EO não encapsulado. Cheng *et al.* (2020) estabilizaram as emulsões de óleo de hortelã-pimenta em nanopartículas de zeína-pectina contendo resveratrol. Foi observado que houve uma melhor estabilidade química e o efeito antibacteriano foi potencializado quando testado o resveratrol nanopartículas de zeína-pectina carregadas em emulsões de óleo de hortelã-pimenta com MIC para Res 12 vezes e 7,5 vezes menor frente a *S. aureus* e *S. typhimurium*, respectivamente.

Lima *et al.* (2020) e Araujo *et al.* (2021) desenvolveram nanopartículas de zeína contendo ácido anacárdico e avaliaram a atividade antibacteriana e antibiofilme em cepas bacterianas. Lima *et al.* (2020) confirmaram a atividade antibacteriana frente as cepas de *S. mutans* com valores de MIC e MBC menor que 1 e atividade inibitória de longa duração contra a formação de biofilme em um modelo de biofilme após os tratamentos. Os autores indicam que essa formulação apresenta forte atividade bactericida e o potencial efeito antiplaca frente a *S. mutans*. Enquanto, Araujo *et al.* (2021) demonstraram que nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico

(ZA)apresentam estabilidade de armazenamento por 90 dias, um potencial antibacteriano frente *P. aeruginosa* e duas vezes maior frente *S. aureus*, diferentemente do AA não encapsulado. Quanto ao potencial antibiofilme, foi observado que frente a *P. aeruginosa*, ZA foram igualmente eficazes ao AA em solução, diferente resultado foi encontrado para *S. aureus*, pois ZA reduziu mais efetivamente a viabilidade celular em biofilmes do que AA não encapsulado.

De Souza Tavares *et al.* (2021) encapsularam o ácido elágico (EA) em nanopartículas de zeína e obtiveram nanopartículas esféricas, de superfície lisa mantendo o potencial antibacteriano contra *S. aureus* e potencializando a atividade contra *P. aeruginosa* quando comprado com o EA não encapsulado. Os resultados dos estudos acima, demonstram a potencialização da atividade antibacteriana e antibiofilme após a encapsulação em nanopartículas de zeína em concentrações baixas, além de fornecer a possibilidade de co-encapsular agentes antimicrobianos com diferentes propriedades físico-químicas e de realização de ensaios antibiofilme em multiespécies. Além disso, as nanopartículas zeína são obtidas através de métodos simples e fácil, possibilitando a encapsulação de agentes antimicrobianos e muitas aplicações, incluindo agente antiplaca para uso odontológico, em cobertura de alimentos e para prevenir e tratar infecções bacterianas por cepas Gram-positivas e Gram-negativas e produtoras de biofilme (WU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018; MERINO *et al.*, 2019; CHENG *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2021; DE SOUZA TAVARES *et al.*, 2021).

Anticâncer

O câncer é causado pelo crescimento descontrolado de células anormais e alteração dinâmica no genoma e a segunda causa de mortalidade em todo o mundo, constituindo-se como um dos problemas globais de saúde. Embora exista muitos medicamentos que podem ser usados no tratamento, o desafio é eliminar seletivamente todas as células cancerosas com redução da toxicidade colateral para as células saudáveis (TRAN *et al.*, 2017; HASSANPOUR, DEGHANI, 2017; MANSOORI *et al.*, 2017).

A encapsulação de agentes anticâncer em nanopartículas é uma estratégia terapêutica, pois apresentam maior potencial para entrega direcionada nas células tumorais. A entrega direcionada é mediada por vários mecanismos que exploram as características inerentes dos tumores, por exemplo, grandes lacunas entre as células

endoteliais, microambiente ácido, efeito hipertérmico, superexpressão de receptores no tecido tumoral e marcadores nas superfícies das células cancerosas (HUANG *et al.*, 2016; GAGLIARDI *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2020).

Alguns estudos foram realizados com objetivo de desenvolver nanopartículas de zeína contendo moléculas promissoras para avaliar o potencial anticâncer em linhagens celulares, incluindo linhagens celulares SW480, Bel-740, MCF-7, HL60, SCC40, HeLa, Colo 205, KBs, A549, K562 e HEK293 (tabela 9) (HUANG *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2018; DAHIYA *et al.*, 2018; SOE *et al.*, 2019; GAGLIARDI *et al.*, 2019; KAUSHIK *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2020).

Os estudos citados na tabela 9 avaliaram o potencial anticâncer de moléculas encapsuladas em nanopartículas de zeína e evidenciaram algumas características das nanopartículas.

Huang *et al.* (2016) demonstraram que as nanopartículas contendo resveratrol apresentaram formato esférico, boa redispersibilidade em soluções aquosas e atividade antiproliferativa maior quando testado com células humanas de hepatocarcinoma Bel-7402 do que o resveratrol livre. Jain *et al.* (2018) demonstraram que com a encapsulação do β -caroteno (bC) houve o aprimoramento da biodisponibilidade oral uma vez que houve uma melhora nas propriedades biofarmacêuticas e na absorção celular, da toxicidade hepática e renal, e a da citotoxicidade frente as células tumorais, especialmente quando associado ao MTX com a potencialização em torno de 20 vezes da atividade antiproliferativa *in vitro* quando comparado ao bC livre. Dahiya *et al.* (2018) demonstram que após a encapsulação do EGCG houve aumento significativo da atividade anticâncer. Foi observado uma atividade anticâncer de EGCG-pip NC em torno de duas vezes maior frente a HL60 cells, em torno de quatro vezes maior frente a MCF-7 cells, em torno de uma vez maior frente a HeLa cells e em torno de duas maior frente a Colo 205 cells quando comparado ao EGCG livre.

Tabela 9 – Método de preparação e potencial anticâncer de nanopartículas de zeína encapsulando bioativos.

Nanopartículas	Método	Linhagem Celular	IC ₅₀ (µg/mL)	Referências
Nanopartículas de zeína revestidas contendo resveratrol	Precipitação antissolvente	Bel-740	17,61	Huang <i>et al.</i> , 2016
Nanopartículas de zeína carregadas com beta-caroteno (BC-NPs)	Técnica de separação de fases	MCF-7	89,13 ± 5,6 (48h) 75.81 ± 4.5 (72h)	Jain <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas de zeína de galato de epigallocatequina e piperina (EGCG-Pip NC)	Precipitação antissolvente	HL60 SCC40 MCF-7 HeLa Colo 205	≈ 20 ≈ 20 ≈ 20 ≈ 80 ≈ 80	Dahiya <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas de zeína funcionalizadas com folato contendo paclitaxel (PTX/Zein-FA)	Evaporação do solvente	KB A549	0,04 0,38	Soe <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de zeína carregadas com paclitaxel (PTX-ZNP)	Nanoprecipitação	MCF-7 K562	24h = 1 uM 48h = 0,49 72h = 0,05 24h = >1 48h = >1 72h = 0,19	Gagliardi <i>et al.</i> , 2019

Nanopartícula de zeína/pectina carregada de doxorrubucina em hidrogéis	Dispersão líquido-líquido	HeLa HEK293	5 uL	Kaushik <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de zeína carregadas de luteolina (LNPL)	Precipitação antissolvente	SW480	25 (24h e 48h)	Shinde <i>et al.</i> , 2019
Nanopartículas de zeína carregadas com carvacrol (LNPC)	Precipitação antissolvente	SW480	60 (24h)	Shinde <i>et al.</i> , 2020

Fonte: O autor (2022).

SW480: células cancerígenas do cólon; Bel-740: células de hepatocarcinoma humano; Células MCF-7: células de adenocarcinoma de mama humano; células HL60: células cancerosas de leucemia humana; Células SCC40: células cancerígenas orais humanas; Células HeLa: células cancerígenas do colo do útero; Células Colo 205: células cancerígenas do cólon humano; Células KB: carcinoma epidermóide oral humano; células A549: células epiteliais de carcinoma do pulmão humano; células K562: células de leucemia mielóide crônica humana; Células HEK293: rim embrionário humano.

Estudos recentes, incluindo o de Soe *et al.* (2019) e de Gagliardi *et al.* (2019) encapsularam o paclitaxel (PTX) em nanopartículas de zeína. Gagliardi *et al.* (2019) demonstraram que os nanocarreadores contendo PTX tem estabilidade de armazenamento, térmica à 50 °C, alterações de pH, processo de liofilização ou proteínas séricas e foi observado o aumento da toxicidade de 11 vezes frente a MCF-7 cells e de 3,7 frente K562 no período de 72h do PXT encapsulado quando comparado à droga livre. Enquanto Soe *et al.* (2019) desenvolveram uma nanopartícula de zeína com a superfície funcionalizada com PEG 2000 e folato apresentando como resultados o aumento da atividade anticâncer e a alta absorção celular do fármaco, indução de apoptose e inibição da migração celular em células KB que expressam o receptor de folato em comparação com células A549 deficientes em receptor de folato, de acordo com os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Kaushik *et al.* (2019) desenvolveram ZNPs contendo doxorrubicina (dox) veiculadas em hidrogéis e essas nanopartículas apresentaram formato esférico e exibiram citotoxicidade superior em relação às linhagens de HEK293 cells, especialmente em HeLa cells, onde induziu a apoptose intracelular-antioxidativa, geração de ROS e alterações na morfologia celular. Foi observado que a veiculação dessas nanopartículas em hidrogéis de pH específico permitiram a liberação controlada do fármaco no núcleo da célula devido ao ambiente ácido citosólico. Shinde *et al.* (2019) fabricaram as nanopartículas com formato esférico, potencial zeta negativo, alta eficiência de encapsulação (92%) e liberação controlada da luteolina no pH intestinal. As nanopartículas de zeína carregadas com luteolina facilitaram a captação celular e demonstraram citotoxicidade aumentada contra SW480 cells pela indução de induzem apoptose quando comparada a luteolina livre. Enquanto Shinde *et al.* (2020) evidenciaram a morfologia esférica, alta eficiência de encapsulamento, liberação controlada ideal no pH intestinal, aumento da absorção celular e da citotoxicidade em torno de quatro vezes em SW480 cells do carvacrol encapsulado em comparação com o livre.

A encapsulação de compostos, moléculas e fármacos com potencial anticâncer em nanopartículas de zeína é promissor para aplicação de produtos farmacêuticos para tratamento do câncer pela via oral. Os estudos acima demonstram o potencial na entrega dos fármacos no local alvo, especialmente se as nanopartículas apresentarem funcionalização na superfície ou quando estão veiculadas em hidrogéis pH responsivos facilitando a internalizados celular. Torna-se evidente a versatilidade de

encapsulação desses nanocarreadores e do potencial para realização de pesquisas pré-clínicas e clínicas com essas nanopartículas para garantir um tratamento quimioterápico promissor e eficaz (HUANG *et al.*, 2016; JAIN *et al.*, 2018; DAHIYA *et al.*, 2018; SOE *et al.*, 2019; GAGLIARDI *et al.*, 2019; KAUSHIK *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2020).

Antidiabética

O Diabetes Mellitus (DM) é o distúrbio metabólico mais comum no mundo caracterizado pela presença de hiperglicemia crônica acompanhada de alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Esse distúrbio impacta a qualidade de vida, a longevidade dos portadores e a economia mundial, e pode se apresentar como tipo 1, causado por secreção insuficiente de insulina pelo pâncreas, e tipo 2, devido a redução da resposta insulínica das células. Entretanto, independentemente do tipo, a DM é causa de inúmeras complicações a longo prazo e a gravidade dessas complicações estão diretamente relacionadas ao grau e à duração da hiperglicemia (TAHRANI, BARNETT, BAILEY, 2016; MAURI-OBRA DORS *et al.*, 2017; JANEŽ *et al.*, 2020).

O tratamento da DM está relacionado ao uso de insulina (DM1) e/ou de fármacos (DM2), contudo, comumente essas moléculas são administradas por injeção subcutânea devido a sensibilidade a às enzimas digestivas, baixa taxa de difusão através da barreira de muco, baixa permeabilidade através do epitélio intestinal (fármacos hidrofílicos) ou a lenta dissolução em meio fisiológico limitante da velocidade de sua absorção (fármacos hidrofóbicos) (LUCIO *et al.*, 2017; BAO, QIAN, YAO, 2020; INCHAURRAGA *et al.*, 2020). Nesse sentido, a encapsulação desses bioativos em nanopartículas de zeína apresenta-se como uma estratégia para entrega oral (JI *et al.*, 2018; JI *et al.*, 2019; BAO, QIAN, YAO, 2021).

Estudos recentes realizaram a avaliação da atividade antidiabética de nanopartículas de zeína encapsulando fármacos, incluindo a pesquisa Lucio *et al.* (2017) que avaliaram o potencial antidiabético de nanopartículas de zeína contendo glibenclamida (GB) para uso oral. Os autores produziram as nanopartículas pelo método de dessolvatação na presença de lisina como estabilizador. As nanopartículas apresentaram propriedades físico-químicas ideais e boa estabilidade, com estrutura interna baseada na repetição de unidades esféricas de proteínas formando estruturas semelhantes a fractais e liberação controlada de GB. Além disso, elas induziram um

efeito hipoglicemiante com redução de cerca de 15% no teor de gordura do *Caenorhabditis elegans* sem alterar a expectativa de vida dos vermes. Bao, Qian e Yao (2020) desenvolveram as nanopartículas de zeína híbrida contendo EXE/PC/CA Complex, HP e caseína (COM NPs) e nanopartículas de zeína híbrida contendo EXE, PC, CA, HP e caseína (DIS NPs) usando o método de precipitação com antissolvente e a caseína como estabilizador. As nanopartículas apresentaram estabilidade de liofilização, armazenamento e redispersão com alta eficiência de encapsulação de exenatida. Foi observado a melhora da biodisponibilidade, redução na concentração de HbA1c (6,8%) no período de sete semanas de administração oral e o aumento da secreção de insulina em mais de 60%, além da proliferação de células β pancreáticas. Já Inchaurraga *et al.* (2020) avaliaram as nanopartículas de zeína revestidas com um conjugado de polímero de Gantrez® AN e tiamina contendo insulina. As nanopartículas apresentaram-se estáveis e liberaram o fármaco, principalmente, em condições intestinais simuladas. Após o tratamento, foi observado o aumento da biodisponibilidade, da absorção intestinal e a redução da glicemia em ratos diabéticos (em torno de 60%) após a administração oral.

Martinez-Lopez *et al.* (2021a) avaliaram o potencial de nanopartículas de zeína com um conjugado de PEG-Gantrez AN para a administração oral de insulina (PPA-NPs). Os autores observaram um aumento 20 vezes maior da difusividade das PPA-NPs, evidenciando a capacidade de atravessar a barreira de muco, facilitando sua chegada ao epitélio intestinal. As PPA-NPs induziram uma redução significativa na formação de ROS e na gordura acumulada no corpo em modelo de *C. elegans*, resultando numa vida útil mais longa do que aqueles tratados com insulina livre. Enquanto, Martinez-Lopez *et al.* (2021b) também avaliaram as nanopartículas de zeína (ZNP) com um conjugado Gantrez® AN-PEG para a liberação oral de insulina (I-ZNP-GP) em modelo animal de *C. elegans*. As nanopartículas apresentaram-se com formato esférico, estáveis e tiveram o perfil de liberação menor condições gástricas simuladas e maior em condições intestinais simuladas. Foi comprovada que as I-ZNP-GP promoveram redução do acúmulo de glicose e gordura no corpo sem alterar outras propriedades fisiológicas, incluindo comprimento do verme, taxa de crescimento e taxa de bombeamento, sendo esses efeitos maiores com a insulina nanoencapsulada em ZNP-GP em comparação ou formulada em solução.

As nanopartículas de zeína apresentam-se como sistema de liberação controlada multifuncionais para administração oral de fármacos, incluindo a

glibenclamida, exenatida, insulina e outras proteínas terapêuticas, com capacidade de permear muco e facilitar a absorção dos fármacos. Assim, essas formulações mostram-se como uma estratégia simples e eficaz para o desenvolvimento de novas formulações orais desse antidiabéticas (LUCIO *et al.*, 2017; BAO, QIAN, YAO, 2020; INCHAURRAGA *et al.*, 2020; MARTINEZ-LOPEZ *et al.*, 2021a; MARTINEZ-LOPEZ *et al.* 2021b).

Conclusões e perspectivas

A zeína é uma proteína com características físico-químicas que favorecem a formação de nanocarreadores e a aplicação na indústria têxtil, alimentar e farmacêutica. Por ser um excipiente seguro, abundante na natureza, de fácil obtenção, de baixo custo e de digestibilidade mais lenta, as nanopartículas produzidas a partir do polímero de zeína são promissoras para uso via intravenosa, nasal e oral.

As nanopartículas de zeína podem ser fabricadas pela precipitação antissolvente, um método simples, de baixo risco de contaminação e de baixo custo, e pela nanoprecipitação, técnica simples, econômica, de fácil reprodutibilidade que facilita o controle para obtenção de características físico-químicas desejadas para estudos pré-clínicos e clínicos. Esses dois métodos são escalonáveis, utilizados na indústria e podem ser aplicados na encapsulação de uma variedade de bioativos. O método de pH-driven e de eletropulverização são outras formas de obtenção dessas nanopartículas para entrega de compostos bioativos. O primeiro é uma técnica simples, direta, verde, de baixo custo, sem necessidade de utilizar altas temperaturas e solventes orgânicos, e a segunda, é um método que permite a síntese de nanopartículas monodispersas, com alta eficiência de encapsulação, pequenas e de fácil escalonamento. A técnica de emulsificação-evaporação de solvente, é um método aplicado aos polímeros hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos e exige níveis altos de energia para homogeneização, e a técnica de automontagem por calor, é uma técnica que produz tamanho de partícula reduzido, morfologia esférica e distribuição homogênea. Todas as técnicas apresentam suas vantagens e produzem nanopartículas de zeína que podem ser utilizados na áreas agrícola, cosmética, de alimentos e produtos farmacêuticos com a aplicação para diversas atividades biológicas.

Os diferentes métodos de produção de nanopartículas oferecem a possibilidade de encapsulação de bioativos com diferentes características químicas e

propriedades biológicas. Nesse sentido, moléculas, fármacos e bioativos com potencial anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, antibiofilme, anticâncer e antidiabético foram encapsulados em nanopartículas de zeína. A encapsulação dessas moléculas potencializou a atividade biológica, permitiu a alta eficiência de encapsulação, a liberação controlada, protegeu da degradação das enzimas e fluidos no trato gastrointestinal, reduziu a citotoxicidade, melhorou a solubilidade, possibilitou a internalização celular das moléculas e a estabilidade em meio as variações de pH, temperatura, forças iônicas e tempo de armazenamento.

Devido as vantagens observadas com a encapsulação em nanopartículas de zeína e a potencialização das atividades biológicas *in vitro*, destacamos que essas formulações podem ser utilizadas na indústria alimentícia na cobertura e conservação dos alimentos, bem como no tratamento por via oral de doenças. Assim, torna-se claro a necessidade de estudos *in vivo*, pré-clínicos e clínicos, pois essas dispersões nanoparticuladas apresentam potencial para tornarem-se produtos de base nanotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011.
- BAO, X.; QIAN, K.; YAO, P. Insulin-and cholic acid-loaded zein/casein–dextran nanoparticles enhance the oral absorption and hypoglycemic effect of insulin. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 31, p. 6234-6245, 2021.
- BAO, X.; QIAN, K.; YAO, P. Oral delivery of exenatide-loaded hybrid zein nanoparticles for stable blood glucose control and β -cell repair of type 2 diabetes mice. **Journal of nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2020.
- BASSETTI, M. *et al.* Treatment of infections due to mdr gram-negative bacteria. **Frontiers in medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.
- BAUTISTA, G. F. M. *et al.* Nanodelivery system based on zein-alginate complexes enhances in vitro chemopreventive activity and bioavailability of pomelo [Citrus maxima (Burm.) Merr.] seed limonoids. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, p. 101296, 2019.

- BIDYARANI, N. *et al.* Synthesis and physicochemical characterization of rhamnolipid-stabilized carvacrol-loaded zein nanoparticles for antimicrobial application supported by molecular docking. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 22, n. 10, p. 1-13, 2020.
- BILENLER, T. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, n. 5, p. 392-398, 2015.
- BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, n. 7, p. 620-636, 2011.
- CHANG, C. *et al.* Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, n. 1, p. 117-124, 2017.
- CHAUDHARY, S. A. *et al.* Solvent Emulsification Evaporation and Solvent Emulsification Diffusion Techniques for Nanoparticles. In: **Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing**. Springer, Cham, v. 1, n. 1, p. 287-300, 2021.
- CHENG, H. *et al.* A peppermint oil emulsion stabilized by resveratrol-zein-pectin complex particles: Enhancing the chemical stability and antimicrobial activity in combination with the synergistic effect. **Food Hydrocolloids**, v. 103, n. 1, p. 105675, 2020.
- COELHO, S. C.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying—A review. **Food Chemistry**, v. 339, n. 1, p. 127850, 2021.
- CUI, B. *et al.* Emamectin benzoate-loaded zein nanoparticles produced by antisolvent precipitation method. **Polymer Testing**, v. 94, n. 1, p. 107020, 2021.
- DA ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, n. 1, p. 105339, 2020.
- DA ROSA, C. G. *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, n. 1, p. 337-344, 2015.
- DAHIYA, S. *et al.* Conjugation of epigallocatechin gallate and piperine into a zein nanocarrier: Implication on antioxidant and anticancer potential. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 035011, 2018.

- DAI, L. *et al.* Curcumin encapsulation in zein-rhamnolipid composite nanoparticles using a pH-driven method. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. 1, p. 342-350, 2019.
- DAI, L. *et al.* Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent co-precipitation. **Food chemistry**, v. 237, n. 1, p. 1163-1171, 2017.
- DALPIAZ, A. *et al.* Application of the “in-oil nanoprecipitation” method in the encapsulation of hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 283-290, 2016.
- DE ARAUJO, J. T. C. *et al.* Development of anacardic acid-loaded zein nanoparticles: Physical chemical characterization, stability and antimicrobial improvement. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, n. 1, p. 115808, 2021.
- DE MELO, A. P. Z. *et al.* Syntesis and characterization of zein nanoparticles loaded with essential oil of *Ocimum gratissimum* and *Pimenta racemosa*. **Materials Research Express**, v. 6, n. 9, p. 095084, 2019.
- DE SOUZA TAVARES, W. *et al.* Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 341, n. 1, p. 116915, 2021.
- DE VILLIERS, Melgardt M.; ARAMWIT, Pornanong; KWON, Glen S. (Ed.). **Nanotechnology in drug delivery**. Springer Science & Business Media, 2008.
- DEMIR, M. *et al.* Zein-based composites in biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 6, p. 1656-1665, 2017.
- DROSOU, C. G.; KROKIDA, M. K.; BILIADERIS, C. G. Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. **Drying Technology**, v. 35, n. 2, p. 139-162, 2017.
- DU, J. *et al.* Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. **International journal of pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 738-749, 2015.
- ELZOGHBY, A. O.; ELGOHARY, M. M.; KAMEL, N. M. Implications of protein-and peptide-based nanoparticles as potential vehicles for anticancer drugs. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 98, p. 169-221, 2015.
- GAGLIARDI, A. *et al.* Paclitaxel-loaded sodium deoxycholate-stabilized zein nanoparticles: characterization and in vitro cytotoxicity. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. 1-10, 2019.

- GAGLIARDI, A. *et al.* Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 601, 2018.
- GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; LÓPEZ-RUBIO, A. Protein-based emulsion electrosprayed micro-and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. **Journal of colloid and interface science**, v. 465, n. 1, p. 259-270, 2016.
- GONG, S. *et al.* Facile encapsulation of thymol within deamidated zein nanoparticles for enhanced stability and antibacterial properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 626, n. 1, p. 126940, 2021.
- GRZELCZAK, M. *et al.* Directed self-assembly of nanoparticles. **ACS nano**, v. 4, n. 7, p. 3591-3605, 2010.
- GUO, H. X.; HEINÄMÄKI, J.; YLIRUUSI, J. Stable aqueous film coating dispersion of zein. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, n. 2, p. 478-484, 2008.
- GUTIÉRREZ, T. J. Polymers for food applications: News. In: Polymers for food applications. **Springer, Cham**, v. 1, n. 1. p. 1-4, 2018.
- HASHEM, F. M. *et al.* Optimized zein nanospheres for improved oral bioavailability of atorvastatin. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 4059, 2015.
- HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127-129, 2017.
- HEEP, G. *et al.* Zein-casein-lysine multicomposite nanoparticles are effective in modulate the intestinal permeability of ferulic acid. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, n. 1, p. 244-251, 2019.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177-185, 2017.
- HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of biopolymer nanoparticles by antisolvent precipitation and electrostatic deposition: Zein-alginate core/shell nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p. 101-108, 2015.
- HUANG, X. *et al.* Encapsulation of resveratrol in zein/pectin core-shell nanoparticles: Stability, bioaccessibility, and antioxidant capacity after simulated gastrointestinal digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 93, n. 1, p. 261-269, 2019.
- HUANG, X. *et al.* Resveratrol encapsulation in core-shell biopolymer nanoparticles: Impact on antioxidant and anticancer activities. **Food Hydrocolloids**, v. 64, n. 1, p. 157-165, 2017.

- INCHAURRAGA, L. *et al.* Zein-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1601-1611, 2020.
- IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Nanomedicine**, v. 12, n. 11, p. 1209-1211, 2017.
- JAIN, A. *et al.* Beta carotene-loaded zein nanoparticles to improve the biopharmaceutical attributes and to abolish the toxicity of methotrexate: A preclinical study for breast cancer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 402-412, 2018.
- JANEŽ, A. *et al.* Insulin therapy in adults with type 1 diabetes mellitus: a narrative review. **Diabetes Therapy**, v. 11, n. 2, p. 387-409, 2020.
- JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.
- Jl, N. *et al.* Chitosan coating of zein-carboxymethylated short-chain amylose nanocomposites improves oral bioavailability of insulin in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 313, n. 1, p. 1-13, 2019.
- Jl, N. *et al.* Preparation and characterization of insulin-loaded zein/carboxymethylated short-chain amylose complex nanoparticles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 35, p. 9335-9343, 2018.
- JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, n. 2, p. 109-123, 2013.
- KAKRAN, M. *et al.* Fabrication of quercetin nanoparticles by anti-solvent precipitation method for enhanced dissolution. **Powder Technology**, v. 223, n. 1, p. 59-64, 2012.
- KAUSHIK, P. *et al.* pH responsive doxorubicin loaded zein nanoparticle crosslinked pectin hydrogel as effective site-specific anticancer substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, n. 1, p. 1027-1037, 2020.
- KOFTERIDIS, D. P. *et al.* Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2020.
- LABIB, G. Overview on zein protein: A promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 65-75, 2018.

- LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.
- LAM, P. L. *et al.* Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. **Nanomedicine**, v. 12, n. 4, p. 357-385, 2017.
- LEE, E. J.; LEE, N. K.; KIM, I. S. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 106, n. 1, p. 157-171, 2016.
- LI, J. *et al.* Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. **Food chemistry**, v. 325, n. 1, p. 126921, 2020.
- LI, J. *et al.* Zein/gum Arabic nanoparticle-stabilized Pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system. **Carbohydrate polymers**, v. 200, n. 1, p. 416-426, 2018.
- LI, K. K. *et al.* Continuous preparation of zein colloidal particles by Flash NanoPrecipitation (FNP). **Journal of Food Engineering**, v. 127, n. 1, p. 103-110, 2014.
- LI, K. K. *et al.* Preparation of water-soluble antimicrobial zein nanoparticles by a modified antisolvent approach and their characterization. **Journal of Food engineering**, v. 119, n. 2, p. 343-352, 2013.
- LI, M.; YU, M. Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 12, p. 4108-4117, 2020.
- LIU, C. *et al.* Self-assembled composite nanoparticles based on zein as delivery vehicles of curcumin: role of chondroitin sulfate. **Food & Function**, v. 11, n. 6, p. 5377-5388, 2020.
- LIU, G. *et al.* Zein self-assembly using the built-in ultrasonic dialysis process: microphase behavior and the effect of dialysate properties. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 1, p. 173-181, 2018.
- LIU, Y. *et al.* Resveratrol-loaded biopolymer core-shell nanoparticles: bioavailability and anti-inflammatory effects. **Food & Function**, v. 11, n. 5, p. 4014-4025, 2020.
- LUCIO, D. *et al.* Optimization and evaluation of zein nanoparticles to improve the oral delivery of glibenclamide. In vivo study using *C. elegans*. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 121, n. 1, p. 104-112, 2017.
- LUO, C. *et al.* A review of the anti-inflammatory effects of rosmarinic acid on inflammatory diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, n. 1, p. 153, 2020.

- LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836-843, 2012.
- LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro-and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, p. 1-12, 2014.
- MA, Juan-Juan *et al.* Cellular uptake and intracellular antioxidant activity of zein/chitosan nanoparticles incorporated with quercetin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 48, p. 12783-12793, 2018.
- MACVANE, S. H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. **Journal of intensive care medicine**, v. 32, n. 1, p. 25-37, 2017.
- MANSOORI, B *et al.* The different mechanisms of cancer drug resistance: a brief review. **Advanced pharmaceutical**, v. 7, n. 3, p. 339, 2017.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. L *et al.* In vivo testing of mucus-permeating nanoparticles for oral insulin delivery using *Caenorhabditis elegans* as a model under hyperglycemic conditions. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 4, p. 989-1002, 2021.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. L *et al.* Zein-based nanocarriers for the oral delivery of insulin. In vivo evaluation in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 2, p. 647-658.
- MASOOD, Farha. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 569-578, 2016.
- MATTEUCCI, F. *et al.* Deployment and exploitation of nanotechnology nanomaterials and nanomedicine. **AIP conference proceedings**, v. 1990, n. 1, p. 1-26, 2018.
- MAURI-OBRAIDORS, E *et al.* Oral manifestations of Diabetes Mellitus. A systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v. 22, n. 5, p. e586, 2017.
- MENG, R *et al.* Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties. **Food Chemistry**, v. 340, p. 127893, 2021.
- MERINO, N *et al.* Antimicrobial efficacy of *Thymbra capitata* (L.) Cav. essential oil loaded in self-assembled zein nanoparticles in combination with heat. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 98-104, 2019.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

- MORENO, L. C. G. I., *et al.* Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.
- NGUYEN, D *et al.* Pharmaceutical applications of electrospraying. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 105, n. 9, p. 2601-2620, 2016.
- NUNES, R *et al.* Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. **Drug delivery and translational research**, v. 10, n. 3, p. 826-837, 2020.
- PALIWAL, R.; Palakurthi, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 108-122, 2014.
- PASCOLI, M *et al.* Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. **Frontiers in chemistry**, v. 6, n.1, p. 6, 2018.
- PATEL, A. R *et al.* Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, P. 12497-12503, 2010.
- PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, 2018.
- PAULUK, Daniele *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food hydrocolloids**, v. 94, p. 411-417, 2019.
- PENALVA, R *et al.* Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food hydrocolloids**, v. 44, p. 399-406, 2015.
- PENALVA, R *et al.* Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p.103-110, 2017.
- PENALVA, R *et al.* Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103-110, 2017.
- PENALVA, R *et al.* Zein-based nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol and its anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxic shock. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5603-5611, 2015.

- PENALVA, R. *et al.* Zein-based nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol and its anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxic shock. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 23, 5603-5611, 2015.
- PODARALLA, S., & Perumal, O. Preparation of zein nanoparticles by pH controlled nanoprecipitation. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 6, n. 4, p. 312-317, 2010.
- RAMOS, M. A. S. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1179, 2018.
- REIS, C. P. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.
- REVERCHON, E. Supercritical antisolvent precipitation of micro-and nanoparticles. **The journal of supercritical fluids**, v. 15, n. 1, p. 1-21, 1999.
- RIVAS, C. J. M. *et al.* Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66-81, 2017.
- RODRÍGUEZ-FÉLIX, F. *et al.* Preparation and Characterization of Quercetin-Loaded Zein Nanoparticles by Electrospraying and Study of In Vitro Bioavailability. **Journal of food science**, v. 84, n. 10, p. 2883-2897, 2019.
- ROSTAMABADI, H. *et al.* Electrospraying as a novel process for the synthesis of particles/nanoparticles loaded with poorly water-soluble bioactive molecules. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 102384, 2021.
- RUAN, J. *et al.* Novel oral administrated ellagic acid nanoparticles for enhancing oral bioavailability and anti-inflammatory efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, p. 215-222, 2018.
- SAFARI, J; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.
- SEDRAK, M. S. *et al.* Older adult participation in cancer clinical trials: A systematic review of barriers and interventions. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 78-92, 2021.
- SHI, Qiankun *et al.* In vitro antioxidant and antitumor study of zein/SHA nanoparticles loaded with resveratrol. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 7, p. 3530-3537, 2021.

SHINDE, P *et al.* Synthesis of luteolin loaded zein nanoparticles for targeted cancer therapy improving bioavailability and efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, p. 369-378, 2019.

SHINDE, P. *et al.* Physico-chemical characterization of carvacrol loaded zein nanoparticles for enhanced anticancer activity and investigation of molecular interactions between them by molecular docking. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 588, p. 119795, 2020.

SHUKLA, R., & Cheryan, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n.3, p. 171-192, 2001.

SOE, Z. C *et al.* Development of Folate-functionalized PEGylated Zein nanoparticles for ligand-directed delivery of paclitaxel. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 562, 2019.

STEWART, H. *et al.* Manufacture of lignin microparticles by anti-solvent precipitation: Effect of preparation temperature and presence of sodium dodecyl sulfate. **Food research international**, v. 66, n. 1, p. 93-99, 2014.

SULTANA, S. *et al.* Stability issues and approaches to stabilized nanoparticles based drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, v. 1, n. 1, p. 1-43, 2020.

SURASSMO, S *et al.* Surface modification of PLGA nanoparticles by carbopol to enhance mucoadhesion and cell internalization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, p. 229-236, 2015.

TAHRANI, A. A., Barnett, A. H., & Bailey, C. J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n.10, p. 566-592, 2016.

TANG, C. H. Assembly of Food Proteins for Nano-Encapsulation and Delivery of Nutraceuticals. **Food Hydrocolloids**, v. 117, p. 106710, 2021.

TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A *et al.* Gallic acid-loaded zein nanoparticles by electrospraying process. **Journal of food science**, v. 84, n. 4, p. 818-831, 2019.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International journal of pharmaceutics**, v. 522, n. 1-2, p. 172-197, 2017.

TRAN, P. H *et al.* The use of zein in the controlled release of poorly water-soluble drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 566, p. 557-564, 2019.

TRAN, S *et al.* Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and translational medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-21, 2017.

- VAUTHIER, C., & Bouchemal, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n.5, p. 1025-1058, 2009.
- VAUTHIER, C.; CABANE, B.; LABARRE, D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 466-475, 2008.
- VAUTHIER, C.; PONCHEL G. Polymer Nanoparticles for Nanomedicines. **Switzerland: Springer International Publishing**, 2016.
- WANG, L., & Zhang, Y. Heat-induced self-assembly of zein nanoparticles: Fabrication, stabilization and potential application as oral drug delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 403-412, 2019.
- WANG, L., Xue, J., & Zhang, Y. Preparation and characterization of curcumin loaded caseinate/zein nanocomposite film using pH-driven method. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 71-80, 2019.
- WANG, M. et. al. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate β -carotene by anti-solvent precipitation method. **Food hydrocolloids**, v. 77, p. 577-587, 2018.
- WANG, Q., Jin, Y., & Xiong, Y. L. Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n.41, p. 10827-10834, 2018.
- WANG, S. Z., & Esen, A. Primary structure of a proline-rich zein and its cDNA. **Plant physiology**, v. 81, n.1, p. 70-74, 1986.
- WANG, Y *et al.* pH-shifting encapsulation of curcumin in egg white protein isolate for improved dispersity, antioxidant capacity and thermal stability. **Food Research International**, v. 137, p. 109366, 2020.
- WEBER, C *et al.* Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 197-200, 2000.
- WEI, Y *et al.* Formation mechanism and environmental stability of whey protein isolate-zein core-shell complex nanoparticles using the pH-shifting method. **LWT**, v. 139, p.110605, 2021.
- WEI, Y *et al.* Structure, physicochemical stability and in vitro simulated gastrointestinal digestion properties of β -carotene loaded zein-propylene glycol alginate composite nanoparticles fabricated by emulsification-evaporation method. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 149-158, 2018.

- WU, Y *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2012.
- XU, J *et al.* A review of anti-inflammatory compounds from marine fungi, 2000–2018. **Marine drugs**, v. 17, n. 11, p. 636, 2019.
- YILDIZ, G. *et al.* Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermo-sonication. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 836-846, 2017.
- YUAN, D. *et al.* Heat-induced formation of soy protein nanoparticles at acidic pH for encapsulation of curcumin. **Shipin Kexue/Food Science**, v. 41, n.14, p. 1-8, 2020.
- YUAN, Y. *et al.* Fabrication and characterization of zein nanoparticles by dextran sulfate coating as vehicles for delivery of curcumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 151, p. 1074-1083, 2020.
- YUAN, Y. *et al.* Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 30-39, 2019.
- ZARGAR, B. *et al.* Zein bio-nanoparticles: a novel green nanopolymer as a dispersive solid-phase extraction adsorbent for separating and determining trace amounts of azorubine in different foodstuffs. **RSC advances**, v. 6, n. 77, p. 73096-73105, 2016.
- ZHAN, X. *et al.* Entrapment of curcumin in whey protein isolate and zein composite nanoparticles using pH-driven method. **Food Hydrocolloids**, v. 106, p. 105839, 2020.
- ZHANG, F. *et al.* Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. **Journal of Food Engineering**, v. 247, p. 9-18, 2019.
- ZHANG, Shuangling *et al.* Preparation, characterisation and antioxidant activities of rutin-loaded zein-sodium caseinate nanoparticles. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194951, 2018.
- ZHANG, X. *et al.* Nanosuspensions of poorly water soluble drugs prepared by top-down technologies. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n.3, p. 388-407, 2014.
- ZHANG, Y. *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food chemistry**, v. 142, p. 269-275, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. **Journal of controlled release**, v. 206, p. 206-219, 2015.

ZHONG, Q. *et al.* Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical anti-solvent process. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 697-700, 2009.

ZOU, T. *et al.* Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. **Food hydrocolloids**, v. 27, n.2, p. 293-300, 2012.

ZOU, Yan *et al.* Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106980, 2021.

4 ARTIGO 2

Nanopartículas de zeína contendo ceftazidima e tobramicina: Atividade antibacteriana e antibiofilme frente a bactérias Gram-negativas

Luís André de Almeida Campos ^{1,2}, Azael Francisco Silva Neto¹, Maria Cecília Souza Noronha¹, João Victor de Oliveira Santos², Marton Kaique de Andrade Cavalcante³, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^{3,4}, Valéria Rêgo Alves Pereira³, Nereide Stela Santos-Magalhães¹, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{2,5}

¹ Setor de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

² Setor de Microbiologia Clínica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Fundação Oswaldo Cruz Pernambuco (Fiocruz/PE), Laboratório de Imunogenética, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Pernambuco / Centro Acadêmico de Vitória (UFPE / CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

⁵ Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco / Centro Acadêmico de Vitória (UFPE / CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

As infecções bacterianas causadas por bacilos Gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, impactam a saúde pública e a economia mundial. Este cenário é agravado quando essas cepas são produtoras de biofilme, sendo necessário, um tratamento eficaz com antibióticos. Nesse sentido, a ceftazidima e a tobramicina destacam-se por apresentarem atividade antibacteriana e antibiofilme, no entanto, esses fármacos podem apresentar toxicidade elevada, ser degradados em fluidos biológicos e não penetrar nos biofilmes. Para sobrepor essas limitações, a encapsulação em nanopartículas de zeína é uma alternativa promissora para a entrega desses fármacos. Assim, o objetivo desse estudo foi encapsular ceftazidima e tobramicina em nanopartículas de zeína, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme frente a bactérias Gram-negativas. As nanopartículas de zeína foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação e foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ), pH e eficiência de encapsulação (%EE), além das caracterizações físico-químicas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). A cinética de liberação foi realizada pelo método de diálise em tampão salino-fosfato (pH 7,4) e o ensaio de citotoxicidade pelo método MTT utilizando linhagens de fibroblastos L929 e hepatócitos HEPG2. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os ensaios antibiofilme foram realizados pelo método de cristal violeta. As nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP) foram preparadas e apresentaram $\emptyset$ de 196,1 nm e 187,2 nm, PDI de 0,032 e 0,052, ζ de $-31,4 \pm 0,8$ mV e $-32,0 \pm 1,5$ mV, pH de 7,1 e %EE de $83,94 \pm 0,4\%$ e $59,76 \pm 0,3\%$, respectivamente. As caracterizações por MEV, DRX, FTIR, DSC e TGA indicaram interações químicas entre os componentes da formulação, encapsulação dos fármacos e estabilidade térmica das nanopartículas. Os ensaios de cinética comprovaram a liberação controlada dos fármacos por 24h e os ensaios de citotoxicidade das nanopartículas evidenciaram uma redução entre 9 e 25 vezes comparado aos fármacos livres. A CIM de CAZ-ZNP variou entre 0,097 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e de TOB-ZNP entre 0,39 $\mu\text{g/mL}$ e 3,12 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a CBM de CAZ-ZNP variou entre 0,39 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ e

de TOB-ZNP entre 1,56 µg/mL e 12,5 µg/mL. CAZ-ZNP+TOBZNP apresentaram CIM variando de 0,195 µg/mL a 3,12 µg/mL e CBM variando de 0,781 µg/mL a 12,5 µg/mL. CAZ-ZNP inibiram a formação de biofilme entre 42% e 100%, e erradiaram o biofilme entre 38% e 89%, enquanto TOB-ZNP inibiram a formação de biofilme entre 59% e 100%, e erradicaram o biofilme entre 40% e 86%. Já CAZ-ZNP+TOBZNP inibiram a formação de biofilme entre 80% e 100%, e erradicaram o biofilme entre 59% e 95%. CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentam características físico-químicas ideais para estudos *in vivo*, liberando os fármacos de forma controlada, reduzindo a citotoxicidade, melhorando a atividade antibacteriana e antibiofilme, tornando-se uma alternativa promissora para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* produtoras de biofilme.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Nanocarreadores poliméricos. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência.

Introdução

As infecções bacterianas causam altos índices de morbimortalidade impactando negativamente a economia e a saúde pública mundial. A terapêutica dessas infecções é dispendiosa e prolongada, em especial, para o tratamento de infecções causadas pelos bacilos Gram-negativos (BGNs), como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BASSETTI et al., 2019; KOFTERIDIS et al., 2020).

Esses BGNs estão envolvidos em infecções do trato urinário, do trato digestivo, do sistema nervoso central, intra-abdominais, na pele, em feridas, além de causar, pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremia, septicemias e infecções nas unidades de terapia intensiva (UTI) (MACVANE, 2017). Algumas dessas cepas podem produzir biofilmes, fator de virulência definido como a associação de células bacterianas sob uma superfície abiótica ou biótica com produção de uma matriz complexa composta de substâncias poliméricas extracelulares incluindo exopolissacarídeos (EPS), DNAs extracelulares (eDNA) e proteínas (PAKHARUKOVA et al., 2018). As infecções bacterianas estão predominantemente associadas a cepas produtoras de biofilme, tornando seu tratamento mais difícil (CHUNG, 2016).

Alguns antibióticos podem ser utilizados para o tratamento de pacientes

acometidos por estes microrganismos produtores de biofilme, incluindo ceftazidima (CAZ) e tobramicina (TOB) (BASSETTI et al., 2019). Esses antibióticos apresentam potencial antibiofilme e são utilizados clinicamente na terapia contra infecções bacterianas causadas pelos BGNs (HEDAYATI CH et al., 2020; FENG et al. 2021). Contudo, esses fármacos apresentam níveis elevados de toxicidade, podem apresentar dificuldade de penetrar e alcançar as camadas mais internas no biofilme e não apresentam formas farmacêuticas versáteis para administração em diferentes vias, como por exemplo, via oral, nasal, intravenosa e transdérmica (DE LEO et al., 2010; MICHELON et al., 2019).

Com o objetivo de sobrepor essas limitações, a estratégia terapêutica de encapsular esses fármacos em nanopartículas poliméricas apresenta-se promissora. Dentre os polímeros estudados pela comunidade científica, a zeína tem se destacado, pois este polímero é natural, proveniente do milho (*Zea mays* L.), gastrorresistente, mucoadesivo, de fácil obtenção, baixo custo e permite a encapsulação de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017; PASCOLI; LIMA; FRACETO, 2018).

Encapsular antimicrobianos em nanocarreadores têm se mostrado como uma importante ferramenta para melhoria da biodisponibilidade, para a aplicação em diversas vias de administração e para a potencialização da atividade antibacteriana e antibiofilme frente aos BNGs produtores de biofilme (SANS-SERRAMITJANA et al., 2017; YE et al., 2018; HEDAYATI CH et al., 2020). Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanopartículas de zeína contendo ceftazidima e tobramicina, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Material e métodos

PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de zeína (ZNP) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação adaptado de Moreno et al. (2017). Inicialmente, a zeína (200 mg) e a lisina (20 mg) foram solubilizadas em 25 mL de etanol 70% por 1 h. Posteriormente, foi adicionado 25 mL de água ultrapura à suspensão de zeína e lisina pelo método de gotejamento. Em seguida, houve a evaporação do etanol por um rotaevaporador e foi

obtido 25 mL de dispersão. Após essa etapa, as ZNP foram liofilizadas com manitol a 5%.

As nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação adaptado de Moreno et al. (2017), como descrito acima. A quantidade em miligramas dos constituintes, zeína, lisina e fármacos e o volume foram escolhidos a partir dos resultados de um estudo de planejamento fatorial. Para encapsulação dos fármacos, a CAZ (12,5 mg) foi solubilizada em solução de etanol 70% e a TOB (12,5 mg) em solução aquosa. Em seguida, as soluções de CAZ e de TOB foram adicionadas à solução de zeína/lisina sob agitação magnética por 1 h. Por fim, CAZ-ZNP e TOB-ZNP também foram liofilizadas utilizando o manitol a 5%.

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas

O diâmetro médio das partículas (ZNP, CAZ-ZNP e TOB-ZNP) foi mensurado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do tamanho de partícula ($\emptyset$), 50 μ L das nanopartículas foram diluídos em 950 μ L de água ultrapurificada (Milli Q®, Millipore, USA). As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico (nm). A carga de superfície das nanopartículas foi estabelecida pela determinação do potencial zeta (ζ). Para medição do ζ houve a diluição de 50 μ L das amostras em 950 μ L de água purificada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH das nanopartículas foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnocon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente. Os resultados correspondem a experimentos independentes realizados em triplicata em diferentes dias (CAVALCANTI et al., 2021).

Doseamento e eficiência de encapsulação de ceftazidima e tobramicina nas nanopartículas

Para determinar o doseamento de CAZ e TOB nas nanopartículas, uma alíquota (350 µL) de CAZ-ZNP ou de TOB-ZNP foi diluída em 1000 µL de etanol 70% e foi adicionado metanol até completar no balão volumétrico de 5000 µL. A CAZ nas nanopartículas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis) a 254 nm. Como fase estacionária, foi usada uma coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm, XBridge Waters) e a fase móvel utilizada foi uma solução de Acetonitrila:Água Milli-Q (2:98 v/v). Foi utilizada a condição de eluição isocrática, a um fluxo de 1 mL/min, com tempo de corrida de 6 min (TORRES et al., 2012). Para as amostras com TOB, foi realizada a derivatização utilizando uma solução de fluorescamina a 0,5% (p/v) em metanol com incubação à 24 °C protegidas da luz por 1h (MORENO-SASTRE et al., 2016). A TOB nas nanopartículas foi determinada a 390 nm usando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 pro (Biochrom, Cambridge, Inglaterra).

A eficiência de encapsulação (%EE) de CAZ e TOB foi realizada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). As amostras das formulações (500 µL) foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm por 1h. Trezentos e cinquenta microlitros da amostra filtrada foram diluídos em 1000 µL de etanol 70% e foi adicionado metanol no balão volumétrico de 5000 µL (SÁNCHEZ-JUÁREZ, 2019). A CAZ filtrada foi mensurada por HPLC-UV/Vis e a TOB filtrada foi mensurada usando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 pro como descrito anteriormente. Experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição em diferentes dias. A eficiência de encapsulação foi determinada seguindo a equação abaixo.

$$\%EE = \frac{\text{Total de CAZ ou TOB} - \text{filtrado de CAZ ou TOB}}{\text{Total de CAZ ou TOB}} \times 100$$

Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e difração de raios-X das nanopartículas

Para análise morfológica das nanopartículas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:10 v/v de nanopartículas:água. As nanopartículas foram espalhadas em stubs e mantidas em estufa a temperatura de 37 °C por 24 h. Após a secagem, os stubs foram metalizados (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100) e observados ao microscópio eletrônico de varredura ZEISS, modelo EVO-LS15 (DA ROSA et al., 2015).

Os espectros de FTIR das ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP foram obtidos a partir da mistura das amostras liofilizadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr). As amostras foram escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} no espectrofotômetro de transformada de Fourier (IV-TF) (modelo Frontier/PerkinElmer, Califórnia, EUA), obtendo-se os espectros com resolução de 4 cm^{-1} (CHEN et al., 2020).

A análise de DRX das ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP foi realizada usando um difratômetro de raios X (Rigaku, modelo Miniflex, Texas, EUA). Os dados foram coletados em uma faixa angular de 5° a 50° 2-teta em modo contínuo usando um tamanho de etapa de 0,02° 2-teta e tempo de etapa de 5 s (LIANG et al., 2017).

Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas

As curvas de TGA de ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP foram obtidas através do equipamento TGA Q500 (TA Instruments, Boston, EUA). As amostras (5 mg) foram aquecidas em uma bandeja de platina a uma taxa de 10 °C/min, com fluxo de nitrogênio de 20 mL/min da temperatura 25 até 600 °C (DA ROSA et al., 2015).

As curvas de DSC de ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP foram obtidas usando um DSC Q10 (TA Instruments, Boston, EUA). Cada amostra analítica (5 mg) foi pesada em uma bandeja de alumínio e, em seguida, a bandeja foi selada. As amostras foram aquecidas da temperatura de 20 a 250 °C a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C/min e vazão 20 mL/min de gás nitrogênio (PARK, PARK, KIM, 2015).

Estabilidade das nanopartículas

CAZ-ZNP e TOB-ZNP foram mantidas liofilizadas a 4 °C por 6 meses e avaliadas mensalmente para determinar $\emptyset$, PDI, ζ e doseamento de fármaco. O $\emptyset$, PDI, ζ e doseamento de fármaco foram determinados como descrito acima.

Cinética de liberação *in vitro* de CAZ e TOB a partir das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana

O perfil cinético de liberação *in vitro* de CAZ e TOB foi avaliado pela técnica de diálise usando um saco de diálise de membrana (membrana de celulose, cut-off 15–20 kD; Sartorius, Alemanha) em tampão salino-fosfato (PBS) em pH 7,4 (CAVALCANTI et al., 2021). O ensaio foi realizado nas condições sink, onde o volume do meio de dissolução foi 10 vezes o volume de saturação. A membrana foi hidratada, e uma alíquota das dispersões de CAZ-ZNP ou TOB- ZNP (3 mL) foi inserida na membrana e colocada em um tubo (50 mL) contendo 30 mL de solução tampão (pH 7,4) e mantida por agitação (70 rpm) a 37 °C por 24 h. Inicialmente, as alíquotas de 3 mL foram removidas após 15 min, 30 min, 45 min, 1h, e posteriormente a primeira hora, em intervalos de 60 minutos. À medida que as alíquotas de 3 mL foram removidas, o mesmo volume foi inserido pela solução tampão PBS de pH 7,4 para cada alíquota removida. A CAZ e a TOB foram quantificados via HPLC-UV e VIS/UV, respectivamente, como descrito anteriormente.

Citotoxicidade

A citotoxicidade em células de mamíferos foi avaliada através de ensaios com MTT. Os fibroblastos L929 e hepatócitos HEPG2 foram coletados de garrafas de cultura celular e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo chato e incubadas por 24h, a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Posteriormente, CAZ, TOB, ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP os compostos foram depositados nas concentrações de 1,56 a 50 µg/mL e incubados por um período de 48h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo. Após a incubação foi depositado 25 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5 mg/mL em PBS, seguida de incubação por 2h, a 37 °C sob ausência de luz. O MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado por poço para a solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570

nm no espectrofotômetro (Multiskan FC, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Experimentos independentes foram realizados em diferentes dias em triplicata.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* dos fármacos encapsulados nas nanopartículas foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021). Para este ensaio foram utilizadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 13846, *Escherichia coli* H100407, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Inicialmente, foi distribuído caldo Müller-Hinton (MHC) em cada poço das placas. Em seguida, foram adicionadas CAZ, TOB, CAZ-ZNP e TOB-ZNP e CAZ-ZNP + TOB-ZNP através de diluição seriada nas concentrações de 0,097 a 50 µg/mL e por fim as suspensões bacterianas na concentração final de 10⁵ UFC/mL. O MHC sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o MHC com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP foi utilizado como controle negativo experimental. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota da amostra dos poços em que não houve crescimento visível foi inoculada em ágar Müller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração em que não houve crescimento microbiano (CLSI, 2021). Experimentos independentes em triplicata foram realizados em diferentes dias.

Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos produtores de biofilme foram identificados através do método do cristal violeta (STEPANOVIC et al., 2000). Inicialmente foi distribuído caldo

triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição e, posteriormente, foram adicionadas as suspensões bacterianas (10^5 UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 13846, *Escherichia coli* H100407, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e, em seguida, as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e ácido acético glacial 30% foi adicionado em cada poço. Em seguida, a análise do resultado foi realizada por espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como controle negativo. As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de ODs (Densidades ópticas) dos biofilmes bacterianos, em comparação com valor da ODc (Densidade óptica do controle): não aderente se $OD \leq ODc$; fraca produção de biofilme se $ODc < OD \leq 2 \times ODc$; produção moderada de biofilme se $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$; ou forte produção de biofilme se $4 \times ODc < OD$ (STEPANOVIC et al., 2000). Experimentos independentes em triplicata foram realizados em diferentes dias.

Avaliação da inibição da formação do biofilme

Os ensaios para avaliação da inibição da formação do biofilme foram realizados frente às cepas que demonstraram ser moderadamente ou fortemente produtoras de biofilme. Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida foram adicionados CAZ, TOB, CAZ-ZNP e TOB-ZNP e CAZ-ZNP + TOB-ZNP nas concentrações de CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8 e CIM/16 e, posteriormente, foram adicionadas as suspensões bacterianas (10^5 UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP foi utilizado como controle negativo experimental. Após

incubação, a inibição de produção de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (STEPANOVIĆ et al., 2000) e os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima da inibição de biofilme (CIMB) e em porcentagem de inibição (ALBANO et al., 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias. Os resultados deste teste foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA) e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Avaliação da erradicação do biofilme

Os ensaios para avaliação da erradicação do biofilme foram realizados com as mesmas cepas do estudo anterior. Inicialmente, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407 foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de McFarland em TSB + glicose e distribuídos nas placas de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para permitir a formação do biofilme. Após incubação, o meio de cultura foi retirado e reposto um novo meio. Em seguida, CAZ, TOB, CAZ-ZNP e TOB-ZNP e CAZ-ZNP + TOB-ZNP foram distribuídas nas microplacas nas concentrações de 16×CIM, 8×CIM, 4×CIM, 2×CIM e CIM, estas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP foi utilizado como controle negativo experimental. Após incubação, a erradicação de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (STEPANOVIĆ et al., 2000) e os resultados foram expressos como concentração de erradicação mínima de biofilme (CEMB) e em porcentagem de inibição (ALBANO et al., 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias. Os resultados deste teste foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA) e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Análises estatísticas

Nos estudos de citotoxicidade e nos testes microbiológicos, para comparar as médias de múltiplos grupos, a análise de variância one-way (ANOVA) foi aplicada

usando o procedimento de comparação múltipla de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao $\emptyset$, PDI, ζ , pH, doseamento e %EE (tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização de nanopartículas de zeína contendo ceftazidima e tobramicina.

	$\emptyset$ (nm)	PDI	ζ (mV)	Doseamento (%)	%EE
ZNP	184,2	0,054	$-46,4 \pm 1,0$	NR	NR
CAZ-ZNP	196,1	0,032	$-31,4 \pm 0,8$	$99,12 \pm 0,7$	$83,94 \pm 0,4$
TOB-ZNP	187,2	0,052	$-32,0 \pm 1,5$	$99,29 \pm 0,1$	$59,76 \pm 0,3$

Fonte: O autor (2022).

pH=7,1

$\emptyset$: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta. %EE: eficiência de encapsulação; ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina; NR: não realizado.

O $\emptyset$, PDI, ζ e pH são parâmetros fundamentais para determinar a estabilidade e o potencial das formulações para aplicação em testes *in vivo* e clínicos. As ZNPs desenvolvidas neste estudo apresentaram $\emptyset$ entre 180 e 200 nm. Estudos indicam que nanocarreadores com $\emptyset$ variando de 50 a 200 nm são apropriados para aplicações intravenosas (DANAEI, et al., 2018), entre 100 e 700 nm para aplicação nasal (MISTRY et al., 2009), entre 10 e 210 nm para aplicações transdérmicas pela via transfolicular (FILON, et al., 2015), e entre 50 e 500 nm para aplicação oral (FROHLICH; ROBLEGG, 2016).

As formulações produzidas apresentaram PDI $< 0,1$ e ζ acima de -30 mV, além de apresentaram pH similar ao plasma sanguíneo (pH 7,1). O PDI determina a homogeneidade das nanopartículas e valores iguais ou menores que 0,2 indicam

uniformidade e são aceitáveis para nanopartículas à base de polímero (DANAEL et al., 2018). O ζ está correlacionado à estabilidade da suspensão das nanopartículas e os valores acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV indicam maior estabilidade, devido à maior repulsão entre as partículas, reduzindo a agregação entre elas (ZHANG et al., 2014). Assim, sugere-se que o ζ , o PDI, o ζ e o pH das nanopartículas desenvolvidas nesses estudos são apropriados para estudos *in vivo* e para aplicação pelas diferentes vias de administração, incluindo oral, nasal, transdérmica e intravenosa.

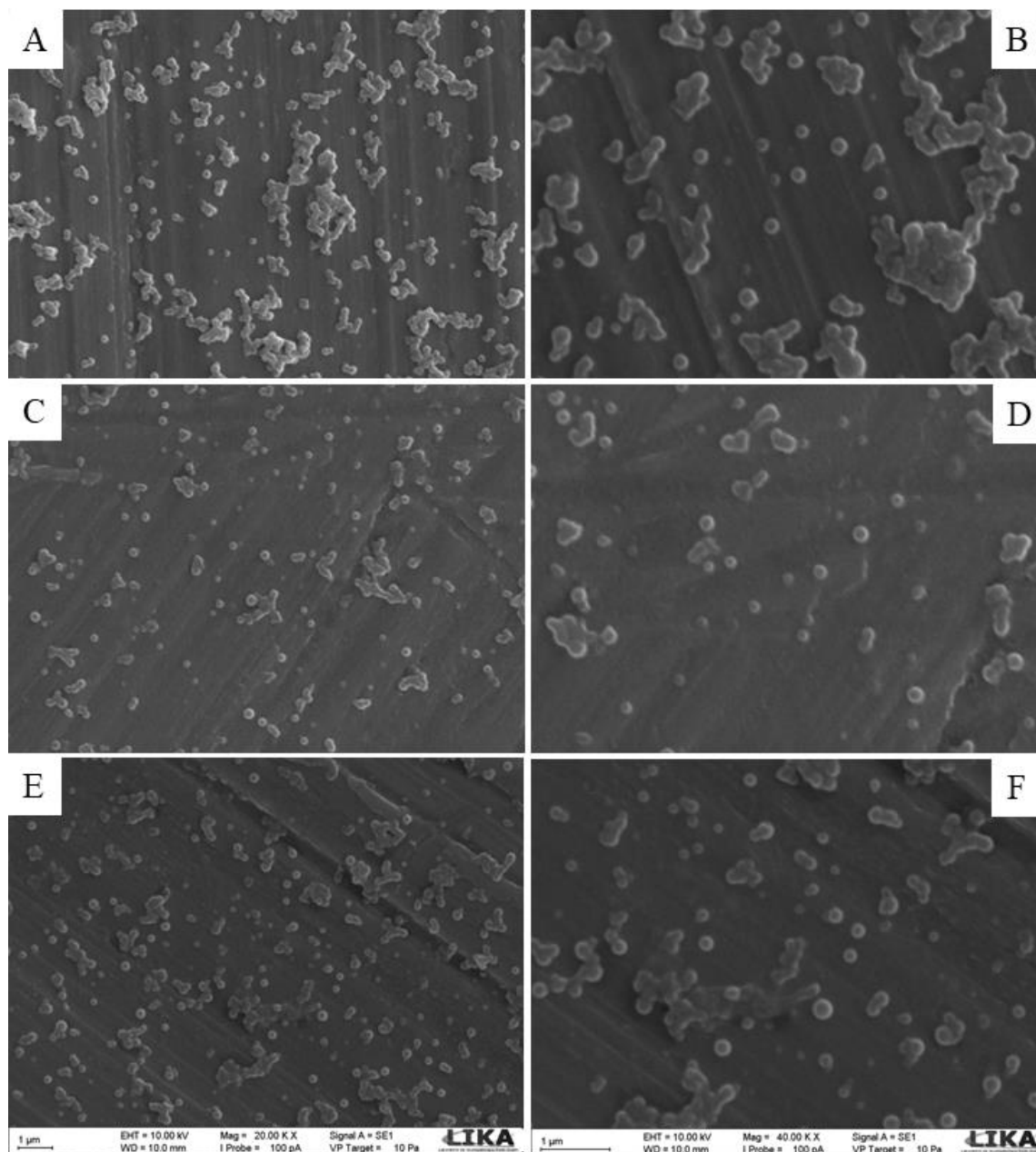
Alguns estudos encapsularam CAZ ou TOB em nanocarreadores e determinaram a eficiência de encapsulação. Wijesooriya et al. (2013) e Farzampanah et al. (2017) encapsularam CAZ em lipossomas e obtiveram $17,72 \pm 0,92\%$ e 50% de %EE, respectivamente. Enquanto, Silva et al. (2017) encapsularam CAZ em nanopartículas de alginato/quitosana e observaram $41 \pm 4\%$ de %EE. Deacon et al. (2015) encapsularam a TOB em nanopartículas de alginato/quitosana e obtiveram uma %EE de $45,8 \pm 7,0\%$. Al-Nemrawi et al. (2018) encapsularam a TOB em nanopartículas de PLGA e foi observado a %EE de $87,20\%$, enquanto Hedayati Ch et al. (2020) encapsularam a TOB em niossomas, obtendo uma %EE de $69,54 \pm 0,67\%$. Os estudos demonstram %EE variável para CAZ e TOB de acordo com o tipo de nanocarreador. Em nanopartículas poliméricas foi observado a %EE entre 40% e 87% , corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e difração de raio-X

As imagens obtidas por MEV evidenciam a morfologia esférica e distribuição homogênea das ZNPs (figura 1A e B), de CAZ-ZNP (figura 1C e D) e TOB-ZNP (figura 1E e F), corroborando com os resultados obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmica utilizando o Zetasizer Nano-ZS90, e com os estudos de Zhang et al. (2021), Reboredo et al. (2022) e Leena et al. (2022).

Na espectroscopia de ZNP, de CAZ-ZNP e TOB-ZNP (figura 2) constata-se a presença da zeína através da observação de duas bandas de vibração de alongamento, entre $1600-1500\text{ cm}^{-1}$, características dos grupos amidas presentes na estrutura deste polímero (REBOREDO, 2021). A banda de absorção na faixa dos $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ foi observada em todas as nanopartículas e refere-se aos grupos NH^{3+} da cadeia lateral protonada do aminoácido lisina (ROZENBERG; SHOHAM, 2007).

Figura 1 - Morfologia de ZNP (A e B), CAZ-ZNP (C e D) e TOB-ZNP (E e F) obtida por microscopia eletrônica de varredura.



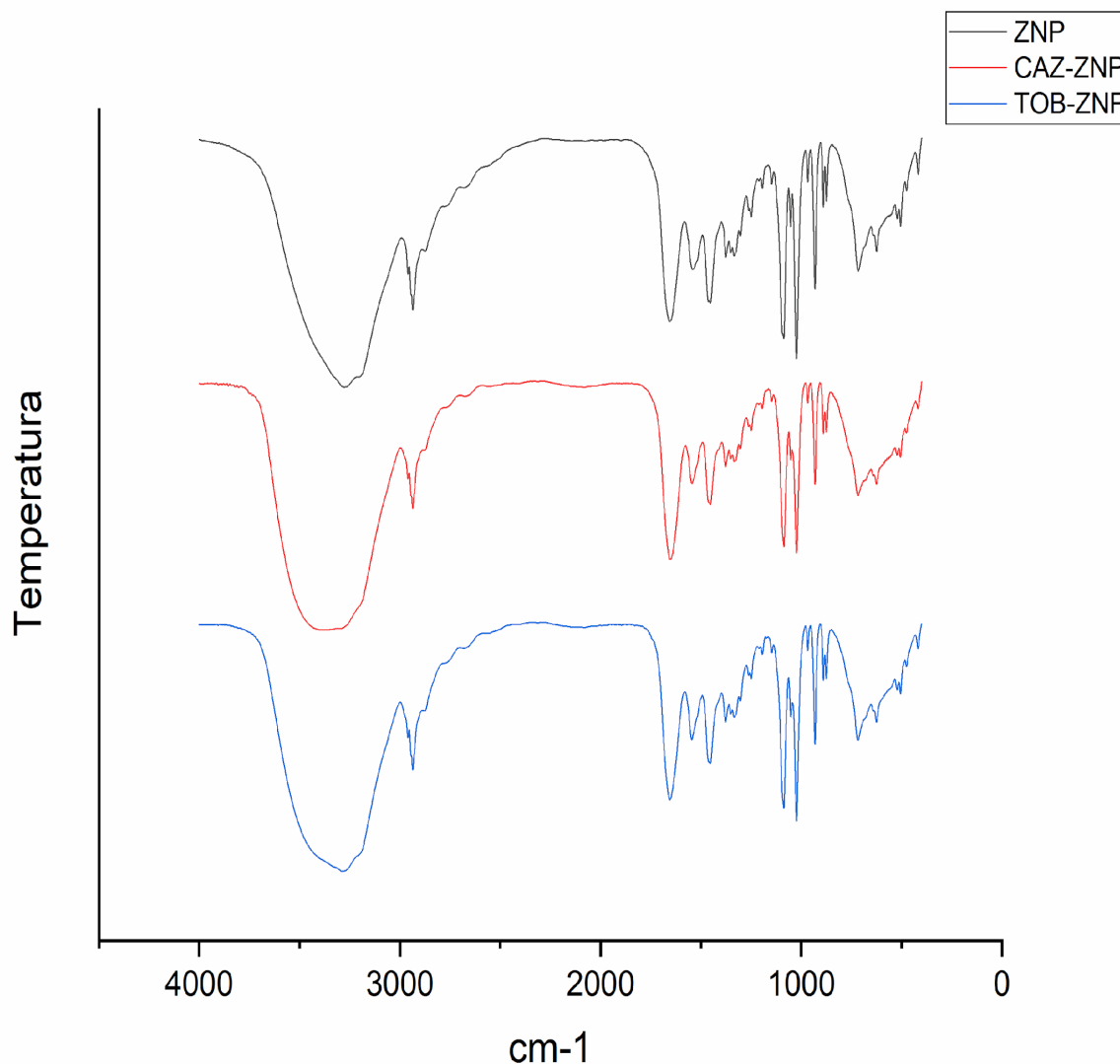
Fonte: O autor (2022).

A CAZ apresenta bandas de deformação axial na região de $3600\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$, correspondentes aos grupamentos químicos NH e OH. Há, também, a presença de bandas entre $1350\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, devido à deformação axial das ligações C-N presentes nos anéis aromáticos, e entre $1680\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ devido à deformação axial do grupo amida C=O (OSÓRIO, 2018).

O espectro da TOB, por sua vez, apresenta bandas de absorção em $3400\text{--}3200$

cm^{-1} devido ao alongamento N-H ou O-H, em $2921\text{--}2899\text{ cm}^{-1}$ devido ao alongamento C-H, em $1576\text{--}1598\text{ cm}^{-1}$ devido à curvatura N-H, em $1349\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$ devido à vibração de curvatura O-H e em 1032 cm^{-1} devido ao alongamento C-N ou C-O (ROSASCO, 2018).

Figura 2 – Espectros de FTIR das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).



Fonte: O autor (2022).

ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo tobramicina.

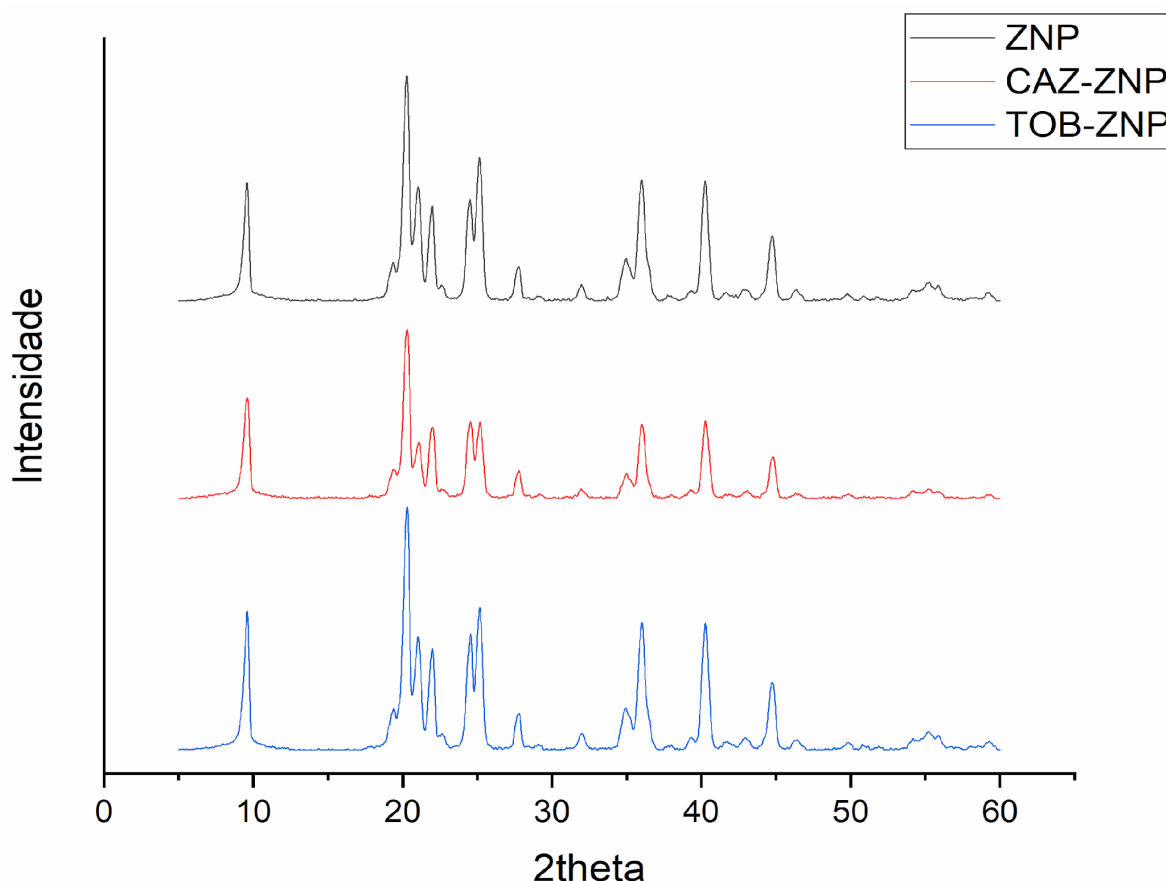
Na figura 2, é possível observar em todas as amostras as bandas de absorção características da zeína e da lisina, contudo, nas formulações contendo os fármacos, percebe-se ausência e alteração em algumas bandas, indicando a interação dos

fármacos com o polímero carreador e a encapsulação destas moléculas.

A DRX foi realizada a fim de investigar as interações intermoleculares e a difração cristalina das nanopartículas (Figura 3).

A zeína apresenta dois picos de difração a $2\theta = 9,7^\circ$ e $19,6^\circ$, indicando a característica amorfa da zeína, podendo ser alterada quando há interações químicas (FENG, 2020). A CAZ, de caráter cristalino, é caracterizada através de um pico 2θ de $22,3^\circ$ (PEREIRA, 2019). A TOB, também de caráter cristalino, apresenta picos de difração característicos em 2θ em $17,7^\circ$, $18,3^\circ$, $18,8^\circ$ (ROSASCO, 2018).

Figura 3 – DRX das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).



Fonte: O autor (2022).

ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo tobramicina.

Na figura 3, pode-se observar pequenas variações nos picos, indicando a cristalinidade das nanopartículas, mas também alteração na cristalinidade destes fármacos, devido a possíveis ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas entre

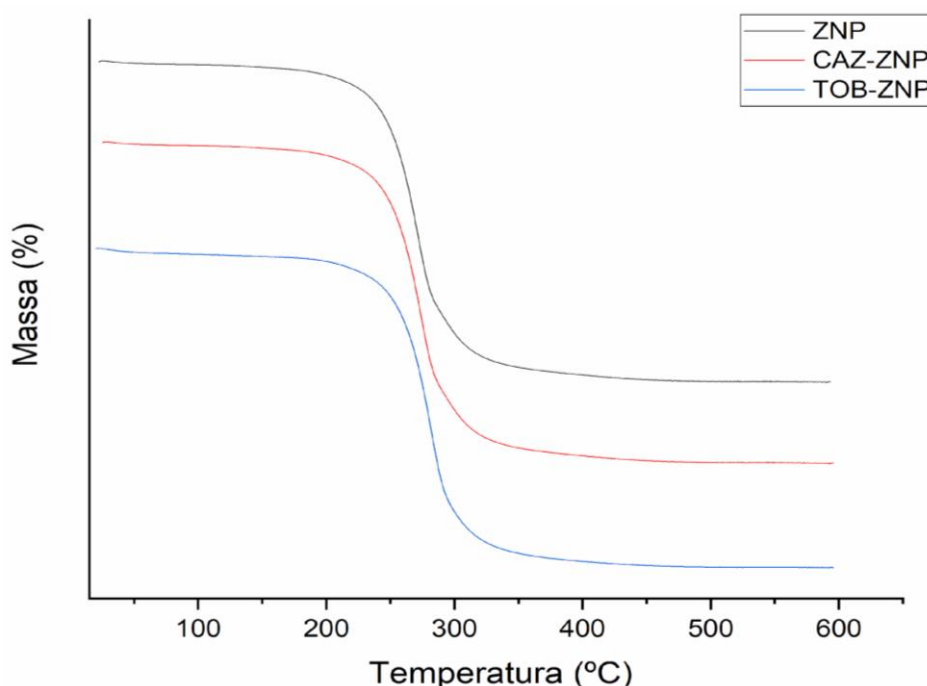
o fármaco e o polímero carreador.

Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial

As curvas termogravimétricas obtidas das nanopartículas de zeína (figura 4), demonstram perda de peso conforme ocorre o aumento da temperatura, contudo houve maior redução de massa entre 230 e 320 °C.

Comumente, o polímero de zeína tem uma perda de massa em torno de 65% na temperatura de 280 °C (ASWATHY, 2012), corroborando com os dados obtidos na figura 4. Essa perda de massa é atribuída à quebra dos resíduos de aminoácidos, bem como à clivagem das ligações peptídicas da zeína (ASWATHY, 2012). Entre 350 e 600 °C, ocorre maior perda de massa da lisina (SELVAKANNAN et al., 2003). A CAZ tem perda de massa iniciada em 25 °C e finalizada em torno de 200 °C (MASOUD, 2018). A TOB apresenta perda de massa entre 55 °C e 125 °C (DASH; SURYANARAYANAN, 1991; PATERE, 2018; PEREIRA et al., 2019). Na figura 4, observa-se que não houve perda de massa entre 25 e 200 °C, indicando que encapsulação de CAZ e TOB, além de evidenciar a estabilidade térmica das nanopartículas.

Figura 4 – Curvas termogravimétricas das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).

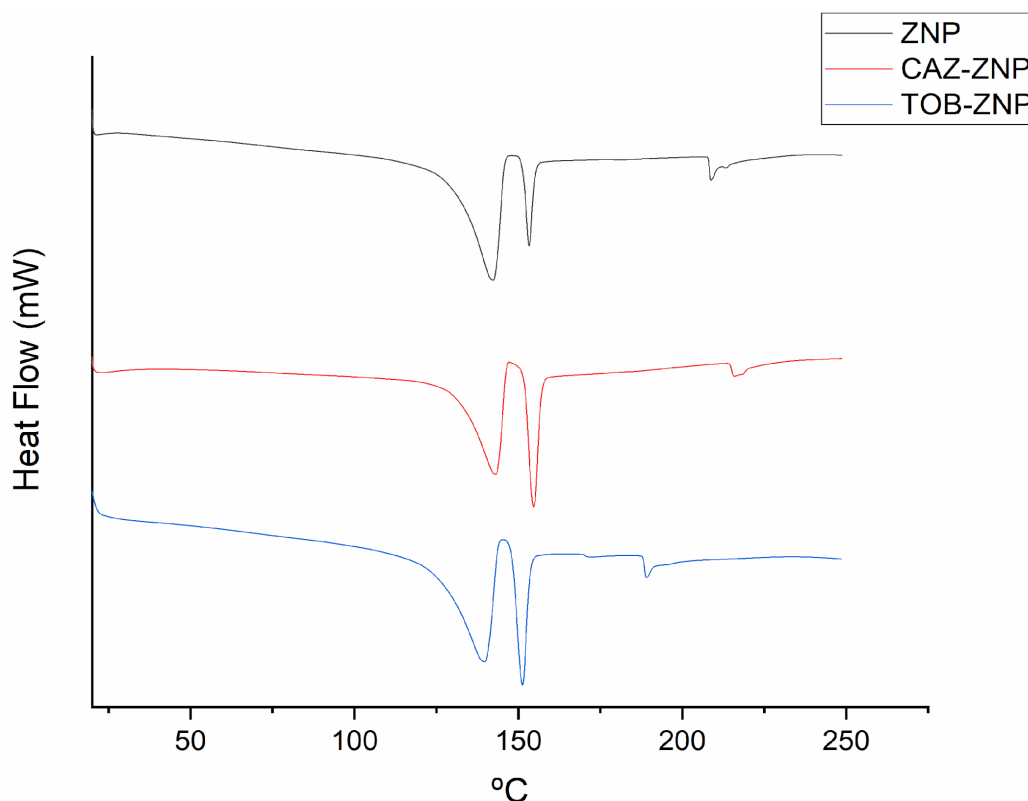


ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo tobramicina.

O termograma de DSC evidencia a presença de três picos endotérmicos em todas as nanopartículas de zeína desenvolvidas neste estudo (ZNP = 142,44 °C, 153,30 °C e 209,12 °C; CAZ-ZNP = 143,31 °C, 154,66 °C e 215,52 °C; e TOB-ZNP = 139,92 °C, 151,21 °C e 189,10 °C) (figura 5).

No termograma da zeína são observados dois picos endotérmicos na faixa de 150 e 180 °C (DA ROSA, 2020a), já a lisina apresentou dois picos endotérmicos em 74,1 e 259,3 °C (RODANTE; MARROSU, 1990; PIEL et al., 1997). CAZ tem um pico endotérmico característico em torno de 120 °C (CHANG; LEE; LIN, 2008), enquanto TOB tem três picos endotérmicos em 115,64 °C, 176,70 °C e 230 °C, e um pico exotérmico em 206,94 °C (ROSASCO, 2018).

Figura 5 – Termogramas de DSC das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP) e tobramicina (TOB-ZNP).



Fonte: O autor (2022).

ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo tobramicina.

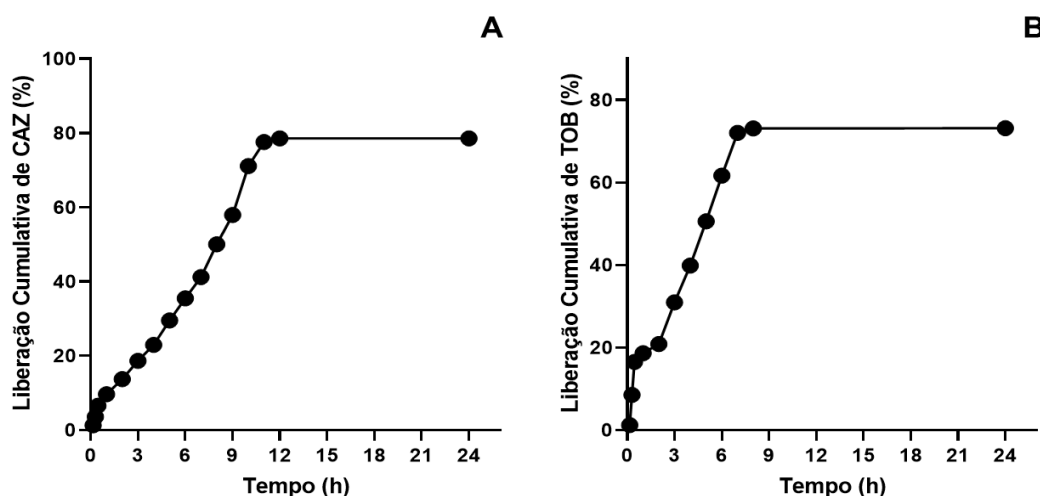
Como observado na figura 5, todas as amostras apresentam picos endotérmicos correspondentes a zeína, além do deslocamento do pico de lisina (259,3 °C) devido a complexação com o polímero de zeína. A presença dos picos característicos de CAZ e TOB não são evidenciados, indicando a encapsulação destas moléculas nas nanopartículas e a interação deles com a matriz polimérica.

Cinética de liberação *in vitro* de CAZ e TOB a partir das nanopartículas de zeína

Os resultados obtidos a partir da cinética de liberação de CAZ e TOB mostraram um efeito burst após 1 h com liberação de CAZ em torno de 10% (figura 6A), e de TOB em torno de 20% (Figura 6B). Após 12h, cerca de 80% da CAZ foi liberada e após 8h cerca de 75% da TOB havia sido liberada. Os resultados deste ensaio evidenciam que as nanopartículas de zeína liberam os fármacos de modo controlado por 24 h (figura 6).

Foi observada uma fase inicial com liberação relativamente rápida do fármaco, seguida por uma fase de liberação mais lenta. A liberação rápida dos fármacos na fase inicial, comumente, está relacionada à dissociação do fármaco adsorvido na superfície, enquanto a liberação mais lenta dos fármacos está associada, principalmente, à difusão do fármaco encapsulado no interior das nanopartículas (HEDAYATI CH et al., 2020).

Figura 6 – Perfil de liberação de ceftazidima (A) e tobramicina (B) a partir das nanopartículas em meio PBS por 24 h.



Fonte: O autor (2022).

As nanopartículas de zeína são nanocarreadores que encapsulam diferentes moléculas promovendo a liberação dos princípios ativos no período igual ou superior a 24h como visto no estudo de Shinde et al. (2020), Cui et al. (2021), e Martinez-Lopez et al. (2021). Sugere-se que os diferentes perfis de liberação apresentados pela CAZ e pela TOB são influenciados pela estrutura da matriz e estão relacionados às propriedades do polímero, aos mecanismos de controle da liberação, a natureza química e as propriedades dos constituintes da formulação (LOPES, LOBO, COSTA, 2005).

Estabilidade físico-química das nanopartículas

Foram avaliados o Ø, PDI, ζ , o pH e doseamento dos fármacos durante 6 meses de CAZ-ZNP (tabela 2) e TOB-ZNP (tabela 3) liofilizadas.

Tabela 2 – Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo ceftazidima armazenadas a 4 °C.

	MESES					
	1	2	3	4	5	6
Ø (nm)	193,6	195,9	194,2	200,2	203,1	199,6
PDI	0,042	0,067	0,053	0,049	0,038	0,075
ζ (mV)	-31,7 ± 0,2	-32,9 ± 0,9	-34,4 ± 1,2	-33,2 ± 0,8	-35,0 ± 1,1	-32,3 ± 0,6
pH	7,1	7,1	7,1	7,2	7,2	7,2
Doseamento de fármaco (%)	99,35 ± 0,2	99,4 ± 0,1	99,21 ± 0,6	99,82 ± 0,9	99,74 ± 0,8	99,81 ± 0,7

Fonte: O autor (2022).

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta.

Tabela 3 – Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo tobramicina armazenadas a 4 °C.

	MESES					
	1	2	3	4	5	6
Ø (nm)	193,2	192,1	193,7	192,4	196,2	200,1
PDI	0,055	0,072	0,088	0,062	0,091	0,089
ζ (mV)	-34,2 ± 0,9	-36,7 ± 0,4	-36,1 ± 0,8	-35,9 ± 0,9	-37,3 ± 1,2	-37,6 ± 1,1
pH	7,1	7,1	7,2	7,2	7,1	7,3
Doseamento de fármaco (%)	99,29 ± 0,7	99,89 ± 0,9	99,69 ± 0,6	99,79 ± 0,8	99,59 ± 0,8	99,49 ± 0,3

Fonte: O autor (2022).

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta.

Os resultados nas tabelas apontam que o tamanho de partícula, o potencial

zeta, o pH e doseamento não apresentaram mudanças significativas durante os 180 dias de armazenamento, indicando que a liofilização e as condições de armazenamento não alteram a estabilidade das CAZ-ZNP e TOB-ZNP. Conforme mostrado nas tabelas 2, e 3, o Ø das ZNP, CAZ-ZNP e TOB-ZNP variou entre 193 e 203 nm, o PDI foi mantido <1, o ζ variou entre -31 e -37 mV, o pH entre 7,1 e 7,4 e o doseamento permaneceu em torno de 99% sem mudanças significativas. Os resultados encontrados corroboram com vários estudos da literatura que observaram a estabilidade físico-química durante meses sem grandes variações no Ø, no PDI, no ζ , no pH e mantiveram o doseamento do fármaco nas nanopartículas de zeína, como os estudos de Zhang et al. (2019) que encapsularam α -tocoferol e resveratrol em nanopartículas de zeína, de Melo et al. (2019) que desenvolveram nanopartículas de zeína contendo óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e *Pimenta racemosa*, de da Rosa et al. (2020b) que prepararam nanopartículas de zeína encapsulando óleos essenciais de *Origanum vulgare* Linneus e *Thymus vulgaris*, e de Araujo et al. (2021) que sintetizaram nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico.

Citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada em hepatócitos HepG2 e fibroblastos L929 (tabela 4). CAZ, TOB, CAZ-ZNP, TOB-ZNP e ZNP não apresentaram efeito citotóxico frente aos hepatócitos HepG2 nas concentrações testadas ($CC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$). CAZ, TOB e CAZ-ZNP apresentaram CC_{50} de 2,68 $\mu\text{g/mL}$, 7,99 $\mu\text{g/mL}$ e 25,13 $\mu\text{g/mL}$ para os fibroblastos L929, respectivamente. Enquanto TOB-ZNP e ZNP não apresentaram efeito citotóxico para mesma linhagem nas concentrações testadas ($CC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$).

Tabela 4 – Citotoxicidade de ZNP, CAZ-ZNP e TOB-ZNP em hepatócitos HepG2 e fibroblastos L929.

	$CC_{50} (\mu\text{g/mL})$	
	Hepatócitos (HepG2)	Fibroblastos (L929)
CAZ	>50	2,68
TOB	>50	7,99
ZNP	>50	>50
CAZ-ZNP	>50	25,13
TOB-ZNP	>50	>50

Fonte: O autor (2022).

CC_{50} : concentração citotóxica para 50% da cultura; ZNP: nanopartículas de zeína; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina.

A encapsulação de CAZ e TOB reduziu a citotoxicidade desses fármacos de 9,5 a mais de 25 vezes frente à fibroblastos L929. O potencial para reduzir ou eliminar a citotoxicidade após a encapsulação de princípios ativos em nanopartículas de zeína também foi observado nos estudos de Yuan et al. (2019) e de Li et al. (2020) frente às células epiteliais normais do cólon (NCM460), de Yuan et al. (2020) frente às células epiteliais renais humanas 293, e de Nunes et al. (2020) frente às células de linhagem colorretal Caco-2 e HT29-MTX.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Avaliação da atividade antibacteriana das formulações

A atividade de CAZ, a CIM variou entre 0,195 e 50 µg/mL, e a CBM variou entre 1,56 e > 50 µg/mL. Para TOB, a CIM variou de 0,195 a 12,5 µg/mL, e a CBM de 3,12 a 25 µg/mL. Para CAZ-ZNP, a CIM variou de 0,097 a 6,25 µg/mL, e a CBM de 0,39 a 25 µg/mL. Para TOB-ZNP, a CIM variou de 0,39 a 3,12 µg/mL, e a CBM de 1,56 a 12,5 µg/mL. Para CAZ-ZNP + TOB-ZNP, a CIM variou de 0,195 a 3,12 µg/mL, e a CBM de 0,781 a 12,5 µg/mL (tabela 5). As ZNP não apresentaram atividade antibacteriana frente a nenhuma cepa testada (>50 µg/mL).

Tabela 5 – Atividade antibacteriana da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Escherichia coli</i> NCTC 13846		<i>Escherichia coli</i> H100407		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL											
CAZ	0,781	25	0,195	1,56	0,39	6,25	25	> 50	0,195	12,5	50	> 50
TOB	0,39	12,5	0,195	3,12	0,39	6,25	12,5	25	0,195	12,5	3,12	25
CAZ-ZNP	0,39	6,25	0,097	0,39	0,39	3,12	6,25	25	0,195	6,25	6,25	12,5
TOB-ZNP	0,39	3,12	0,39	1,56	0,39	1,56	3,12	6,25	0,195	6,25	1,56	12,5
CAZ-ZNP +TOB-ZNP	0,195	6,25	0,097	0,781	0,195	0,781	1,56	6,25	0,781	3,12	1,56	6,25

Fonte: O autor (2022).

ATCC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina.

Alguns estudos foram realizados para a avaliação da atividade antibacteriana de CAZ encapsulada em nanocarreadores. Farzampanah et al. (2017) encapsularam CAZ em lipossomas e testaram sua atividade frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. O nanocarreador contendo CAZ apresentou atividade bacteriostática e bactericida (CIM = CBM = 0,5 µg/mL) superior ao fármaco livre (CIM = CBM = 2 µg/mL). Silva et al. (2017) encapsularam CAZ em nanopartículas de quitosana, testaram sua atividade frente a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027 e determinaram a CIM de 1,56 µg/mL para CAZ e para as NPs de quitosana contendo CAZ.

Assim, CAZ-ZNP frente a *P. aeruginosa* são nanocarreadores mais promissores para a atividade antibacteriana comparado a estudos já relatados na literatura. Vale salientar que a encapsulação de CAZ em nanopartículas de zeína, em lipossomas e em nanopartículas de quitosana, como nos estudos de Farzampanah et al. (2017) e Silva et al. (2017), mantiveram ou potencializaram a atividade antibacteriana de CAZ. Portanto, a encapsulação da CAZ é de extrema relevância, uma vez que ela é utilizada na clínica, isoladamente ou em associação com outros antibióticos, para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas, especialmente bactérias resistentes (RIBEIRO; SCHMIDT, 2017; SORIANO et al., 2021).

Outros estudos foram realizados avaliando a atividade antibacteriana de TOB encapsulado em nanocarreadores. Sans-Serramitjana et al. (2017) avaliaram a atividade de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. TOB apresentou CIM de 0,51 µg/mL, SLN-SDS-TOB apresentou CIM de 0,25 µg/mL e NLC-TOB apresentou CIM ≤0,0625 µg/mL. Hill et al. (2019) avaliaram a atividade de TOB encapsulada em nanopartículas de PLGA frente a *P. aeruginosa*, apresentando CIM para TOB livre e nanoencapsulada de 1,25 µg/mL. Analisando os estudos de Sans-Serramitjana et al. (2017) e Hill et al. (2019), torna-se evidente que a CIM de TOB reduziu ou manteve-se igual após a encapsulação, como corroborado em nossos resultados.

Assim, CAZ-ZNP frente a *P. aeruginosa* são nanocarreadores mais promissores para a atividade antibacteriana comparado a estudos já relatados na literatura. Vale salientar que a encapsulação de CAZ em nanopartículas de zeína, em lipossomas e em nanopartículas de quitosana, como nos estudos de Farzampanah et al. (2017) e Silva et al. (2017), mantiveram ou potencializaram a atividade antibacteriana de CAZ. Portanto, a encapsulação da CAZ é de extrema relevância,

uma vez que ela é utilizada na clínica, isoladamente ou em associação com outros antibióticos, para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas, especialmente bactérias resistentes (RIBEIRO; SCHMIDT, 2017; SORIANO et al., 2021).

Outros estudos foram realizados avaliando a atividade antibacteriana de TOB encapsulado em nanocarreadores. Sans-Serramitjana et al. (2017) avaliaram a atividade de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) e nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. TOB apresentou CIM de 0,51 µg/mL, SLN-SDS-TOB apresentou CIM de 0,25 µg/mL e NLC-TOB apresentou CIM ≤0,0625 µg/mL. Hill et al. (2019) avaliaram a atividade de TOB encapsulada em nanopartículas de PLGA frente a *P. aeruginosa*, apresentando CIM para TOB livre e nanoencapsulada de 1,25 µg/mL. Analisando os estudos de Sans-Serramitjana et al. (2017) e Hill et al. (2019), torna-se evidente que a CIM de TOB reduziu ou manteve-se igual após a encapsulação, como corroborado em nossos resultados.

A encapsulação de TOB torna-se importante, pois a sua encapsulação potencializa a propriedade antibacteriana, permite a administração pela via oral e pode reduzir a toxicidade deste fármaco, tornando-o uma opção para o tratamento de infecções causadas por BGNs, especialmente, os BGNs resistentes (RATJEN; BROCKHAUS; ANGYALOSI, 2009; GU et al., 2020).

Foi observado que a combinação de CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentou maior atividade antibacteriana quando comparada ao tratamento com as CAZ-ZNP e TOB-ZNP isoladas. Sabe-se que a terapia combinada de antibióticos potencializa a propriedade antibacteriana, especialmente, quando a combinação associa um β-lactâmicos (CAZ) e aminoglicosídeos (TOB), pois esses medicamentos são de classes diferentes, e, portanto, apresentam mecanismos de ação distintos (SHRIVASTAVA; DUNDAR; OTKUN, 2016; BASSETTI et al., 2019).

Além das vantagens que as nanopartículas de zeína apresentam como nanocarreadores que potencializam a atividade antibacteriana dos fármacos, elas podem ser facilmente manipuladas para obtenção de partículas com características físico-químicas específicas para a aplicação desejada. O caráter hidrofóbico da proteína facilita a preparação e estabilidade das nanopartículas sem a necessidade de processos de estabilização ou reticulação. Além disso, as ZNP têm menor alergenicidade, digestão mais lenta do que outras proteínas e podem ser administradas por várias vias de administração (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO,

2017; PASCOLI; LIMA; FRACETO, 2018; REBOREDO et al., 2022).

Assim, a encapsulação de CAZ ou TOB em nanopartículas de zeína é uma alternativa terapêutica promissora, pois ocorre a potencialização da atividade antibacteriana, bem como a redução da toxicidade dos fármacos e a viabilização da administração pelas vias oral, nasal, transdérmica e intravenosa para o tratamento de infecções intestinais, respiratórias, de pele e sistêmicas causadas por cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (BOTHRA; FALCONE; PATERSON, 2016; JONES et al., 2019; GU et al., 2020).

Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

Para a realização do ensaio de atividade antibiofilme das formulações foram escolhidas as cepas ATCCs com produção moderada e forte de biofilme (tabela 6).

E. coli é uma das principais causas de doenças diarreicas em áreas de alta vulnerabilidade social causando níveis elevados de mortalidade e morbidade em crianças mais velhas, adolescentes e adultos por todo o mundo (FLECKENSTEIN, KUHLMANN, 2019). Algumas cepas estão associadas ao desenvolvimento do câncer colorretal (CCR) devido a produção da colobactina, um composto policetídeo-peptídeo que alquila o DNA nos resíduos de adenina e induz quebras de fita dupla, provocando diretamente mutações oncogênicas (KAWANISHI et al., 2019; PLEGUEZUELOS-MANZANO et al., 2020).

Tabela 6 – Classificação das cepas bacterianas quanto a produção de biofilme.

CEPA BACTERIANA	CLASSIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Forte
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Fraca
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13846	Fraca
<i>Escherichia coli</i> H100407	Moderada
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Moderada
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Fraca

Fonte: O autor (2022).

ATCC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures.

P. aeruginosa é um patógeno oportunista causador de diversas infecções nosocomiais, particularmente, em pacientes imunocomprometidos ou pacientes com doenças pulmonares crônicas, como doença pulmonar obstrutiva crônica ou fibrose

cística, infecções em feridas e infecções no sistema digestório (HEIMESAAT et al. 2019; PETTIGREW et al. 2019).

K. pneumoniae é uma bactéria que comumente está associada às infecções do trato urinário, da corrente sanguínea e do trato respiratório superior, contudo, com o tratamento dessas infecções surgem cepas resistentes, principalmente, em pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos (KAUR, VADIVELU, CHANDRAMATHI, 2018; GORRIE et al., 2018).

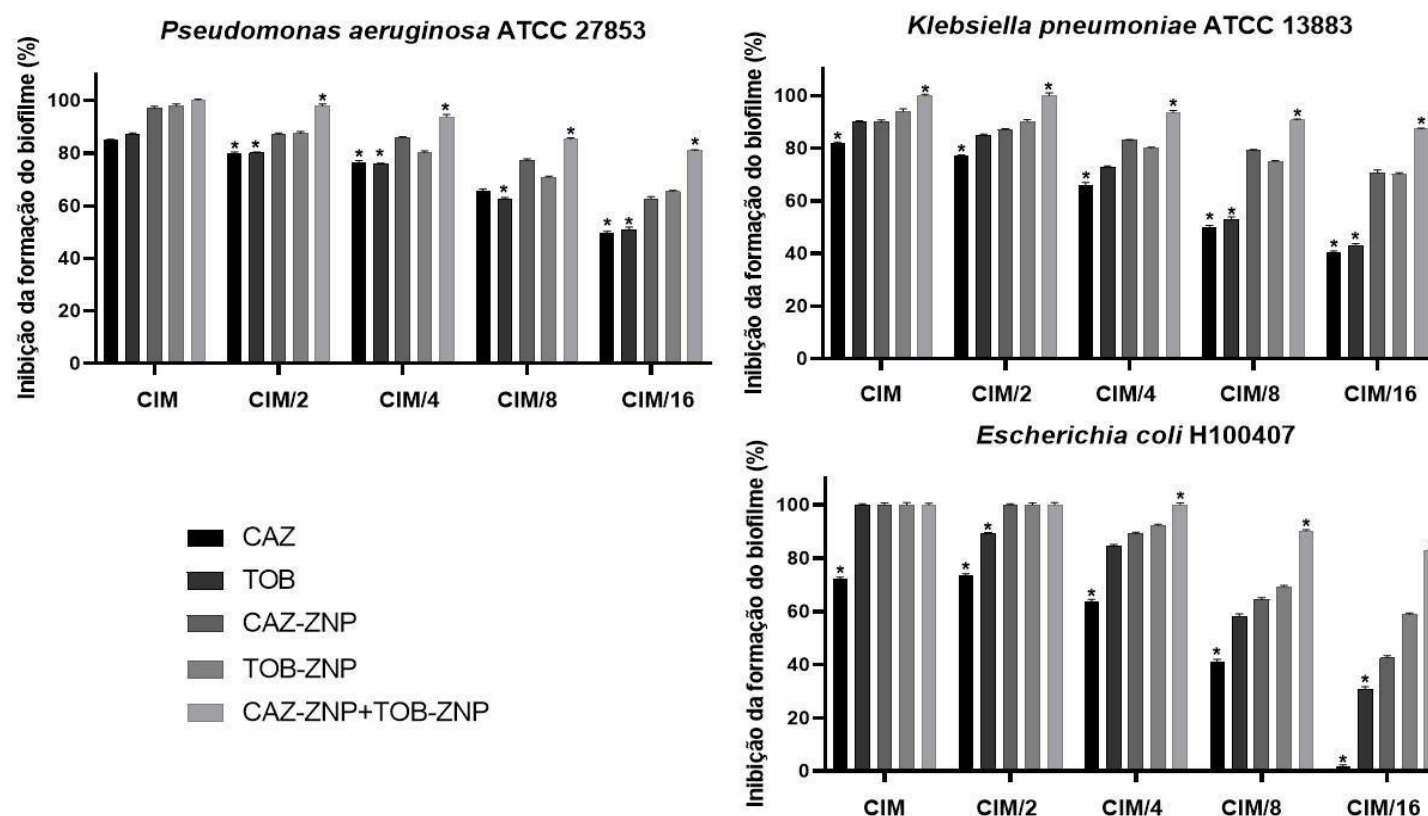
Uma vez que as infecções causadas por *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* tornam-se mais graves quando essas cepas são produtoras de biofilme, é necessário um tratamento com potencial para eliminar esses microrganismos, inibir a formação de biofilme e erradicar os biofilmes (PIPERAKI et al., 2017; OLIVARES et al., 2020).

Avaliação da inibição da formação do biofilme

A inibição da formação do biofilme por CAZ, TOB, CAZ-ZNP, TOB-ZNP e CAZ-ZNP+TOB-ZNP foi dose dependente, com maior inibição para CIM e menor inibição para CIM/16 frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *E. coli* H100407. Foi observada uma inibição da formação do biofilme entre 2% e 85% para CAZ, entre 30% e 100% para TOB, entre 42% e 100% para CAZ-ZNP, entre 59% e 100% para TOB-ZNP e entre 80% e 100% para CAZ-ZNP + TOB-ZNP (figura 7). CAZ e TOB encapsuladas nas nanopartículas de zeína apresentaram CIMB menores quando comparados aos fármacos livres, além disso a associação de CAZ-ZNP e TOB-ZNP exibiram valores de CIMB entre 0,012 e 0,097 µg/mL (tabela 7). Como esperado, ZNP não inibiu a formação de biofilme nas concentrações testadas para nenhuma das cepas utilizadas nesse estudo.

Nesse estudo foi observado o potencial de inibição da formação de biofilme das formulações encapsulando CAZ e TOB, especialmente, quando CAZ-ZNP e TOB-ZNP estiveram no tratamento combinado. Além disso, CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentaram o potencial antibiofilme maior que CAZ e TOB não encapsuladas.

Figura 7 – Inibição da formação do biofilme de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407 após o tratamento a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.



Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre os tratamentos na mesma concentração ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima da inibição de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.

	CIMB (µg/mL)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Escherichia coli</i> H100407
CAZ	0,195	0,097	12,5
TOB	0,097	0,048	3,12
CAZ-ZNP	0,048	0,012	1,56
TOB-ZNP	0,048	0,012	0,78
CAZ-ZNP + TOB-ZNP	0,012	0,048	0,097

Fonte: O autor (2022).

CIMB: Concentração Inibitória Mínima; ATCC: American Type Culture Collection; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina.

Na CIM/16, a atividade de inibição do biofilme de CAZ-ZNP e TOB-ZNP foi 2 vezes maior que CAZ e TOB para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407. Além disso, a associação de CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentou potencial antibiofilme entre 2 e 8 vezes maior que CAZ e TOB nas CIM/8 e CIM/16.

A adesão bacteriana, a regulação do *Quorum sensing* (QS) e a produção de EPS estão associados aos eventos iniciais do processo de formação de biofilme, de modo que alterações nesses processos impedem a sua formação. Por isso, a inibição de qualquer um desses mecanismos pode ser o alvo das formulações propostas com atividade antibiofilme (DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018; HEDAYATI CH et al., 2020; FENG et al., 2021).

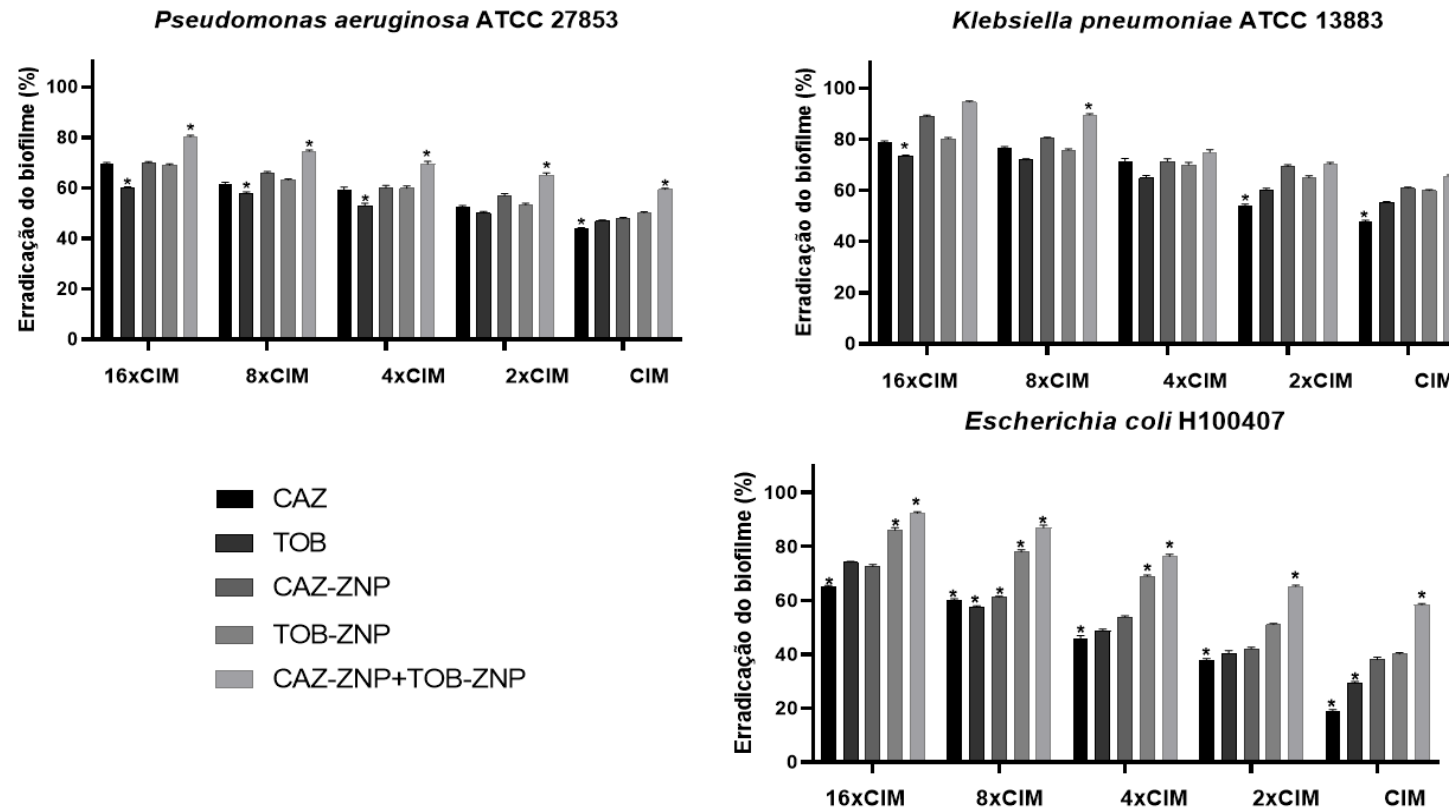
A atividade de inibição da formação do biofilme desempenhada pelas formulações desenvolvidas neste estudo também se dá pela ação de CAZ e TOB encapsuladas, pois esses fármacos apresentam potencial antibiofilme, particularmente, pela alteração de genes envolvidos na formação, desenvolvimento, maturação e estabilização dos biofilmes (OTANI et al., 2018; HEDAYATI CH et al., 2020; SUN et al., 2020; FENG et al., 2021). Contudo, as características físico-químicas das nanopartículas podem contribuir para potencializar essa ação, uma vez que CAZ-ZNP, TOB-ZNP e as bactérias possuem carga de superfície negativa, a inibição da formação de biofilme após exposição das bactérias as nanopartículas, pode ter sido influenciada pelas forças de repulsão entre os nanocarreadores desenvolvidos e esses bacilos Gram-negativos (DOS SANTOS-RAMOS et al., 2018; HU et al., 2019).

Avaliação da erradicação do biofilme

A erradicação do biofilme por CAZ, TOB, CAZ-ZNP, TOB-ZNP e CAZ-ZNP+TOB-ZNP também foi dose dependente, com maior inibição para 16×CIM e menor inibição para CIM frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407. Foi observada uma erradicação do biofilme entre 19% e 79% para CAZ, entre 30% e 74% para TOB, entre 38% e 89% para CAZ-ZNP, entre 40% e 86% para TOB-ZNP e entre 59% e 95% para CAZ-ZNP + TOB-ZNP (figura 8). CAZ e TOB encapsuladas nas nanopartículas apresentaram CEMB menores quando comparados aos fármacos livres, além disso a associação de CAZ-ZNP e TOB-ZNP exibiram valores de CEMB entre 6,24 e 1,56 µg/mL (tabela 8). Como esperado, ZNP não apresentou atividade antibiofilme nas concentrações testadas para nenhuma das cepas utilizadas nesse estudo.

Sans-Serramitjana et al. (2017) avaliaram a atividade de TOB encapsulada em NLC e SLN frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. A CEMB para TOB foi de 8 µg/mL, para SLN-SDS-TOB foi de 4 µg/mL e para NLC-TOB foi de 2 µg/mL frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. Al-Nemrawi et al. (2018) encapsularam TOB em nanopartículas de PLGA revestidas com quitosana de baixo peso molecular (TOB-LMWC-PLGA) frente a PAO1. A CEMB para TOB e TOB-LMWC-PLGA foi de 7,8 µg/mL e 15,6 µg/mL, respectivamente. Assim, torna-se evidente que a encapsulação de TOB potencializa a erradicação do biofilme de *P. aeruginosa*.

Figura 8 – Erradicação do biofilme das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Escherichia coli* H100407 após o tratamento a ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.



Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre os tratamentos na mesma concentração ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Concentração de erradicação mínima de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína.

	CEMB (µg/mL)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Escherichia coli</i> H100407
CAZ	>12,5	0,78	>400
TOB	>6,24	1,56	200
CAZ-ZNP	6,24	0,78	100
TOB-ZNP	6,24	0,78	25
CAZ-ZNP + TOB-ZNP	1,56	1,56	6,24

Fonte: O autor (2022).

CEMB: Concentração Inibitória Mínima; ATCC: American Type Culture Collection; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a ceftazidima; TOB-ZNP: nanopartículas de zeína contendo a tobramicina.

A potencialização da atividade antibiofilme pela encapsulação em nanopartículas já está descrita na literatura, pois os nanocarreadores podem penetrar na matriz de exopolissacarídeo dos biofilmes e liberar os fármacos em seu interior. Essa penetração pode ser influenciada pelo tamanho das nanopartículas, pois para um nanocarreador penetrar e desenvolver seu efeito antibiofilme, as nanopartículas devem apresentar tamanho de até 500 nm (LIU et al., 2019; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2020). No presente estudo, o tamanho das nanopartículas variou entre 180 nm e

200 nm, desta forma, CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentam tamanho ideal para a entrega dos fármacos no interior do biofilme.

Como observado, CAZ e TOB encapsulados nas nanopartículas de zeína apresentam um maior potencial antibiofilme comparado aos fármacos livres, uma vez que as nanopartículas aumentam a penetração de agentes antimicrobianos, permitindo a entrega direcionada na matriz do biofilme, causando a ruptura da matriz e o aumento da suscetibilidade do biofilme remanescente à terapia antimicrobiana (FULAZ et al., 2019). Nesse sentido, desenvolver estratégias terapêuticas de base nanotecnológica para combater infecções causadas por bactérias produtoras de biofilme é fundamental, uma vez que o biofilme representa um dos fatores de virulência associados à patogênese de muitas infecções bacterianas, estando associado a disseminação desses patógenos em diferentes ambientes nosocomiais e/ou na comunidade (HUGHES, WEBBER, 2017; VERDEROSA, TOTSIKA, FAIRFULL-SMITH, 2019; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2020).

Conclusão

As nanopartículas de zeína contendo CAZ e TOB foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação e apresentaram características físico-químicas ideais para teste *in vivo*, bem como para administração pelas vias intradérmica, oral, nasal e intravenosa. CAZ-ZNP e TOB-ZNP foram caracterizadas por MEV, FTIR, DRX, DSC e TGA, apresentando morfologia esférica e lisa, presença de possíveis interações entres componentes da formulação, a encapsulação dos antibióticos e a estabilidade térmica das nanopartículas. CAZ-ZNP e TOB-ZNP apresentaram liberação controlada por 24h e reduziram a citotoxicidade dos fármacos nas linhagens celulares de hepatócitos HepG2 e fibroblastos L929. CAZ-ZNP, TOB-ZNP e CAZ-ZNP+TOB-ZNP apresentaram atividade antibacteriana *in vitro*, além de potencializar a inibição da formação do biofilme e a erradicação de biofilme produzidos pelos BGNs. Assim, CAZ-ZNP e TOB-ZNP isoladamente ou em terapia combinada são uma alternativa terapêutica promissora para infecções causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* produtoras de biofilme.

Financiamento

O presente projeto foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia do

Brasil (MCTI, SisNANO/LARNano-UFPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq nº 40228/2013-2 e CNPq nº 426065/2018-2].

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE) (Recife, PE, Brasil) pelo suporte durante a execução de todo o projeto. LAAC agradece ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Referências

- ALBANO, Mariana et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial pathogenesis*, v. 126, p. 231-238, 2019.
- AL-NEMRAWI, Nusaiba K. et al. Low molecular weight chitosan-coated PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of tobramycin for cystic fibrosis. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 28, 2018.
- ASWATHY, R. G. et al. Biocompatible fluorescent zein nanoparticles for simultaneous bioimaging and drug delivery application. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 025006, 2012.
- BASSETTI, M. et al. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in medicine**, v. 6, n. 74, p. 1-10, 2019.
- biofilm infections. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 14, p. 2237-2246, 2017.
- CAVALCANTI, Iago Dillion Lima et al. Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, p. 102698, 2021.
- CHANG, S. C.; LEE, M. J.; LIN, H. Preparation of nano-and micrometric ceftazidime particles with supercritical anti-solvent technique. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 38, p. 14835-14842, 2008.
- CHEN, Shuai et al. Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. **Carbohydrate polymers**, v. 236, p. 116090, 2020.
- CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, p. 1-13, 2016.
- CLEMENTINO, Adryana Rocha et al. Structure and fate of nanoparticles designed for

the nasal delivery of poorly soluble drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 8, p. 3132-3146, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27).

Wayne, PA, 2021.

coli infections. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 3, p. 1-9, 2019.

CUI, Bo et al. Emamectin benzoate-loaded zein nanoparticles produced by antisolvent precipitation method. **Polymer Testing**, v. 94, p. 107020, 2021.

DA ROSA, C. G. et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 481, n. 1, p. 337-344, 2015.

DA ROSA, C. G. et al. Development of poly (ethylene oxide) bioactive nanocomposite films functionalized with zein nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 586, n. 1, p. 124268, 2020a.

DA ROSA, Cleonice Goncalves et al. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p. 105339, 2020b.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DASH, Alekha K.; SURYANARAYANAN, Raj. Solid-state properties of tobramycin. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 9, p. 1159-1165, 1991.

DE ARAUJO, Jennifer Thayanne Cavalcante et al. Development of anacardic acid-loaded zein nanoparticles: Physical chemical characterization, stability and antimicrobial improvement. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, p. 115808, 2021.

DE LEO, L. et al. Fasting increases tobramycin oral absorption in mice.

Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 54, n. 4, p. 1644-1646, 2010.

DE MELO, Ana Paula Zapelini et al. Syntesis and characterization of zein nanoparticles loaded with essential oil of *Ocimum gratissimum* and *Pimenta racemosa*. **Materials Research Express**, v. 6, n. 9, p. 095084, 2019.

DOS SANTOS-RAMOS, M. A. D. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems FALCONE, M.; PATERSON, D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2713-2722, 2016

FARZAMPANAH, L. et al. Preparation and Investigation of In Vitro Effect of Liposomal Ceftazidime on the Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Advanced Studies in Biology**, v. 9, n. 3, p. 105-111, 2017.

FENG, S. et al. Effect of adjusting pH and chondroitin sulfate on the formation of curcumin-zein nanoparticles: Synthesis, characterization and morphology.

Carbohydrate Polymers, v. 250, n. 1, p. 1-10, 2020.

FENG, Wei et al. Effect of sub-minimal inhibitory concentration ceftazidime on the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104748, 2021.

FILON, Francesca Larese et al. Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 310-322, 2015.

FLECKENSTEIN, James M.; KUHLMANN, F. Matthew. Enterotoxigenic *Escherichia* for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1179, 2018.

FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2297-2314, 2016.

FULAZ, Stephanie et al. Nanoparticle–biofilm interactions: the role of the EPS matrix. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 11, p. 915-926, 2019.

GORRIE, Claire L. et al. Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital. **Clinical infectious diseases**, v. 67, n. 2, p. 161-170, 2018.

HEDAYATI CH, Mojtaba et al. Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 6, p. 966-980, 2021.

HEIMESAAT, Markus M. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* accelerate intestinal, extra-intestinal, and systemic inflammatory responses in human microbiota-associated mice with subacute ileitis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 49, 2019.

HILL, Marcus et al. Formulation of antimicrobial tobramycin loaded PLGA nanoparticles via complexation with AOT. **Journal of functional biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 26, 2019.

HU, Chen et al. Nanoparticles for the treatment of oral biofilms: Current state, mechanisms, influencing factors, and prospects. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 24, p. 1901301, 2019.

HUGHES, Gareth; WEBBER, Mark A. Novel approaches to the treatment of bacterial IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Nanomedicine**, v. 12, n. 11, p. 1209–1211, 2017.

JONES, T. E. *et al.* Ceftazidime stability and pyridine toxicity during continuous iv infusion. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 76, n. 4, p. 200-205, 2019.

KAUR, Christina Parvinder; VADIVELU, Jamuna; CHANDRAMATHI, Samudi. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. **Journal of digestive diseases**, v. 19, n. 5, p. 262-271, 2018.

KAWANISHI, Masanobu et al. In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. **The Journal of toxicological sciences**, v. 44, n. 12, p. 871-876, 2019.

KOFTERIDIS, D. P. *et al.* Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2020.

LEENA, M. Maria et al. Co-delivery of curcumin and resveratrol through electrosprayed core-shell nanoparticles in 3D printed hydrogel. **Food Hydrocolloids**, v. 124, p. 107200, 2022.

LI, H. *et al.* Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein. **Food Hydrocolloids**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2020.

LIANG, J. et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 19-24, 2017.

LIU, Yong et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 428-446, 2019.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MACVANE, S. H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. **Journal of intensive care medicine**, v. 32, n. 1, p. 25-

37, 2017.

MALAEKEH-NIKOUEI, Bizhan et al. The role of nanotechnology in combating biofilm-based antibiotic resistance. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p.101880, 2020.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, Ana L. et al. Zein-based nanocarriers for the oral delivery of insulin. In vivo evaluation in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 11, n. 2, p. 647-658, 2021.

MASOUD, M. S. et al. Synthesis, spectroscopic, biological activity and thermal characterization of ceftazidime with transition metals. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 193, n. 1, p. 458-466, 2018.

MICHELON, H. et al. Efficacy and safety of subcutaneous administration of ceftazidime as a salvage therapy in geriatrics: a case report. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2019.

MISTRY, Alpesh et al. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. **Journal of drug targeting**, v. 17, n. 7, p. 543-552, 2009.

MORENO, L. C. G. I. et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International journal of pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.

MORENO-SASTRE, M. et al. Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. **International journal of pharmaceutics**, v. 498, n. 1-2, p. 263-273, 2016.

NUNES, Rute et al. Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. **Drug delivery and translational research**, v. 10, n. 3, p. 826-837, 2020.

OLIVARES, Elodie et al. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2894, 2020.

OSÓRIO, L. R. et al. Evaluation of physico-chemical properties and antimicrobial synergic effect of ceftazidime-modified chitosan. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1629-1636, 2018.

OTANI, Satoshi et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of infection and**

chemotherapy, v. 24, n. 6, p. 428-433, 2018.

PAKHARUKOVA, N. et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. 5558-5563, 2018.

PARK, C.; PARK, D.; KIM, B. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food science and biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1725-1733, 2015.

PASCOLI, M; LIMA, R; FRACETO, L. F. Zein Nanoparticles and Strategies to Improve Colloidal Stability: A Mini-Review. **Front Chem.** v. 6, n. 6, p.1-5, 2018.

PATERE, S. et al. Influence of manufacturing process variables on the properties of ophthalmic ointments of tobramycin. **Pharmaceutical research**, v. 35, n. 9, p. 1-16, 2018.

PEREIRA, L. A. et al. Biological properties of chitosan derivatives associated with the ceftazidime drug. **Carbohydrate polymers**, v. 222, n. 1, p. 115002, 2019.

PETTIGREW, Melinda M. et al. Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 4, p. 604-613, 2019.

PIEL, Géraldine et al. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide–L-lysine–cyclodextrin complexes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 4, p. 475-480, 1997.

PIPERAKI, E. T. et al. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

PLEGUEZUELOS-MANZANO, Cayetano et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269-273, 2020.

RATJEN, F.; BROCKHAUS, F.; ANGYALOSI, G. Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a review. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, n. 6, p. 361-369, 2009.

REBOREDO, C. et al. Preparation and evaluation of PEG-coated zein nanoparticles for oral drug delivery purposes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, n. 1, p. 1-9, 2021.

REBOREDO, Cristian et al. Zein-Based Nanoparticles as Oral Carriers for Insulin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 39, 2022.

- RIBEIRO, A. R.; SCHMIDT, T. C. Determination of acid dissociation constants (pKa) of cephalosporin antibiotics: Computational and experimental approaches. **Chemosphere**, v. 169, n. 1, p. 524-533, 2017.
- RODANTE, F.; MARROSU, G. Thermal analysis of some α -amino acids using simultaneous TG-DSC apparatus. The use of dynamic thermogravimetry to study the chemical kinetics of solid state decomposition. **Thermochimica acta**, v. 171, p. 15-29, 1990.
- ROSASCO, M. A. *et al.* Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1929-1941, 2018.
- ROZENBERG, M.; SHOHAM, G. FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. **Biophysical chemistry**, v. 125, n. 1, p. 166-171, 2007.
- SÁNCHEZ-JUÁREZ, C. *et al.* Study of the properties and colloidal stability for the technological application of zein-based nanospheres. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 2, p.715-728, 2019.
- SANS-SERRAMITJANA, E. *et al.* Free and nanoencapsulated tobramycin: effects on planktonic and biofilm forms of *Pseudomonas*. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 35, 2017.
- SELVAKANNAN, P. R. *et al.* Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. **Langmuir**, v. 19, n. 8, p. 3545-3549, 2003.
- SHINDE, Priyanka *et al.* Physico-chemical characterization of carvacrol loaded zein nanoparticles for enhanced anticancer activity and investigation of molecular interactions between them by molecular docking. **International Journal of**
- SHRIVASTAVA, S. M.; SHUKLA, S. K.; CHAUDHARY, M. Minimum Inhibitory Concentration and Time Kill Curve Studies of Tobracef, A Fixed Dose Combination of Ceftazidime and Tobramycin. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 6, n. 1, p. 325-330, 2016.
- SILVA, Mariana M. *et al.* Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery
- SORIANO, Alex *et al.* Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Serious Gram-Negative Infections with Limited Treatment Options: A Systematic Literature Review. **Infectious diseases and therapy**, p. 1-46, 2021.
- STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- SUN, F. *et al.* Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia*

coli biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole.

Journal of Chemotherapy, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2020.

system for ocular administration. **Marine drugs**, v. 15, n. 12, p. 370, 2017.

TORRES, Ieda Maria Sapateiro et al. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian journal of microbiology**, v. 43, n. 3, p. 984-992, 2012.

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

VERDEROSA, A. D et al. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 824, 2019.

WIJESOORIYA, Chamari et al. Optimization of liposomal encapsulation for ceftazidime for developing a potential eye drop formulation. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 73, 2013.

YE, Tiantian et al. Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of pharmaceutics**, v. 552, n. 1-2, p. 130-138, 2018.

YUAN, Yongkai et al. Fabrication and characterization of zein nanoparticles by dextran sulfate coating as vehicles for delivery of curcumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 151, p. 1074-1083, 2020.

YUAN, Yongkai et al. Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 30-39, 2019.

ZHANG, Feng et al. Co-encapsulation of α -tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *Journal of Food Engineering*, v. 247, p. 9-18, 2019.

ZHANG, Huaiying et al. Development of curcumin-loaded zein nanoparticles for transport across the blood–brain barrier and inhibition of glioblastoma cell growth. **Biomaterials Science**, 2021.

ZHANG, Y. et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, n. 1, p. 269–275, 2014.

5 ARTIGO 3

Nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima/tobramicina frente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos e produtoras de biofilme

Luís André de Almeida Campos ^{a,b}, Azael Francisco Silva Neto^a, Alexsandra Maria Lima Scavuzzi^c, Ana Catarina Souza Lopes^c, Nereide Stela Santos-Magalhães^a, Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{b,d*}

^a Setor de Bioquímica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Setor de Microbiologia Clínica, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Laboratório de Microbiologia, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória (UFPE/CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

As infecções respiratórias e intestinais causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos e produtoras de biofilme provocam altos índices de mortalidade e de hospitalizações de pacientes, constituindo um desafio para a saúde pública e para a economia mundial. Com este cenário, torna-se necessário um tratamento eficaz para eliminar essas bactérias, inibir a formação e/ou erradicar os biofilmes produzidos por essas cepas. Nesse sentido, a terapia combinada utilizando ceftazidima e tobramicina surge como uma alternativa, pois esses fármacos possuem atividade antibacteriana e antibiofilme. No entanto, eles podem apresentar efeito tóxico e serem degradados em fluidos biológicos. Para sobrepor essas limitações, a encapsulação em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana é uma estratégia para a entrega desses fármacos por vias não invasivas, como nasal e oral. Assim, o objetivo desse estudo foi co-encapsular ceftazidima e tobramicina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme. As nanopartículas de zeína foram sintetizadas pelo método de nanoprecipitação, seguida de deposição polimérica por interação eletrostática, e foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula ($\emptyset$), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ), pH e eficiência de encapsulação (%EE), além das caracterizações físico-químicas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). A estabilidade das nanopartículas em suspensão em meio pH gástrico (1,2) e intestinal (6,8) simulados e liofilizadas por 4 meses foi avaliada através do $\emptyset$, PDI, ζ e doseamento do fármaco. A cinética de liberação foi realizada pelo método de diálise meio pH gástrico (pH 1,2) e intestinal (pH 6,8) simulados. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo seguindo o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os ensaios antibiofilme foram realizados pelo método de cristal violeta. As nanopartículas de zeína contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), tobramicina (TOB-ZNP-CH), e ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH) apresentaram $\emptyset$ entre 315 e 335 nm, PDI abaixo de 0,2, ζ entre +40 e +50 mV, pH de 5 e %EE acima de 55%. As caracterizações por MEV, DRX, FTIR, DSC e TGA indicaram interações químicas entre os componentes da formulação, encapsulação dos fármacos e estabilidade térmica das nanopartículas.

As nanopartículas apresentaram estabilidade em meio pH gástrico e intestinal simulados, além de permanecerem estáveis liofilizadas durante 4 meses. Os ensaios de cinética comprovaram a liberação controlada de CAZ e TOB por 24h no meio pH gástrico e intestinal simulados. CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH exibiram atividade antibacteriana, inibiram a formação do biofilme e erradicaram biofilmes de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes, contudo, CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram essas atividades biológicas potencializadas devido a co-encapsulação dos antibióticos. Assim, CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram características físico-químicas ideais para estudos *in vivo*, liberando os fármacos de forma controlada, reduzindo a citotoxicidade, potencializando a atividade antibacteriana e antibiofilme, tornando-se uma alternativa promissora para o tratamento de infecções respiratórias e intestinais causadas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes aos antibióticos e produtoras de biofilme.

Palavras-chave: Antibióticos. Infecções. Nanocarreadores. Resistência Bacteriana. Terapia Combinada.

Introdução

As infecções no trato intestinal e respiratório causadas por bactérias resistentes aos antibióticos estão entre as 10 maiores causas de morte e representam um desafio para saúde pública e economia mundial (WHO, 2020; WANG et al., 2020; REYNOLDS; KOLLEF, 2021). As infecções intestinais são a oitava causa de morte com mais de 2,648 milhões de mortes em 2020, causando níveis elevados de morbidade e hospitalização (RAO et al., 2020; WHO, 2020). Já as infecções respiratórias inferiores, como pneumonia e bronquite, são a quarta principal causa de mortalidade, especialmente, em crianças menores de 5 anos e idosos, com mais de 3.051 milhões mortes em 2020, sendo mais de 50% de etiologia bacteriana (MORAGA et al., 2017; TROEGER et al., 2018; WHO, 2020).

Essas infecções têm preocupado os profissionais de saúde e a comunidade científica, especialmente, na atualidade, devido aos casos de infecções resistentes adquiridas em hospitais e coinfeção bacteriana com o SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19 (MANDELL; NIEDERMAN, et al., 2019; WANG et al., 2020).

Dentre as bactérias causadoras dessas infecções destacam-se, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. *P. aeruginosa* é um patógeno Gram-negativo oportunista associado a infecções intestinais em pacientes hospitalizados, imunocomprometidos, tratados com antibióticos ou indivíduos que possuem síndrome do intestino irritável ou colite ulcerativa, podendo invadir a corrente sanguínea e causar bacteremia (KERCKHOFFS et al., 2011; PETTIGREW et al., 2019; HOFF, PATEL, SHAPIRO, 2020). Esse patógeno também é causa comum de infecções nosocomiais respiratórias, particularmente, pneumonia, além de estar associado a doenças pulmonares estruturais, como fibrose cística, e ser um patógeno co-infectante comum em pacientes com COVID-19 (LANSBURY et al., 2020; QU et al., 2021; REYNOLDS; KOLLEF, 2021).

K. pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, capsulada, encontrada no meio ambiente e está relacionada às infecções urinárias, intestinais e a pneumonia, além de infecções de cateter, especialmente, em pacientes idosos, com doenças crônicas, e pacientes com doenças respiratórias ou imunodeprimidos (ASHURTS; DAWSON, 2018). Essa bactéria é relatada como causadora de coinfeção secundária desenvolvida durante a hospitalização em pacientes portadores da COVID-19, agravando o quadro clínico, causando maior tempo de hospitalização, mau prognóstico e mortalidade, especialmente, nos grupos de risco (LANSBURY et al., 2020; HOSODA et al., 2021).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* são de difícil tratamento, especialmente, quando elas são resistentes aos antimicrobianos e produtoras de biofilmes (CHUNG, 2016; FUSCO et al., 2021). O tratamento de infecções causadas por cepas resistentes tornou-se preocupante e alvo de estudos, pois elas são comuns em hospitais e estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente entre pacientes com hospitalização prolongada expostos a dispositivos invasivos, sendo necessário um esquema terapêutico estratégico (DUMITRU et al., 2021; REYNOLDS; KOLLEF, 2021).

Além disso, a capacidade que *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* tem de formar biofilmes, fator de virulência definido como um agregado de bactérias imersas em uma matriz autoproduzida composta de polissacarídeos, proteínas e fragmentos de DNA, é caracterizada como uma das principais causas de falhas terapêuticas (VON KLITZING et al., 2017; VUOTTO et al., 2017; FUSCO et al., 2021; QU et al., 2021).

Nesse sentido, a utilização da terapia antimicrobiana combinada de um aminoglicosídeo, como a tobramicina (TOB), associado a um β -lactâmico, como a ceftazidima (CAZ), para o tratamento das infecções causadas por cepas resistentes e formadores de biofilmes configura-se como uma alternativa terapêutica (ASHURTS et al., 2018; BÖTTGER; CRICH, 2020). Contudo, estes fármacos apresentam instabilidade frente a variação de pH, sensibilidade à degradação pelas enzimas digestivas e baixa biodisponibilidade oral e nasal, limitando a sua administração (DE LEO et al., 2010; MICHELON et al., 2019).

Para superar a limitação na administração pela via oral e nasal, aumentar a biodisponibilidade e possibilitar a entrega dos antimicrobianos no interior dos biofilmes, a encapsulação desses fármacos em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana apresenta-se como uma proposta de terapia antimicrobiana (KHALID; EL-SAWY, 2017). A zeína é uma proteína que forma um polímero atóxico, biocompatível, gastrorresistente, mucoadesivo, de fácil obtenção e baixo custo, além de ser versátil, pois apresenta regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (LABIB, 2017; LIU et al., 2020). A quitosana é um polissacarídeo amina natural derivado da quitina que possui características atóxicas, biocompatíveis, mucoadesivas, biodegradáveis e antimicrobianas. Essas características possibilitaram a ampla utilização desse polissacarídeo em formulações farmacêuticas para administração de fármacos por via oral e nasal em diversas aplicações biomédicas (LIANG et al., 2017; ALI; AHMED, 2018). O revestimento das nanopartículas de zeína com esse polímero pode melhorar a estabilidade e a eficiência da encapsulação dos fármacos, constituindo-se como uma alternativa vantajosa para liberação controlada de antimicrobianos (IRACHE; GONZÁLEZ-NAVARRO et al., 2017; LIU et al., 2020).

Assim, essa pesquisa apresenta caráter inovador uma vez que propõe como objetivos a encapsulação e a co-encapsulação de CAZ e TOB em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana para administração via oral e nasal, além da avaliação da atividade antibacteriana desses nanocarreadores frente a *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* multidroga-resistentes e produtoras de biofilme.

Material e métodos

PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH) foram

preparadas pelo método de nanoprecipitação adaptado de Moreno et al. (2017) e Park, Park, Kim (2015). Inicialmente, a zeína (200 mg) e a lisina (20 mg) foram solubilizadas em 25 mL de etanol 70% por 1 h. Posteriormente, foi adicionado 25 mL de água ultrapura à suspensão de zeína e lisina pelo método de gotejamento. Em seguida, houve a evaporação do etanol por um rotaevaporador e foi obtido 25 mL de dispersão. Para o revestimento com a quitosana, após a preparação das nanopartículas de zeína, a solução de quitosana a 0,5% na proporção de 5:1 (v/v) de zeína:quitosana foi adicionada a dispersão sob agitação magnética por 1 h. Após essa etapa, as ZNP-CH foram liofilizadas com manitol a 5%.

As nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), tobramicina (TOB-ZNP-CH), ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH) também foram sintetizadas seguindo os métodos de Moreno et al. (2017) e Park, Park, Kim (2015). como descrito acima. Para encapsulação dos fármacos, a CAZ (12,5 mg) foi solubilizada em 5 mL de solução de etanol 70% e a TOB (12,5 mg) em 2 mL de solução aquosa. Em seguida, as soluções de CAZ e/ou de TOB foram adicionadas à solução de zeína/lisina sob agitação magnética por 1 h. Por fim, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH também foram liofilizadas utilizando manitol a 5%.

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas

O tamanho de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foram mensuradas utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do tamanho de partícula ($\emptyset$), 50 μ L das nanopartículas foram diluídos em 950 μ L de água ultrapurificada (Milli Q®, Millipore, USA). As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico (nm). A carga de superfície das nanopartículas foi estabelecida pela determinação do potencial zeta (ζ). Para medição do ζ houve a diluição de 50 μ L das amostras em 950 μ L de água purificada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH das nanopartículas foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS TecnoPON (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente. Os

resultados correspondem a experimentos independentes realizados em triplicata em diferentes dias (CAVALCANTI et al., 2021).

Doseamento e eficiência de encapsulação de ceftazidima e tobramicina nas nanopartículas

Para determinar o doseamento de CAZ e TOB nas nanopartículas, uma alíquota (350 µL) de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH foi diluída em 1000 µL de etanol 70% e foi adicionado metanol até completar no balão volumétrico de 5000 µL. A CAZ nas nanopartículas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis) a 254 nm. Como fase estacionária, foi usada uma coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm, XBridge Waters) e a fase móvel utilizada foi uma solução de Acetonitrila:Água Milli-Q (2:98 v/v). Foi utilizada a condição de eluição isocrática, a um fluxo de 1 mL/min, com tempo de corrida de 6 min (TORRES et al., 2012). Para as amostras com TOB, foi realizada a derivatização utilizando uma solução de fluorescamina a 0,5% (p/v) em metanol com incubação à 24 °C protegidas da luz por 1h (MORENO-SASTRE et al., 2016). A TOB nas nanopartículas foi determinada a 390 nm usando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 *pro* (Biochrom, Cambridge, Inglaterra).

A eficiência de encapsulação (%EE) de CAZ e TOB foi realizada através da técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). As amostras das formulações (500 µL) foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm por 1h. Trezentos e cinquenta microlitros da amostra filtrada foram diluídos em 1000 µL de etanol 70% e foi adicionado metanol no balão volumétrico de 5000 µL (SÁNCHEZ-JUÁREZ, 2019). A CAZ filtrada foi mensurada por HPLC-UV/Vis e a TOB filtrada foi mensurada usando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 *pro* como descrito anteriormente. Experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada condição em diferentes dias. A eficiência de encapsulação foi determinada seguindo a equação abaixo.

$$\%EE = \frac{\text{Total de CAZ ou TOB} - \text{filtrado de CAZ ou TOB}}{\text{Total de CAZ ou TOB}} \times 100$$

Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e difração de raios-X das nanopartículas

Para análise morfológica das nanopartículas foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:10 v/v de nanopartículas:água. As nanopartículas foram espalhadas em stubs e mantidas em estufa a temperatura de 37 °C por 24 h. Após a secagem, os stubs foram metalizados (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100) e observados ao microscópio eletrônico de varredura ZEISS, modelo EVO-LS15 (DA ROSA et al., 2015).

Os espectros de FTIR das CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foram obtidos a partir da mistura das amostras liofilizadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr). As amostras foram escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} no espectrofotômetro de transformada de Fourier (IV-TF) (modelo Frontier/PerkinElmer, Califórnia, EUA), obtendo-se os espectros com resolução de 4 cm^{-1} (CHEN et al., 2020).

A análise de DRX das CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foi realizada usando um difratômetro de raios X (Rigaku, modelo Miniflex, Texas, EUA). Os dados foram coletados em uma faixa angular de 5° a 50° 2-teta em modo contínuo usando um tamanho de etapa de 0,02° 2-teta e tempo de etapa de 5 s (LIANG et al., 2017).

Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas

As curvas de TGA de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foram obtidas através do equipamento TGA Q500 (TA Instruments, Boston, EUA). As amostras (5 mg) foram aquecidas em uma bandeja de platina a uma taxa de 10 °C/min, com fluxo de nitrogênio de 20 mL/min da temperatura 25 até 600 °C (DA ROSA et al., 2015).

As curvas de DSC de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH foram obtidas usando um DSC Q10 (TA Instruments, Boston, EUA). Cada amostra analítica (5 mg) foi pesada em uma bandeja de alumínio e, em seguida, a bandeja foi selada. As amostras foram aquecidas da temperatura de 20 a 250 °C a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C/min e vazão 20 mL/min de gás nitrogênio (PARK,

PARK, KIM, 2015).

Estabilidade de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em condições de pH gastrointestinais simuladas

A estabilidade das nanopartículas foi avaliada em soluções de meios biológicos pH gástrico e intestinal simulados, as quais foram preparadas de acordo com Cavalcanti et al. (2021). Inicialmente, foram adicionados 250 µL de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH ou CAZ-TOB-ZNP-CH em 750 µL de solução gástrica (pH 1,2) ou intestinal (pH 6,8) em microtubos e os microtubos foram mantidos em agitação (70 rpm) a 37 °C por 2 h. Em intervalos de 30 minutos, as alíquotas foram retiradas e avaliadas quanto ao Ø, PDI e ζ.

Estabilidade das nanopartículas

CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH foram mantidas liofilizadas a 4 °C por 4 meses e avaliadas mensalmente para determinar Ø, PDI, ζ e doseamento de fármaco. O Ø, PDI, ζ e doseamento de fármaco foram determinados como descrito acima.

Cinética de liberação *in vitro* de CAZ e TOB a partir das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana

O perfil cinético de liberação *in vitro* de CAZ e TOB foi avaliado pela técnica de diálise (membrana de celulose, cut-off 15–20 kD, Sartorius, Alemanha) em diferentes soluções para simular o pH do trato gastrointestinal (pH 1,2 e pH 6,8) e em tampão salino-fosfato (PBS) em pH 7,4 para simular o sangue. O ensaio de cinética de liberação foi realizado em regime de sink, onde o volume do meio de dissolução foi 10 vezes maior que o volume de saturação.

A membrana foi hidratada e uma alíquota (3 mL) das dispersões de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH ou CAZ-TOB-ZNP-CH foi inserida no saco de diálise de membrana e colocada em um tubo contendo 30 mL de solução de pH 1,2 sob agitação (70 rpm) a 37 °C por 2 h. Em intervalos de 30 minutos, alíquotas de 3 mL foram retiradas e o mesmo volume foi substituído pela solução de pH 1,2. Após 2 h, a membrana contendo a formulação foi removida e inserida em outro tubo contendo 30 mL de solução pH 6,8. A agitação foi mantida a 70 rpm a 37 °C, retirando-se alíquotas de 3 mL após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24h e substituindo-se as alíquotas pelo mesmo volume de

solução pH 6,8 conforme realizado por Cavalcanti et al. (2021).

Uma alíquota de 3 mL das CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH ou CAZ-TOB-ZNP-CH foi inserida na membrana e colocada em um tubo contendo 30 mL de solução tampão (pH 7,4) e mantida por agitação (70 rpm) a 37 °C por 42 h. Inicialmente, as alíquotas de 3 mL foram removidas em intervalos de 15 min, 30 min, 45 min até a primeira hora. A partir da primeira hora, alíquotas foram retiradas após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 24, 30, 36, 40 e 42 h. À medida que as alíquotas de 3 mL foram removidas, o mesmo volume foi inserido pela solução tampão PBS de pH 7,4 para cada alíquota removida. A CAZ e a TOB foram quantificados por HPLC-UV/Vis e espectrofotômetro, respectivamente, como descrito anteriormente.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Obtenção dos isolados clínicos bacterianos

Os isolados clínicos utilizados nesta pesquisa foram coletados em hospitais de Recife-PE, Brasil. As cepas de *P. aeruginosa* foram oriundas do estudo de Costa-Júnior et al. (2021). A cepa PA 19 é resistente ao meropenem (MEM), imipenem (IPM), aztreonam (ATM), levofloxacina (LVX), polimixina B (PMB), a PA 56 é resistente ao IPM, PMB, LVX e a PA 69 é resistente MEM, IPM, ATM, piperacilina-tazobactam (PIT), ciprofloxacina (CIP), cefepima (CPM) e LVX.

As cepas de *K. pneumoniae* foram oriundas do estudo de Scavuzzi et al. (2017). As cepas K25 A2, K26 A2, K29 A2, K31 A2 e K32 A2 são resistentes ao ácido clavulânico-amoxicilina (AMC), amoxicilina (AMO), ATM, CAZ, cefoxitina (CFO), CPM, cefotaxima (CTX), CIP, LVX, ácido nalidíxico (NAL), norfloxacina (NOR), piperacilina/tazobactam (PIT) e trimetoprim/sulfametoxazol (SUT). As cepas K29 A2, K31 A2 e a K32 A2 também são resistentes ao ertapenem (ERT), IMP e MEM. Posteriormente, as cepas foram transportadas para o Setor de Microbiologia Clínica do Laboratório Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), onde foram mantidas conservadas em glicerol a -80 °C.

Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana *in vitro* dos fármacos encapsulados nas nanopartículas foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Para este ensaio foram utilizados isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 19, PA 56, PA 69) e de *Klebsiella pneumoniae* (K25 A2, K26 A2, K29 A2, K31 A2 e K32). Inicialmente foi distribuído caldo Müller-Hinton (MHC) em cada poço das placas. Em seguida, foram adicionados CAZ, TOB, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH através de diluição seriada nas concentrações de 0,097 a 50 µg/mL e por fim as suspensões bacterianas na concentração final de 10^5 UFC/mL. O MHC sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o MHC com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP-CH foi utilizado como controle negativo experimental. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota da amostra dos poços em que não houve crescimento visível foi inoculada em ágar Müller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração em que não houve crescimento microbiano (CLSI, 2021). Experimentos independentes em triplicata foram realizados em diferentes dias.

Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos produtores de biofilme foram identificados através do método do cristal violeta (STEPANOVIĆ et al., 2000). Inicialmente foi distribuído caldo tripton de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição e posteriormente foram adicionadas as suspensões bacterianas (10^5 UFC/mL) dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 19, PA 56, PA 69) e de *Klebsiella pneumoniae* (K25 A2, K26 A2, K29 A2, K31 A2 e K32), e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e, em seguida, as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido

e ácido acético glacial 30% foi adicionado em cada poço. Em seguida, a análise do resultado foi realizada por espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como controle negativo. As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de ODs (Densidades ópticas) dos biofilmes bacterianos, em comparação com valor da OD_c (Densidade óptica do controle): não aderente se $OD \leq OD_c$; fraca produção de biofilme se $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$; produção moderada de biofilme se $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$; ou forte produção de biofilme se $4 \times OD_c < OD$ (STEPANOVIĆ et al., 2000). Experimentos independentes em triplicata foram realizados em diferentes dias.

Avaliação da inibição da formação do biofilme

Os ensaios para avaliação da inibição da formação do biofilme foram realizados frente às cepas que demonstraram ser moderadamente ou fortemente produtoras de biofilme. Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição. Em seguida foram adicionados CAZ, TOB, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH nas concentrações de CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8 e CIM/16 e, posteriormente, foram adicionadas as suspensões bacterianas (10^5 UFC/mL) dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 19 e PA 69) e de *Klebsiella pneumoniae* (K25 A2, K26 A2, K29 A2 e K31 A2). As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP-CH foi utilizado como controle negativo experimental. Após incubação, a inibição de produção de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (STEPANOVIĆ et al., 2000) e os resultados foram expressos como concentração inibitória mínima da inibição de biofilme (CIMB) e em porcentagem de inibição (ALBANO et al., 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias. Os resultados deste teste foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA) e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Avaliação da erradicação do biofilme

Os ensaios para avaliação da erradicação do biofilme foram realizados com as mesmas cepas do estudo anterior. Inicialmente, os inóculos bacterianos dos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 19 e PA 69) e de *Klebsiella pneumoniae* (K25 A2, K26 A2, K29 A2 e K31 A2) foram ajustados na densidade de 0,5 da escala de McFarland em TSB + glicose e distribuídos nas placas de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para permitir a formação do biofilme. Após incubação, o meio de cultura foi retirado e repostado um novo meio. Em seguida, CAZ, TOB, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH foram distribuídas nas microplacas nas concentrações de 16×CIM, 8×CIM, 4×CIM, 2×CIM e CIM, estas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo) e as ZNP-CH foi utilizado como controle negativo experimental. Após incubação, a erradicação de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (STEPANOVIĆ et al., 2000) e os resultados foram expressos como concentração de erradicação mínima de biofilme (CEMB) e em porcentagem de inibição (ALBANO et al., 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias. Os resultados deste teste foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA) e expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Análises estatísticas

Nos testes microbiológicos, para comparar as médias de múltiplos grupos, a análise de variância one-way (ANOVA) foi aplicada usando o procedimento de comparação múltipla de Tukey no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, Califórnia, EUA). Os dados estatísticos foram considerados significativos com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao Ø, PDI, ζ, pH e %EE (tabela

1).

Tabela 1 – Caracterização de nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina.

	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	%EE (CAZ)	%EE (TOB)
ZNP-CH	336,53	0,214	+50,7 ± 1,5	-	-
CAZ-ZNP-CH	314,6	0,220	+39,2 ± 0,7	87,28 ± 0,2	
TOB-ZNP-CH	317,7	0,274	+45,1 ± 1,0		63,38 ± 0,7
CAZ-TOB-ZNP-CH	330,6	0,217	+42,3 ± 1,2	73,68 ± 0,7	57,47 ± 0,5

Fonte: O autor (2022).

pH=5,0

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ: potencial zeta; %EE: eficiência de encapsulação; ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina.

Nesse estudo, as ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram tamanho de partícula menores que 340 nm e PDI menor que 0,3. O Ø entre 100 e 700 nm é ideal para aplicações nasais e orais, uma vez que as NPs com esse tamanho de partícula podem ser transportadas intracelularmente através do epitélio nasal (RYTTING et al., 2008; MISTRY et al., 2009; CLEMENTINO et al., 2021), enquanto NPs com tamanhos entre 300 e 500 nm podem ser endocitadas no intestino, principalmente pelas células M, células epiteliais especializadas que recobrem os folículos linfóides das Placas de Peyer, podendo atingir alvos biológicos mais específicos, devido ao tamanho e mobilidade relativa no intestino (FROHLICH; ROBLEGG, 2016; IRACHE, GONZÁLEZ-NAVARRO, 2017; SPIRESCU et al., 2021). O PDI determina o perfil de homogeneidade das dispersões, e valores iguais ou menores que 0,3 indicam um perfil monodisperso, sendo ideais para aplicações *in vivo* (DANAEI, et al., 2018).

As ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram carga de superfície positiva com ζ acima de +35 mV. O ζ é um parâmetro que indica a estabilidade das nanopartículas uma vez que valores maiores que +30 mV promovem a repulsão das nanopartículas, minimizando a agregação entre elas

(ZHANG et al., 2014; LU et al., 2014). Nanocarreadores carregados positivamente apresentam interação com a mucosa das vias aéreas, uma vez que ocorre forte interações eletrostáticas com as partes aniônicas siálicas e ácidas de glicosaminoglicanos contidos na mucina e na superfície das células das vias aéreas (QURAISHI, JONES, MASON, 1998; PARDESHI, BELGAMWAR, 2016; BERNOCCHI et al., 2017; MARASINI et al., 2017). Do mesmo modo, essas nanoestruturas de carga superficial positiva podem prolongar o tempo de residência no intestino delgado e apresentar forte adesão à mucosa intestinal, devido às interações eletrostáticas com as cargas negativas na camada de muco desse ambiente, e por isso, podem ter um aumento em sua captura pelas placas de Peyer (PARK et al., 2010; CAO et al., 2019).

Os valores de pH das nanopartículas ficaram em torno de 5. O pH do líquido nasal é levemente ácido, estando entre 5,5 e 6,5 (ENGLAND et al., 1999), enquanto o pH estomacal pode variar entre 1,5 e 2,0 e o intestinal entre 6,0 e 8,0 (VARUM et al., 2008). Uma vez que os parâmetros como o $\emptyset$, PDI, ζ e o pH são essenciais para determinar a via de administração, a estabilidade da formulação e as possíveis aplicações para testes *in vivo*, as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana desenvolvidas neste estudo são apropriados para administração pelas vias nasal e oral.

A %EE de CAZ nas nanopartículas variou entre $73,68 \pm 0,7$ e $87,28 \pm 0,2\%$ e de TOB entre $57,47 \pm 0,5$ e $63,38 \pm 0,7\%$ (tabela 1). Estudos da literatura indicam uma ampla variação de %EE tanto dos β -lactâmicos como dos aminoglicosídeos em nanopartículas poliméricas devido a afinidade química dos fármacos com os polímeros constituintes das NPs (DEACON et al., 2015; JAMIL et al., 2016; SILVA et al., 2017; AL-NEMRAWI et al., 2018; SUN et al., 2021).

Em relação à %EE de CAZ e TOB nas CAZ-TOB-ZNP-CH, houve uma redução em torno de 10%. A co-encapsulação de fármacos é um desafio uma vez que a encapsulação mútua de dois fármacos em uma mesma nanopartícula pode gerar uma competição pelos sítios de ligação (MADKOUR, 2019; WALVEKAR; GANNIMANI; GOVENDER, 2019; VAIRO et al., 2020). Contudo, a co-encapsulação pode permitir o sinergismo, a atividade antimicrobiana aprimorada, a ampliação do espectro antimicrobiano, a diminuição do estímulo ao desenvolvimento de resistência, o ajuste relativo da dosagem de múltiplos medicamentos, a redução dos efeitos tóxicos e uma boa relação custo-benefício (BALASUBRAMANIAN et al., 2016; MADKOUR, 2019; WALVEKAR; GANNIMANI; GOVENDER, 2019).

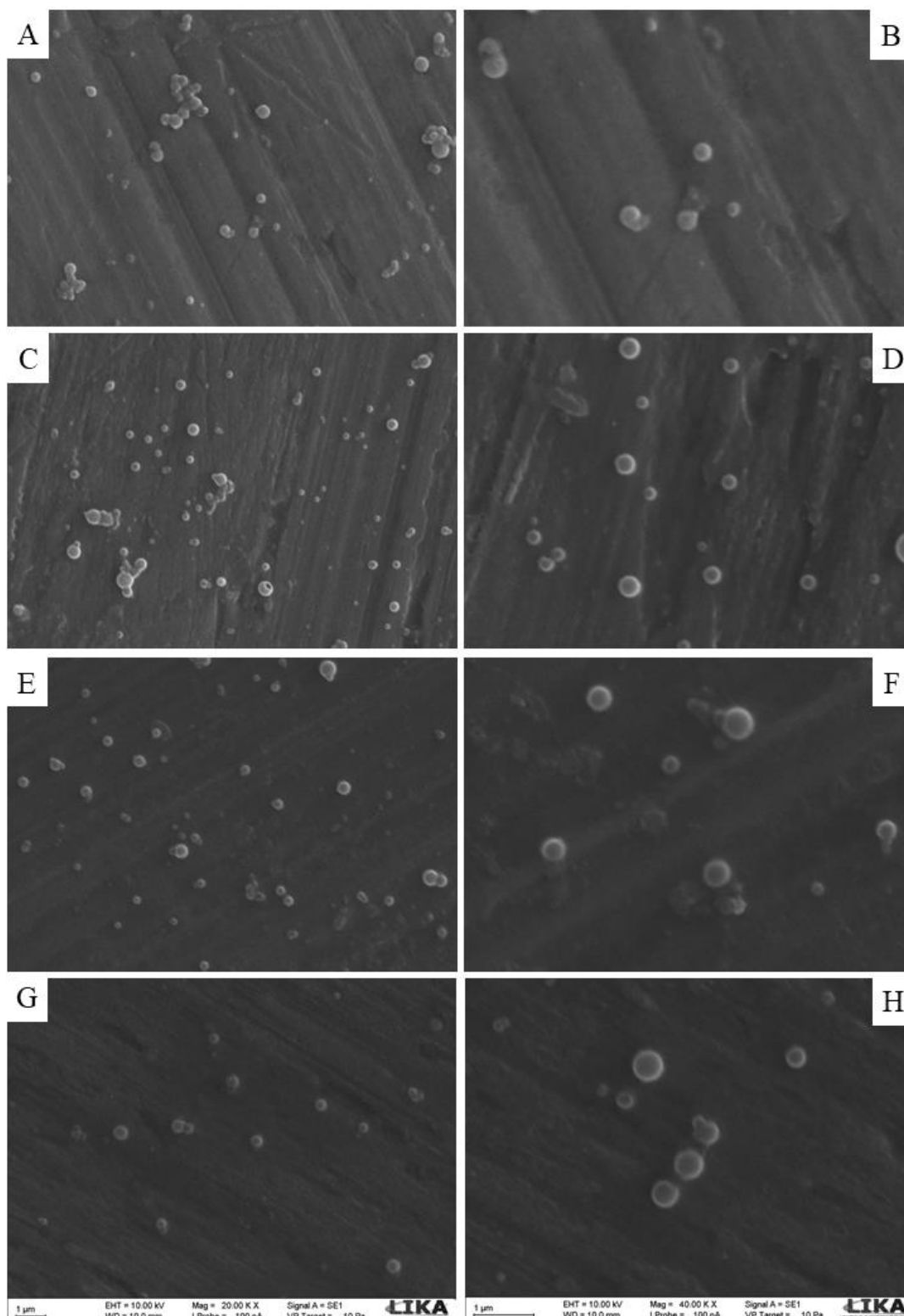
O revestimento das nanopartículas de zeína com carboidratos aumenta a encapsulação e melhora a estabilidade física e fotoquímica do fármaco, promovendo maior interação molecular entre os fármacos e seus alvos biológicos, além de facilitar a formação de nanopartículas com características físico-químicas ideais para aplicação *in vitro* e *in vivo* (JI et al., 2019; LIU et al., 2020; BAO, QIAN, YAO, 2021; CARRASCO-SANDOVAL et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que a quitosana interage com as superfícies mucosas que cobrem o trato nasal, pulmonar e gastrointestinal (CASETTARI, ILLUM, 2014; SALATIN, YARI KHOSROUSHAHI, 2017). Assim, a bioadesividade e a resistência à degradação torna este polímero conveniente para revestimento de partículas para aplicações nasais e orais (HAMED I et al., 2018; ALI; AHMED, 2018).

Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e difração de raios-X das nanopartículas

As imagens das nanopartículas obtidas por MEV evidenciam a morfologia esférica e lisa com população homogênea de ZNP-CH (figura 1A e B), de CAZ-ZNP-CH (figura 1C e D), TOB-ZNP-CH e (figura 1E e F), CAZ-TOB-ZNP-CH (figura 2G e H) corroborando com os resultados obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmica utilizando o Zetasizer Nano-ZS90. Na figura 2, observa-se uma estrutura interna densa relativa às nanopartículas de zeína envolvidas por uma camada menos densa relacionada ao revestimento pela quitosana, características de nanopartículas núcleo-coroa.

No espectro de FTIR de ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH (figura 2), constata-se, para todas as formulações, que o pico de vibração de estiramento em torno 3440 cm^{-1} correspondente aos grupos hidroxila foi deslocado para $3299,83\text{ cm}^{-1}$ (ZNP-CH), $3308,28\text{ cm}^{-1}$ (CAZ-ZNP-CH), $3292,44\text{ cm}^{-1}$ (TOB-ZNP-CH) e $3288,72\text{ cm}^{-1}$ (CAZ-TOB-ZNP-CH). As bandas de absorção entre $1600\text{--}1700$ e $1510\text{--}1570\text{ cm}^{-1}$ que representam as características da amida I e da amida II estão presentes em todas as nanopartículas (YU et al., 2020; ZHANG et al., 2021). Também foi observada em todas as nanopartículas a banda de absorção na faixa dos $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, referente aos grupos NH^{3+} da cadeia lateral protonada do aminoácido lisina (ROZENBERG; SHOHAM, 2007).

Figura 1 – Morfologia de ZNP-CH (A e B), CAZ-ZNP-CH (C e D), TOB-ZNP-CH (E e F) e CAZ-TOB-ZNP-CH (G e H) obtida a partir de microscopia eletrônico de varredura.

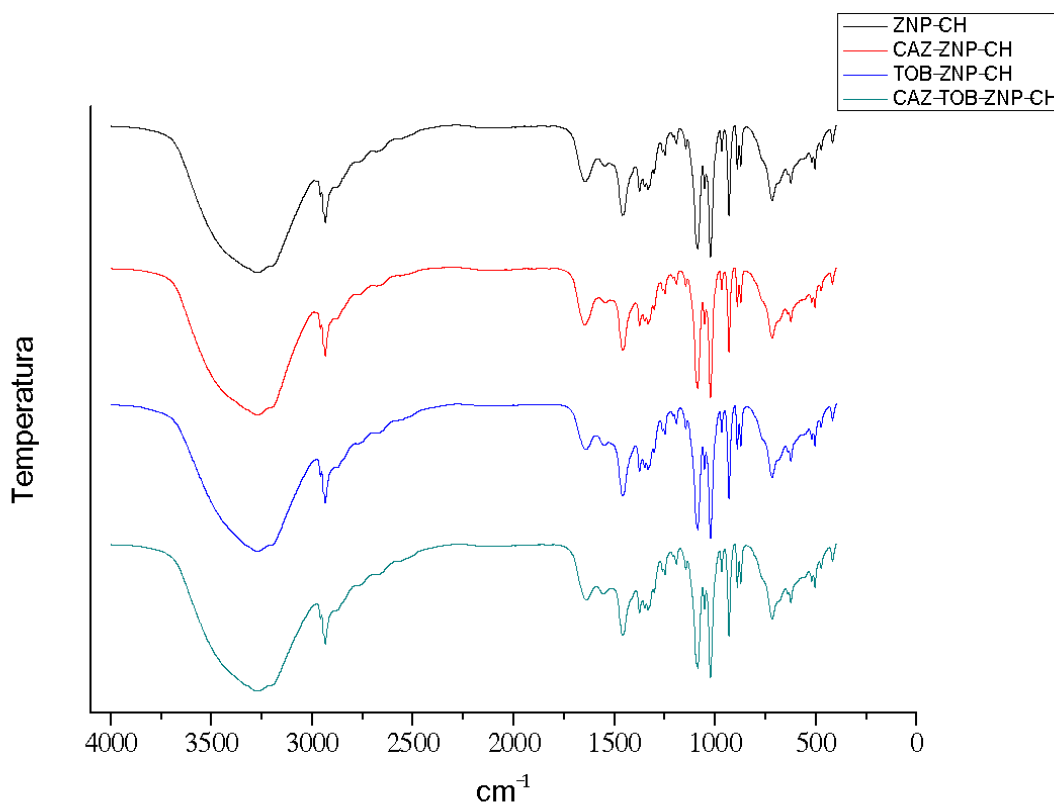


Fonte: O autor (2022).

A quitosana é identificada no espectro de FTIR pela presença do estiramento

em 3290 cm^{-1} referente às ligações O-H e N-H, pela vibração de alongamento em $2927\text{--}2864\text{ cm}^{-1}$ referente à ligação C-H e pela vibração de estiramento em 1645 cm^{-1} e em 1584 cm^{-1} referentes aos grupos amida I, amina e amida II. Também foi observada a deformação simétrica C-H correspondente a vibração em 1375 cm^{-1} , o estiramento antissimétrico C-O-C e estiramento C-N em 1150 cm^{-1} , a vibração de alongamento C-O em 1026 cm^{-1} , e picos em torno de 896 e 1154 cm^{-1} correspondem à estrutura sacarídica da quitosana (LAWRIE et al., 2007; ANICUTA et al., 2010). Nos espectros de ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH foram observadas as vibrações características da quitosana, contudo, não foi evidenciada a vibração de alongamento em 2864 cm^{-1} , e houve o deslocamento do estiramento (C-N) em 1150 cm^{-1} para 1147 cm^{-1} e vibração em $896,73\text{ cm}^{-1}$ para $890,38\text{ cm}^{-1}$ em todas as nanopartículas.

Figura 2 – Espectro de FTIR das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana. (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).



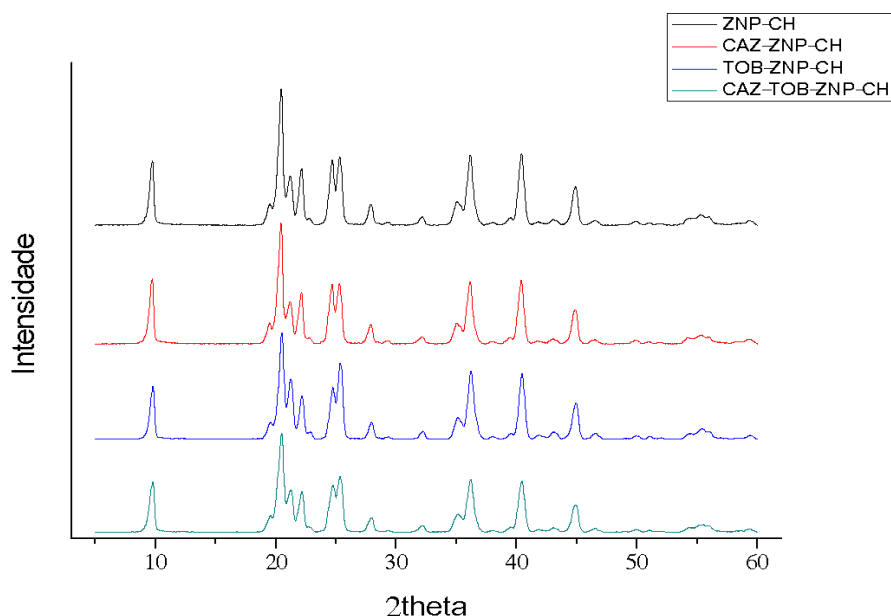
No espectro da ceftazidima observa-se uma banda na região 3000-3600 cm^{-1} referente ao grupamento OH, NH^2 e a ligação C-H, um alongamento em 1810 cm^{-1} referente à presença da ligação entre C-S-C. Outro alongamento foi evidenciado em torno de 1670 cm^{-1} devido à deformação axial do grupo amida C=O, em 1450 cm^{-1} pela ligação C-N e entre as bandas de 600-800 cm^{-1} pelas deformações de hidrogênio adjacentes (ABOUNASSIF, MIAN, MAIN, 1990; OSÓRIO, 2018). Na figura 2, CAZ-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH não evidenciam o alongamento em 1810 cm^{-1} e houve deslocamento do pico de 1670 cm^{-1} para 1645,55 cm^{-1} (CAZ-ZNP-CH) e 1639,47 cm^{-1} (CAZ-TOB-ZNP-CH), e de 1450 cm^{-1} para 1458 cm^{-1} para as todas as nanopartículas contendo CAZ.

O espectro da tobramicina, por sua vez, apresenta bandas de absorção em 3400-3200 cm^{-1} devido ao alongamento N-H ou O-H, em 2910 cm^{-1} devido ao alongamento alifático C-H, em 1588 cm^{-1} devido à curvatura N-H, em 1461 cm^{-1} devido o grupamento CH^2 , em 1349–1380 cm^{-1} devido à vibração de curvatura O-H no plano e em 1032 cm^{-1} devido ao alongamento C-N ou C-O (DASH, 1996; ROSASCO, 2018). Foi observado na Figura 2 que houve o deslocamento da banda 2910 cm^{-1} para 2936 cm^{-1} e de 1032 cm^{-1} para 1080 cm^{-1} em TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH.

Na figura 2, é possível observar em todas as nanopartículas as bandas de absorção características da zeína, da lisina, da quitosana, contudo, nas formulações contendo os fármacos, percebe-se um deslocamento das bandas e ausência de outras, indicando à sua interação com o polímero carreador e a encapsulação destas moléculas.

Na figura 3 está evidenciado o DRX para ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH. Em todas as nanopartículas foram observados três picos (9,6°, 19,4° e 20,4°). Os picos de 9,6° e 19,4° são correspondentes a presença da zeína que indicam a característica amorfa da molécula (LIU et al., 2020). Entretanto, através de algumas interações intermoleculares com outros compostos pode-se ter uma nova difração de caráter cristalino (FENGs, 2020). O pico 20,4° corresponde a presença da quitosana, uma vez que no difratograma desta molécula são encontrados dois picos em torno de $2\theta = 10,5^\circ$ e 20° , devido ao seu grau elevado de cristalinidade (QI, 2004; WANG, DU, WANG, 2008).

Figura 3 – DRX das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).



Fonte: O autor (2022).

Na figura 3, outros picos ($2\theta = 21^\circ, 22^\circ, 24^\circ, 25^\circ, 36^\circ, 40^\circ, 43^\circ, 44^\circ$) de intensidade variada foram identificados nas nanopartículas, contudo, eles não correspondem aos picos característicos de CAZ (2θ de $20,2^\circ, 21,5^\circ, 22,3^\circ$) (ABOUNASSIF, MIAN, MAIN, 1990; PEREIRA, 2019) e de TOB (2θ em $17,7^\circ, 18,3^\circ, 18,8^\circ$) (DASH, 1990; ROSASCO, 2018), indicando apenas o grau de cristalinidade destas nanopartículas, bem como as possíveis ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas entre os fármacos, o polímero carreador e o polímero de revestimento.

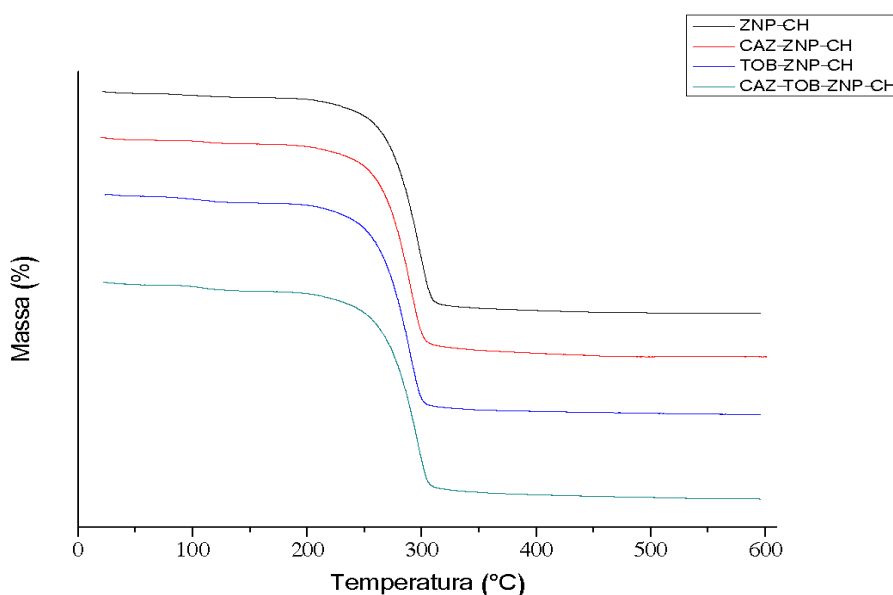
Análises térmicas por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial das nanopartículas

As curvas termogravimétricas obtidas das nanopartículas demonstram uma taxa de perda de massa inicial até 150°C em torno de 2,5% para ZNP-CH e CAZ-ZNP-CH, e em torno de 4% para TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH, e uma perda $\geq 90\%$ à medida que ocorre o aumento da temperatura de 200°C a 325°C (figura 4).

Esse perfil de perda de massa apresentado pelas nanopartículas

desenvolvidas neste estudo, apresenta-se distinto do perfil de degradação de zeína, pois aos 83,7 °C ocorre perda de 5,6% e aos 385,2 °C há perda de 73,8% (ASWATHY, 2012; DA ROSA et al., 2015). A lisina tem duas perdas de peso nos intervalos de temperatura 255-365 °C (57%) e 478-589 °C (24%) (SELVAKANNAN et al., 2003), e a quitosana apresenta três intervalos de perda de peso, o primeiro entre 50 e 100 °C (5%), o segundo entre 280 e 390 °C (70%) e o terceiro acima de 390 °C (15%) (HONG et al., 2007; MOUSSOUT, 2016).

Figura 4 – Termograma das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).



Fonte: O autor (2022).

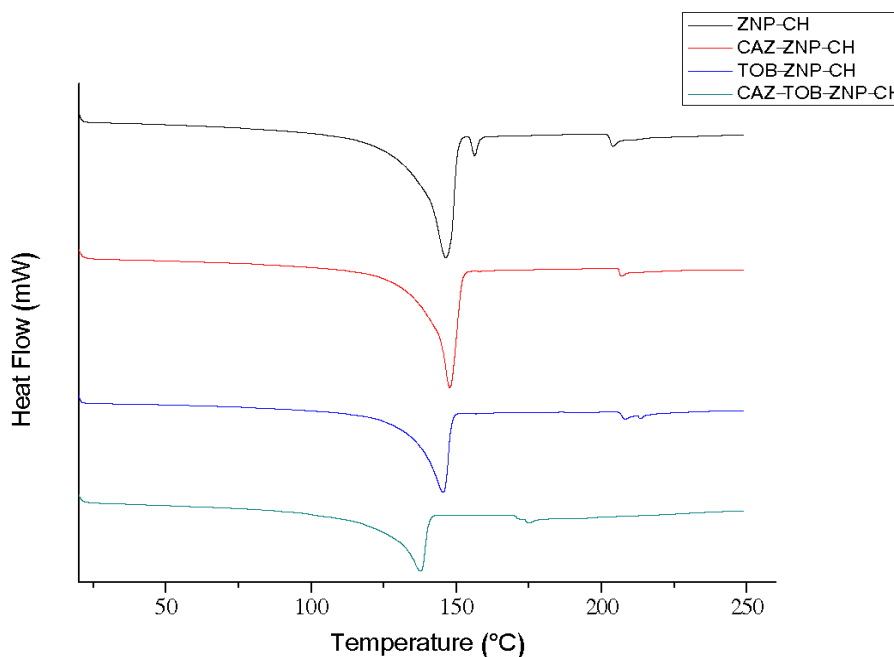
A perda de massa da zeína é atribuída à quebra dos resíduos de aminoácidos, bem como à clivagem das ligações peptídicas da proteína (ASWATHY, 2012). Enquanto, a perda de massa da quitosana acontece no primeiro ponto devido a evaporação da água que estava adsorvida ao polímero de quitosana por ligações de hidrogênio, no segundo pela despolimerização por desacetilação e clivagens das ligações glicosídicas, e no terceiro pela decomposição do carbono residual (MOUSSOUT, 2016).

CAZ tem perda de massa em intervalos de 50-100 °C, em torno de 10%, e

acima de 190 °C ocorre perda em torno de 75% (CHANG; LEE; LIN, 2018; DE SANTANA et al., 2020). TOB apresenta perda de massa em torno de 90% entre 25°C e 125°C (DASH; SURYANARAYANAN, 1991; DASH, 1996). Os resultados do termograma mostram que não há perda significativa de massa entre 25°C e 200 °C, evidenciando a encapsulação de CAZ e TOB, bem como a proteção frente à degradação pelo calor para os fármacos e a estabilidade térmica das nanopartículas (figura 4).

No termograma de DSC, as nanopartículas de zeína apresentaram picos endotérmicos, ZNP-CH em 146,17 °C, 156,18°C °C e 203,30 °C, CAZ-ZNP-CH em 147,66 °C e 206,33 °C, TOB-ZNP-CH em 145,34 °C e 204,23 °C e CAZ-TOB-ZNP-CH em 137,56 °C e 174,21 °C (figura 5).

Figura 5 – DSC das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima (CAZ-ZNP-CH), nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo tobramicina (TOB-ZNP-CH) e nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina (CAZ-TOB-ZNP-CH).



Fonte: O autor (2022).

A zeína demonstra picos endotérmicos na faixa de 50-100 °C (LUO, 2011; JIANG et al., 2021). A quitosana, por sua vez, é caracterizada por um pico endotérmico próximo de 100 °C e um pico exotérmico em torno de 270 °C (NIETO et al., 1992; LUO, 2011). A lisina apresenta dois picos endotérmicos em 74,1 °C e 259,3 °C

(RODANTE; MARROSU, 1990; PIEL et al., 1997).

A ceftazidima mostra um pico endotérmico em torno de 120 °C (CHANG; LEE; LIN, 2008), enquanto a tobramicina mostra três picos endotérmicos em 115,64 °C, 176,70 °C e 230 °C, e um pico exotérmico em 206,94 °C (ROSASCO, 2018). Observa-se que os picos correspondentes a zeína, lisina e quitosana foram deslocados, e que os picos correspondentes aos fármacos não são evidenciados, indicando a encapsulação de CAZ e TOB nas nanopartículas e a melhora da estabilidade térmica desses antibióticos.

Estabilidade de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em condições de pH gastrointestinal simulado

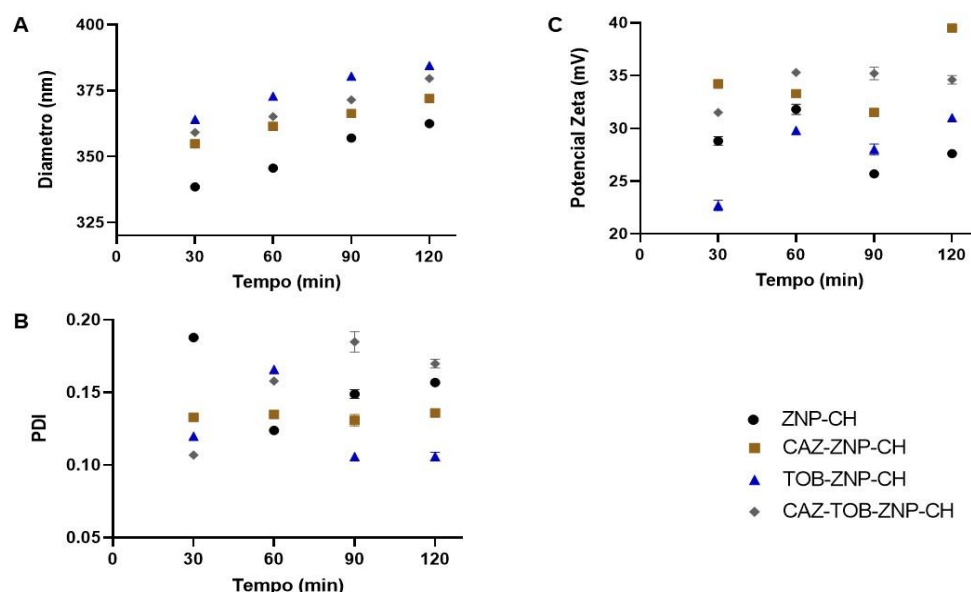
As nanopartículas foram expostas a meios gástrico e intestinal simulados para avaliar a estabilidade frente a variação do pH. Como observado na figura 6A e 7A, houve o aumento gradativo do diâmetro médio das nanopartículas ao longo dos 120 min em pH 1,2 e pH 6,8. Após esse período, no pH 1,2 e no pH 6,8 houve um aumento em torno de 75 nm e 130 nm em para todas as nanopartículas, respectivamente. Todas as nanopartículas tiveram diminuição no valor de PDI de 0,2 para 0,1 após 120 min no pH 1,2 e 6,8 (figura 6B e 7B). Após a exposição aos fluidos biológicos simulados, o potencial zeta diminuiu gradativamente, em pH 1,2 e no pH 6,8 com redução em torno de 15 mV e 25 mV para todas as nanopartículas, respectivamente (figura 6C e 7C).

Houve um aumento do tamanho das nanopartículas, diminuição do PDI e uma redução no potencial zeta em pH 1,2 e em pH 6,8. Outros estudos da literatura também comprovaram as alterações nesses parâmetros após exposição das NPs de zeínas revestidas com quitosana aos diferentes pHs, como por exemplo, as pesquisas de Wang et al. (2018a) que realizam o revestimento das nanopartículas de zeína com carboximetilquitosana encapsulando β -caroteno com potencial antioxidante e Khan et al. (2019) que desenvolveram nanopartículas de zeína revestidas com alginato/quitosana contendo resveratrol.

Em pH abaixo de 6,0, a quitosana sofre o processo de protonação dos grupos NH_2 , consequentemente, ocorre a expansão da cadeia polimérica e do tamanho de partícula (PILLAI, PAUL, SHARMA, 2009; DE SOUSA MONTEIRO et al., 2015). A diminuição do potencial zeta acontece como efeito eletrostático dos sais e à adsorção de outras moléculas presentes no fluido gástrico simulado (LIU et al., 2016; KHAN et

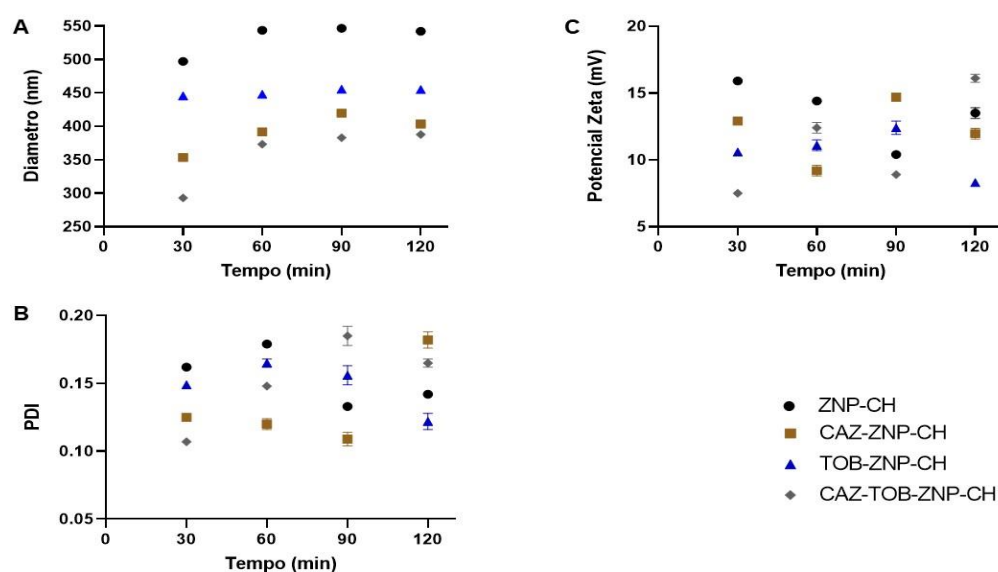
al., 2019). Com o aumento do pH para 6,8, ocorreu a desprotonação dos grupos ionizados ($-\text{NH}_3^+$) e, conseqüentemente, redução do potencial zeta, facilitando a agregação coloidal e aumento do tamanho de partícula (PILLAI, PAUL, SHARMA, 2009; ZHANG et al., 2014).

Figura 6 – Diâmetro médio (A), PDI (B) e potencial zeta (C) das ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em pH 1,2.



Fonte: O autor (2022).

Figura 7 –Diâmetro médio (A), PDI (B) e potencial zeta (C) das ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH em pH 6,8.



Fonte: O autor (2022).

As CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH, CAZ-TOB-ZNP-CH e ZNP-CH apresentam estabilidade coloidal pela repulsão eletrostática e estérica sob condições gastrointestinais simuladas, demonstrando seu potencial para futuras aplicações como veículos de administração de antimicrobianos pela via oral para entrega intestinal.

Estabilidade das nanopartículas

O Ø, PDI, ζ , pH e doseamento dos fármacos de CAZ-ZNP-CH (tabela 2), TOB-ZNP-CH (tabela 3) e CAZ-TOB-ZNP-CH (tabela 4) foram avaliados durante 4 meses.

Tabela 2 – Estabilidade das nanopartículas de zeína contendo ceftazidima.

Parâmetros	MESES			
	1	2	3	4
Ø (nm)	330,5	328,2	332,9	337,1
PDI	0,220	0,230	0,243	0,239
ζ (mV)	+37,1 $\pm$ 0,2	+37,1 $\pm$ 0,3	+36,6 $\pm$ 0,2	+38,9 $\pm$ 0,8
pH	5,0	5,2	5,1	5,2
Doseamento				
de fármaco (%)	99,01 $\pm$ 0,3	99,1 $\pm$ 0,2	98,99 $\pm$ 0,3	99,2 $\pm$ 0,1

Fonte: O autor (2022).

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta.

Tabela 3 – Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo tobramicina revestidas com quitosana.

Parâmetros	MESES			
	1	2	3	4
Ø (nm)	329,1	328,8	331,2	329,4
PDI	0,274	0,272	0,288	0,282
ζ (mV)	+44,3 $\pm$ 0,2	+42,9 $\pm$ 0,1	+43,5 $\pm$ 0,4	+42,3 $\pm$ 1,3
pH	4,9	5,0	5,2	5,2
Doseamento				
de fármaco (%)	98,64 $\pm$ 0,1	99,01 $\pm$ 0,2	98,92 $\pm$ 0,5	98,57 $\pm$ 0,3

Fonte: O autor (2022).

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ : potencial zeta.

Tabela 4 – Estabilidade de nanopartículas de zeína contendo CAZ e TOB revestidas com quitosana.

Parâmetros	MESES			
	1	2	3	4
Ø (nm)	340,1	342,3	343,4	347,2
PDI	0,217	0,222	0,228	0,229
ζ (mV)	+40,2 ± 1,0	+38,1 ± 0,3	+39,2 ± 0,7	+40,9 ± 0,8
pH	5,1	5,1	5,2	5,0
Doseamento da CAZ (%)	99,36 ± 0,1	99,19 ± 0,4	99,6 ± 0,5	98,71 ± 0,6
Doseamento da TOB (%)	99,19 ± 0,2	99,1 ± 0,9	99,03 ± 0,6	98,99 ± 0,4

Fonte: O autor (2022).

Ø: tamanho de partícula; PDI: índice de polidispersão; ζ: potencial zeta; CAZ: ceftazidima; TOB: Tobramicina.

CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram Ø em torno de 340 nm, PDI em torno de 0,2, ζ em torno de +40 mV, pH entre 4,8 e 5,3, e doseamento de CAZ e TOB entre 98 e 99%. Esses resultados apontam que o Ø, PDI, ζ, pH e doseamento não apresentaram mudanças significativas durante os 180 dias, indicando que a liofilização e as condições de armazenamento a 4°C não alteram a estabilidade das nanopartículas.

Alguns estudos avaliaram a estabilidade de nanopartículas de zeína revestidas por carboidratos. Yuan et al. (2019), Cai et al. (2020) e Zhang et al. (2021) desenvolveram nanopartículas de zeína contendo curcumina revestidas por dextrana, pectina e fucana, respectivamente. Os autores avaliaram a estabilidade durante 28 dias e observaram que não houve alterações significativas macroscópicas, de tamanho de partícula e no PDI.

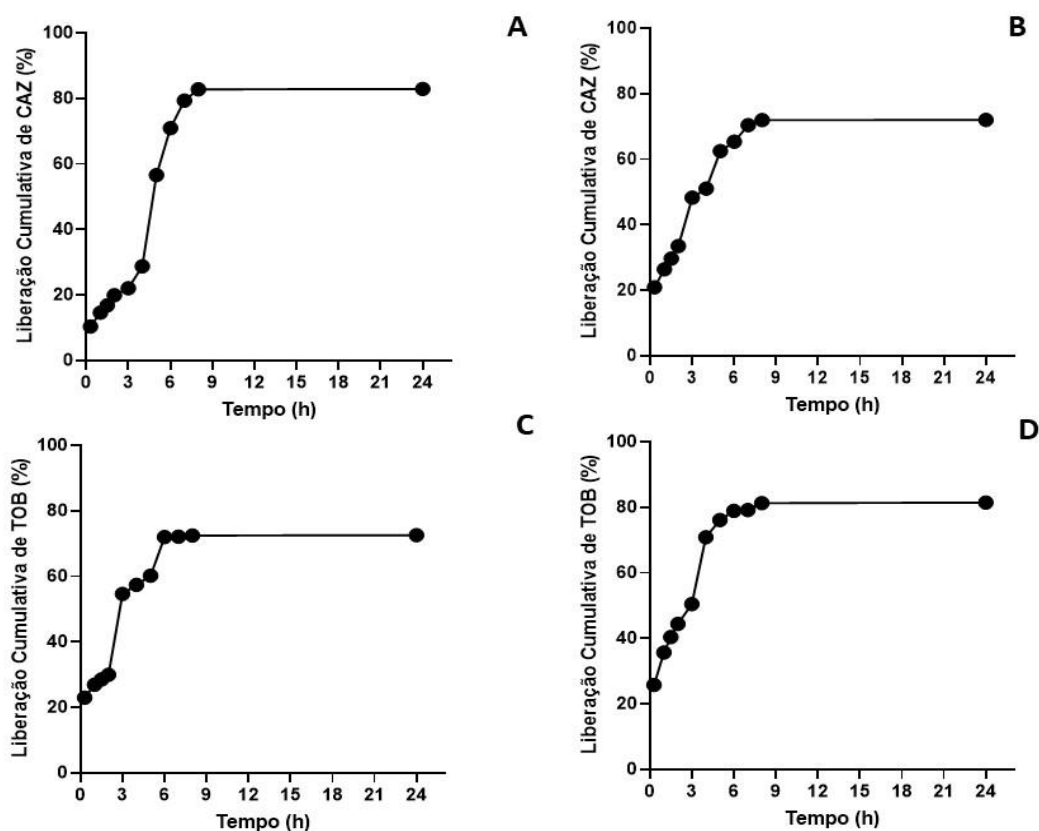
Outros estudos já demonstraram a estabilidade de nanopartículas de zeína revestidas quitosana, como, Chen et al. (2019) que encapsularam curcumina e piperina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, e Xião et al. (2020) que produziram nanopartículas de zeína associada a carboximetil quitosana contendo genisteína. Esses autores observaram que o Ø, PDI e ζ não apresentaram alterações significativas após o período de armazenamento de 60 dias.

Cinética de liberação *in vitro* de CAZ e TOB a partir das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana

Os resultados obtidos a partir da cinética de liberação de CAZ encapsulada em CAZ-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH mostram perfil cinético diferente no meio simulado gástrico (pH 1,2) e intestinal (6,8). Para cinética de CAZ a partir de CAZ-ZNP-CH foi observada a liberação em torno de 19% após a exposição por 2h em pH 1,2, em torno de 82% de liberação após a exposição em pH 6,8 e após 8h, a liberação controlada de CAZ é mantida até 24h (figura 8A).

Para a cinética de liberação de CAZ a partir de CAZ-TOB-ZNP-CH foi possível observar um efeito burst após 30 min com liberação em torno de 21% em pH 1,2. Após a exposição por 2h nesse pH foi liberado 34% de CAZ, e após 6h em pH 6,8 houve liberação de 70%, mantendo a liberação controlada de CAZ até 24h (figura 8B).

Figura 8 – Perfil de liberação de ceftazidima a partir de CAZ-ZNP-CH (A) e CAZ-TOB-ZNP-CH (B) e da tobramicina a partir de TOB-ZNP-CH (C) e CAZ-TOB-ZNP-CH (D) em meio gastrointestinal.



Fonte: O autor (2022).

Em relação a liberação de TOB contida em TOB-ZNP-CH, percebeu-se um

efeito burst em torno de 23% após 30 min, uma liberação de 30% após a exposição por 2h em pH 1,2, e em torno de 72% após a exposição em pH 6,8, seguida de liberação controlada até 24h (figura 8C). Para cinética de TOB a partir de CAZ-TOB-ZNP-CH foi possível observar um efeito burst após 30 min com liberação de 25%, uma liberação de 45% após a 2h em pH 1,2, e em torno de 81% de liberação após a exposição em pH 6,8, seguida de liberação controlada até 24h (figura 8D).

Com os resultados, observa-se que as formulações apresentaram perfil cinético com rápida liberação inicial, seguido de liberação controlada por até 24h nos fluidos gastrintestinais simulados. O perfil de liberação controlada dos antibióticos nos pH gástrico e intestinal simulados é influenciado pelo revestimento com a quitosana, como relatado nos estudos de Pauluk et al. (2019), Chen et al. (2020), Zhou et al. (2021) e Ruan et al. (2021) que encapsularam, resveratrol, β -caroteno, quercetina e astilbina, respectivamente, em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana. O revestimento com a quitosana permite a liberação controlada dos fármacos, pois forma-se uma camada em torno das nanopartículas de zeína que permite a liberação mais lenta dos princípios ativos (WANG et al., 2018a; RUAN et al., 2021).

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Avaliação da atividade antibacteriana

A CIM de CAZ variou entre 12,5 e > 50 $\mu\text{g/mL}$, e a CBM variou entre 25 e > 50 $\mu\text{g/mL}$. Para TOB, a CIM foi de 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, e a CBM de 12,5 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Para CAZ-ZNP-CH, a CIM foi de 3,12 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, e a CBM de 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$. Para TOB-ZNP-CH, a CIM foi de 1,56 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$, e a CBM de 6,25 e 25 $\mu\text{g/mL}$. CAZ-TOB-ZNP-CH apresentou CIM de 0,19/0,15 e 3,12/2,40 $\mu\text{g/mL}$, e a CBM de 1,56/ 1,21 e 6,25/ 4,87 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 5). As ZNP-CH não apresentaram atividade antibacteriana frente a nenhuma cepa testada (> 50 $\mu\text{g/mL}$).

Os isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* utilizados neste estudo apresentam perfil de resistência aos antimicrobianos e são bactérias de maior risco para saúde humana (OMS, 2017; WILLYARD, 2017). Nas últimas décadas, essas cepas estão adquirindo cada vez mais resistência, especialmente, as quinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; ZHANG et al., 2020).

Tabela 5 – Atividade antibacteriana da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.

	PA 19		PA 56		PA 69		K25 A2		K26 A2		K29 A2		K31 A2		K32 A2	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL															
CAZ	50	> 50	25	50	12,5	>50	50	> 50	50	> 50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
TOB	6,25	12,5	6,25	25	6,25	12,5	12,5	50	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	50	12,5	50
CAZ-ZNP-CH	6,25	25	3,12	12,5	3,12	12,5	6,25	25	6,25	12,5	6,25	12,5	3,12	12,5	12,5	25
TOB-ZNP-CH	1,56	12,5	1,56	6,25	3,12	12,5	1,56	6,25	3,12	6,25	1,56	6,25	1,56	25	3,12	6,25
CAZ-TOB-ZNP-CH	0,39 /	1,56/	0,19/	1,56 /	0,78/	3,12/	0,78/	3,12/	1,56/	3,12/	0,39/	1,56/	1,56/	6,25/	3,12/	6,25/
	0,30	1,21	0,15	1,21	0,60	2,40	0,60	2,40	1,21	2,40	0,30	1,21	1,21	4,87	2,40	4,87

Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos; K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos.

Os isolados de *P. aeruginosa* utilizados nesse estudo apresentam resistência às quinolonas, polimixinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e outros β -lactâmicos pela produção de β -lactamases e de metiltransferase 16S rRNA (COSTA-JUNIOR et al., 2021). Os isolados de *K. pneumoniae* desse estudo apresentam o gene *bla_{KPC-2}* que codifica a carbapenemase Ambler classe A e os genes *acrB* e *acrF* que codificam a produção de bombas de efluxo, conferindo resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas (SCAVUZZI et al., 2017). O acúmulo de vários mecanismos de resistência resulta em infecções com altos índices de mortalidade devido à escassez e ineficiência das terapias, sendo necessário o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (LUEPKE et al., 2017; WANG et al., 2018b; ISLER et al., 2019; COSTA-JÚNIOR et al., 2021).

Como estratégia terapêutica para o combate de infecções bacterianas, alguns estudos já foram desenvolvidos testando a atividade antibacteriana de CAZ ou TOB encapsulados isoladamente em nanocarreadores, em especial lipossomas, frente a cepas bacterianas com e sem perfil de resistência aos antibióticos (TORRES et al., 2012; YE et al., 2018; WANG et al., 2018c; HEDAYATI CH et al., 2020).

Torres et al. (2012) encapsularam CAZ em lipossomas (LIPO-CAZ) e testaram o potencial antimicrobiano frente a cepa de *P. aeruginosa* SPM-1 (isolado clínico resistente a cefepima e ceftazidima). CAZ e LIPO-CAZ apresentaram CIM de 1024 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$ frente a *P. aeruginosa* SPM-1, respectivamente, e a CBM foi de 1024 $\mu\text{g/mL}$. Hedayati Ch et al. (2020) testaram a atividade de TOB encapsulada em niossomas frente a cepas de *P. aeruginosa* resistente aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. A CIM para TOB variou entre 2 e 8 $\mu\text{g/mL}$ e para os niossomas contendo TOB foi observada a variação de 0,125 a 2 $\mu\text{g/mL}$. A CBM apresentou variação de 2 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para TOB e de 0,125 a 4 $\mu\text{g/mL}$ para niossomas contendo TOB.

Os dados mostram que CAZ ou TOB encapsulados em nanocarreadores apresentam potencial antibacteriano, porém os nanocarreadores desenvolvidos por Torres et al. (2012) e Hedayati Ch et al. (2020) são lipídicos e sem revestimento polimérico, por isso, são instáveis porque sofrem rápida digestão enzimática e ação dos sais biliares que interagem com os lipossomas como surfactantes no trato

gastrointestinal (IWANAGA et al., 1997; WU; LU; QI, 2015). Assim, esses lipossomas não podem ser administrados via oral diferente das CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH.

Contudo, CAZ-TOB-ZNP-CH apresentaram uma maior atividade antibacteriana *in vitro* comparado a CAZ-ZNP-CH ou TOB-ZNP-CH, evidenciando que a combinação de antibióticos potencializa o efeito antimicrobiano. Alguns estudos realizaram a co-encapsulação de agentes antibacterianos e avaliaram sua ação. Schiffelers et al. (2001) desenvolveram lipossomas encapsulando gentamicina e ceftazidima (LE-GN-CZ) testando sua atividade antibacteriana *in vivo* em camundongos com infecção pulmonar causada por cepas resistentes de *K. pneumoniae*. LE-GN-CZ (2,5/1,6 mg/kg) em dose única aplicada por 14 dias aumentou a sobrevivência dos animais em comparação com as formulações LE-GN (20 mg/kg) e LE-CZ (12,5 mg/kg) aplicadas isoladamente, demonstrando que a interação sinérgica eliminou a infecção promovida por *K. pneumoniae* resistente.

Ye et al. (2018) encapsularam claritromicina (CLA) e TOB em lipossomas (TOB/CLA-CPROLips) e testaram a atividade antibacteriana frente a cepa *P. aeruginosa* PAO1. CLA, TOB e TOB/CLA-CPROLips tiveram CIM >16 µg/mL, 16 µg/mL, 1 µg/mL, respectivamente. Wang et al. (2018c) desenvolveram lipossomas contendo colistina e ciprofloxacina para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* H131300444 e *P. aeruginosa* H133880624 multirresistentes. A CIM da colistina foi de 128 µg/mL frente a ambas as cepas, já a ciprofloxacina foi de 16 µg/mL para *P. aeruginosa* H133880624 e 8 µg/mL para *P. aeruginosa* H131300444. A combinação dos dois fármacos co-encapsulados nos lipossomas na concentração de 8 µg/mL erradicou o crescimento das duas cepas no período de 24h. A co-encapsulação destes fármacos nos nanocarreadores desenvolvidos por Schiffelers et al. (2001), Ye et al. (2018), Wang et al. (2018c) demonstrou potencial antibacteriano, assim como CAZ-TOB-ZNP-CH. Porém, a utilização de CAZ-TOB-ZNP-CH torna-se promissora para uma administração oral e nasal, diferentemente, dos lipossomas desenvolvidos pelos autores acima citados.

Nesse estudo foi observado o potencial antibacteriano de todas as formulações encapsulando CAZ e TOB, especialmente, a formulação contendo os dois fármacos. Possivelmente, essa potencialização da ação antibacteriana aconteceu devido a associação de dois mecanismos de ação diferentes, uma vez que CAZ atua inibindo

a síntese do peptidoglicano da parede celular das bactérias e a TOB induz a formação de proteínas não funcionais comprometendo o metabolismo bacteriano, levando à morte bacteriana (BASSETTI et al., 2015; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016; BASSETTI et al., 2019).

Nesse sentido, a terapia combinada é considerada uma estratégia eficaz para o tratamento das infecções bacterianas multidroga-resistentes e a administração de fármacos combinados num veículo único, possibilita a atuação sinérgica dos diferentes mecanismos de ação, a entrega dos fármacos nos sítios infecciosos, a exposição adequada do paciente ao medicamento, a diminuição do estímulo ao desenvolvimento da resistência bacteriana (NKANGA et al., 2019; WALVEKAR; GANNIMANI; GOVENDER, 2019; COSTA-FERNANDEZ et al., 2021), tornando a co-encapsulação em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana uma alternativa promissora para infecções respiratórias e intestinais resistentes.

Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

Dos 8 isolados clínicos bacterianos avaliados neste estudo, 2 cepas de *P. aeruginosa* e 4 cepas de *K. pneumoniae* apresentaram produção de biofilme moderada ou forte (tabela 6).

Tabela 6 – Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* resistentes aos antibióticos.

CEPA BACTERIANA	CLASSIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME
K 25 A2	Forte
K 26 A2	Moderada
K 29 A2	Moderada
K 31 A2	Moderada
K 32 A2	Fraca
PA 19	Forte
PA 56	Fraca
PA 69	Moderada

Fonte: O autor (2022).

K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antibióticos; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antibióticos.

O biofilme é um fator de virulência que apresenta relevância clínica, pois está associado às infecções da assistência à saúde causando preocupação para os profissionais de saúde e a população (BODELÓN et al., 2016; PIPERAKI et al., 2017; SIMON et al., 2019). A baixa penetração de antibióticos através da matriz do biofilme e a presença de células persistentes contribuem para a resistência de bactérias formadoras de biofilme aos antibióticos, levando a infecções persistentes que causam hospitalização, sofrimento do paciente e redução da qualidade de vida (RAMASAMY; LEE, 2016; CH'NG et al., 2019).

Biofilmes estão constantemente associados a doenças humanas, incluindo infecções de implantes cirúrgicos, doenças gengivais, infecções do trato digestivo, urinário e respiratório induzidas, principalmente, por cateter e outros dispositivos invasivos (VON ROSENVINGE et al., 2013). As infecções causadas por essas bactérias tornam-se mais graves quando elas colonizam o TGI de pacientes hospitalizados e imunocomprometidos (LI et al., 2017; PIPERAKI et al., 2017; OLIVARES et al., 2020). Além disso, os biofilmes têm sido associados ao início e desenvolvimento do câncer no estômago, intestino delgado e cólon pela produção de genotoxinas, além de estarem associados a doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa e doença de Crohn causada por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (LI et al., 2017; MOTTA et al., 2021; DE SOUZA et al., 2022).

No trato respiratório, *P. aeruginosa* produz biofilme nos seios paranasais, tornado-se um reservatório, em abscesso pulmonar, na pneumonia associada à ventilação mecânica, na bronquiectasias e em infecções pulmonares crônicas associadas a fibrose cística (FAURE, KWONG, NGUYEN, 2018; VESTBY et al., 2020). Enquanto, *K. pneumoniae* está associada a produção de biofilme na pneumonia promovendo patogenicidade e cronicidade das infecções respiratórias (LOBO et al., 2018; LENCHENKO et al., 2020).

A capacidade de produção de biofilme por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* está associada ao aumento da morbidade e mortalidade em pacientes, especialmente, nos portadores de outras infecções, como a COVID-19 (MAURICE, BEDI, SADIKOT, 2017; QU et al., 2021; HOSODA et al., 2021). Desse modo, é necessário um tratamento com potencial para eliminar este microrganismo, inibir a formação de

biofilme e/ou erradicar os biofilmes já formados (PIPERAKI et al., 2017; LI et al., 2017; OLIVARES et al., 2020).

Avaliação da inibição da formação do biofilme

A inibição da formação do biofilme por CAZ, TOB, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH ocorreu de modo dependendo da dose, com maior inibição na CIM e menor inibição na CIM/16 (figura 9). Foi observada uma inibição da formação do biofilme entre 5% e 80% para CAZ, entre 4% e 88% para TOB, entre 49% e 93% para CAZ-ZNP-CH, entre 53% e 100% para TOB-ZNP-CH e entre 69% e 100% para CAZ-TOB-ZNP-CH (figura 9). CAZ e TOB encapsuladas nas nanopartículas apresentaram CIMB menores quando comparados aos fármacos livres, além disso CAZ-TOB-ZNP-CH exibiram valores de CIMB de 10 a 35 vezes menores que os valores de CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH (tabela 7). ZNP-CH não inibiu a formação de biofilme nas concentrações testadas para nenhuma das cepas utilizadas nesse estudo.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima da inibição de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.

AMOSTRAS	CIMB (µg/mL)					
	PA 19	PA 69	K A2 25	K A2 26	K A2 29	K A2 31
CAZ	>50	>12,5	50	50	50	>50
TOB	>6,25	>6,25	3,12	6,25	6,25	6,25
CAZ-ZNP-CH	0,781	0,781	1,56	1,56	1,56	1,56
TOB-ZNP-CH	0,195	0,39	0,39	0,39	0,195	0,39
CAZ-TOB-ZNP-CH	0,024/ 0,018	0,048/ 0,037	0,048/ 0,037	0,097/ 0,075	0,024/ 0,018	0,097/ 0,075

Fonte: O autor (2022).

CIMB: Concentração inibitória mínima da inibição de biofilme; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos; K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos.

A produção de biofilme é um fator importante na sobrevivência e virulência de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em condições ambientais adversas, incluindo ambientes hospitalares, principalmente, na unidade de terapia intensiva (UTI) e centros cirúrgicos, facilitando o estabelecimento e manutenção de infecções crônicas e persistentes (GAJDÁCS et al., 2021).

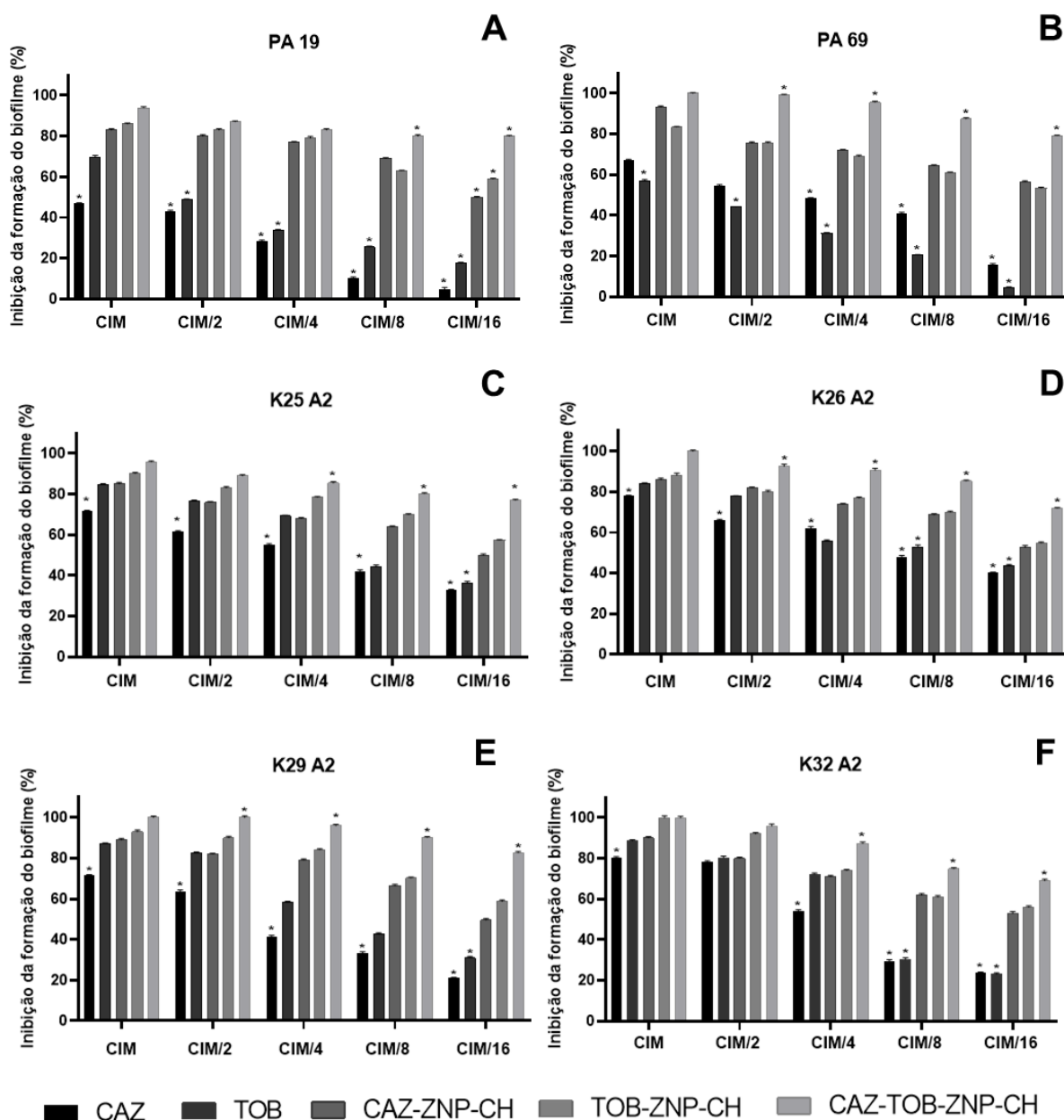
Com objetivo de inibir a formação do biofilme, alguns estudos foram desenvolvidos propondo a co-encapsulação de agentes antimicrobianos em nanocarreadores. Mahdiun et al. (2017) encapsularam bismuto-etanoditiol (BiEDT) e TOB em niossomas (Nio-BiEDT-TOB) e testaram a atividade antibiofilme em concentrações subinibitórias (CIM/2, CIM/4, CIM/8, CIM/16) frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853. A inibição do BiEDT, TOB e Nio-BiEDT-TOB frente a essa bactéria variou entre 35% e 60%, 45% e 63%, 45% e 80%, respectivamente.

Ye et al. (2018) encapsularam CLA e TOB em lipossomas (TOB/CLA-CPROLips) e testaram a inibição de formação de biofilme frente a cepa *P. aeruginosa* PAO1. CLA, TOB e TOB/CLA-CPROLips em concentrações subinibitórias inibiram a formação do biofilme em 2% a 5%, 5% a 15% e 15% a 30%, respectivamente. Os estudos de Mahdiun et al. (2017) e de Ye et al. (2018) apresentam percentuais de inibição da formação de biofilme inferiores aos observados para CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH, indicando que a encapsulação de CAZ e TOB isoladas ou em combinação em nanopartículas de zeína revestidos com quitosana apresentam maior potencial de atividade antibiofilme, além de poderem ser administrados por via oral e nasal.

As características físico-químicas das formulações influenciam na atividade antibiofilme. O revestimento das nanopartículas de zeína pela quitosana confere uma carga superficial positiva à CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH, possibilitando a interação eletrostática desses nanocarreadores com a superfície das células bacterianas carregadas negativamente. Essa interação pode reduzir a adesão

das bactérias às superfícies impedindo a formação do biofilme (RAMOS et al., 2018; HU et al., 2019).

Figura 9 – Inibição da formação do biofilme de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* após o tratamento com ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas revestidas com quitosana.



Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a

tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos; K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre os tratamentos na mesma concentração ($p < 0,05$).

Estudos da literatura comprovaram a atividade antibiofilme de CAZ e TOB. CAZ reduz a expressão do gene *ibpA* diminuindo a motilidade bacteriana; reduz a expressão dos genes de adesão *fimG*, *csgA* e *ybgD*; reduz a expressão do gene de motilidade *flgA*; e os genes reguladores do *Quorum Sensing* (QS), processo de comunicação entre as células bacterianas; *luxS* e *luxR*; aumenta a expressão do gene *tnaA* de síntese de indol, modulando negativamente a produção de biofilme; e inibe a produção de bis-(3',5')-cíclico dimérico-monofosfato de guanosina (c-di-GMP) que promove a biosíntese de exopolissacarídeos como Pel e alginato, modulando negativamente a formação de biofilme (OTANI et al., 2018, SUN et al., 2019; FENG et al., 2021). Quanto a atividade antibiofilme de TOB, este fármaco suprime a expressão gênica de *pelA* e *pslA*, genes codificadores da síntese dos exopolissacarídeos Pel e Psl que promovem a fixação das bactérias nas superfícies, assim, inibindo a formação de biofilme (HEDAYATI CH et al., 2020).

Assim, sugerimos que as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo CAZ e/ou TOB inibem a formação do biofilme pela interação eletrostática da superfície das nanopartículas com a superfície bacteriana e pela modulação na expressão gênica promovida pelos fármacos.

Avaliação da erradicação do biofilme

A erradicação do biofilme por CAZ, TOB, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH também ocorreu de modo dependendo da dose, com maior inibição na $16 \times \text{CIM}$ e menor inibição na CIM (figura 10). Foi observada a erradicação do biofilme entre 18% e 68% para CAZ, entre 27% e 79% para TOB, entre 40% e 81% para CAZ-ZNP-CH, entre 43% e 84% para TOB-ZNP-CH e entre 58% e 92% para CAZ-TOB-ZNP-CH (figura 10). CAZ e TOB encapsuladas nas nanopartículas apresentaram CEMB menores quando comparados aos fármacos livres, além disso CAZ-TOB-ZNP-CH exibiram valores de CIMB de 8 a 300 vezes menores que os valores de CAZ-ZNP-

CH e TOB-ZNP-CH (tabela 8). ZNP-CH não apresentou atividade antibiofilme nas concentrações testadas para nenhuma das cepas utilizadas nesse estudo.

Os biofilmes estão associados às falhas terapêuticas antibacterianas, principalmente nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causando maiores tempos de internação e taxas de morbimortalidade elevadas, além de ônus econômico (PERCIVAL, 2017; SRINIVASAN et al., 2021). O tratamento dessas infecções representa um desafio devido à escassez de fármacos que erradique o biofilme (YAN, BASSLER, 2019; SRINIVASAN et al., 2021).

Tabela 8 – Concentração de erradicação mínima de biofilme da ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.

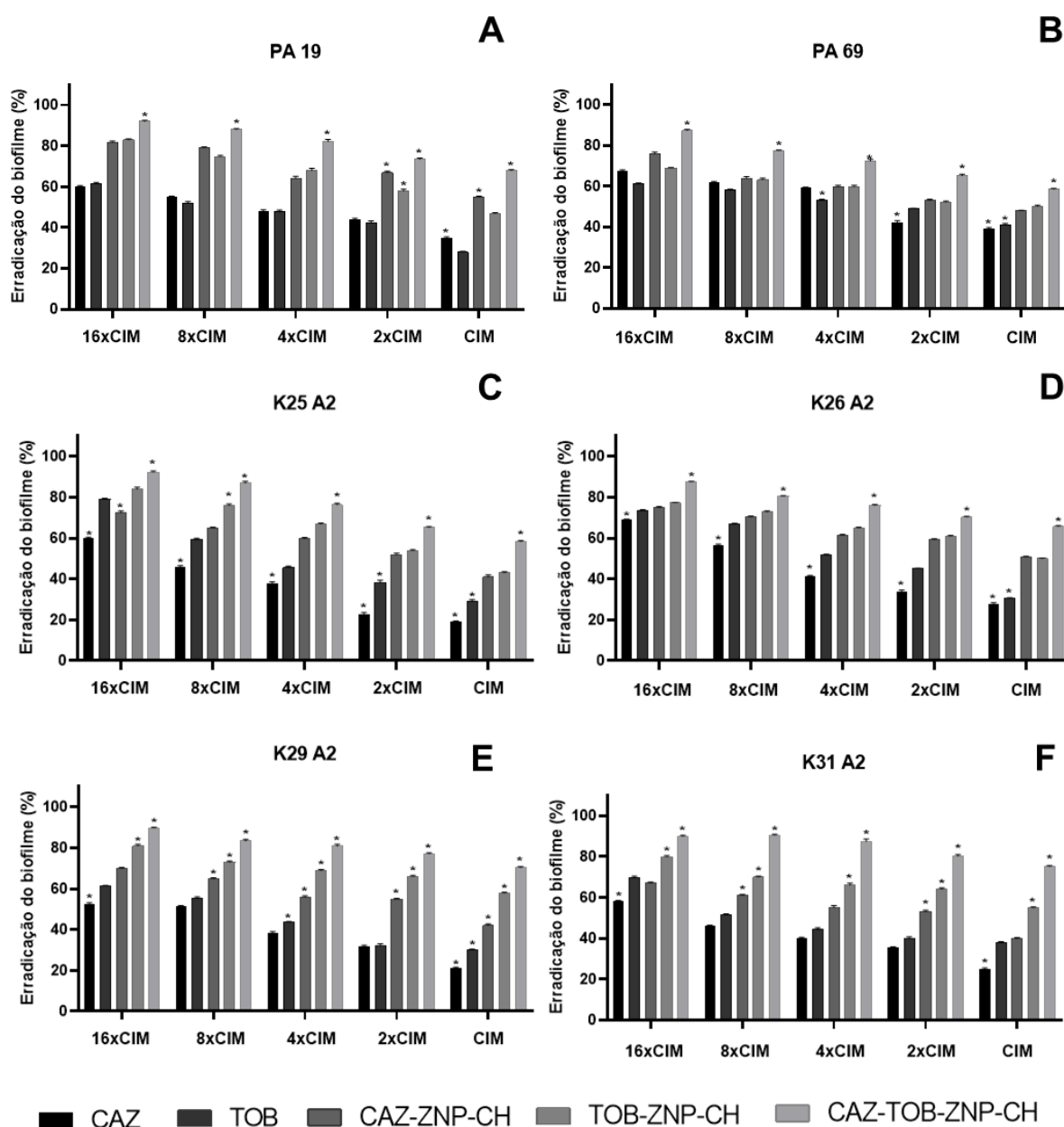
AMOSTRAS	CEMB (µg/mL)					
	PA 19	PA 69	K A2 25	K A2 26	K A2 29	K A2 31
CAZ	>800	>200	>800	>800	>800	>800
TOB	>100	>100	200	200	>200	>200
CAZ-ZNP-CH	50	50	50	100	100	50
TOB-ZNP-CH	12,5	50	12,5	25	12,5	12,5
CAZ-TOB-ZNP-CH	0,78/ 0,60	3,12/ 2,40	1,56/ 1,20	6,24/ 4,84	0,39/ 0,30	1,56/ 1,21

Fonte: O autor (2022).

CEMB: Concentração de erradicação mínima de biofilme; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos; K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos.

Na perspectiva de erradicar os biofilmes, Halwani et al. (2009) desenvolveram lipossomas encapsulando bismuto-tiol e tobramicina (LipoBiEDT-TOB) e avaliaram a atividade antibiofilme frente a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos (PA-48912-1, PA-4892-2 e PA-48913) isoladas de pacientes com fibrose cística. As formulações encapsulando os antimicrobianos isoladamente e os fármacos livres não erradicaram o biofilme nas concentrações testadas, no entanto, LipoBiEDT-TOB apresentou CEMB de 64 µg/mL para PA-48912-1, 256 µg/mL para PA-4892-2 e 512 µg/mL para PA-48913.

Figura 10 – Erradicação do biofilme produzidos por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* após o tratamento com ceftazidima e tobramicina encapsuladas em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana.



Fonte: O autor (2022).

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CAZ: ceftazidima; TOB: tobramicina; ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana; CAZ-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a ceftazidima; TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo a tobramicina; CAZ-TOB-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina; PA: *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antimicrobianos; K: *Klebsiella pneumoniae* resistente aos antimicrobianos. O asterisco (*) indica diferença estatística significativa entre os tratamentos na mesma concentração ($p < 0,05$).

O estudo de Halwani et al. (2009) não apresentou CEMB para as formulações encapsulando apenas um fármaco diferente dos resultados para CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH (12,5 a 50 µg/mL) que erradicaram o biofilme. Além disso, os valores de CEBM de CAZ-TOB-ZNP-CH mostram que essa formulação tem maior potencial de erradicar o biofilme comparado à formulação desenvolvida por Halwani et al. (2009).

Alguns aspectos físico-químicos das formulações, como o tamanho de partícula e potencial zeta, são fundamentais para a erradicação do biofilme. No presente estudo, o diâmetro médio das nanopartículas variou entre 314 e 336 nm. O tamanho das nanopartículas colabora na penetração dos fármacos pela matriz exopolissacarídica, uma vez que as NPs entre 10 e 500 nm penetram pelos canais de água e poros dos biofilmes (LIU et al., 2019; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2020).

No presente estudo, o potencial zeta das nanopartículas variou entre +39 e +50 mV. A carga de superfície das nanopartículas constitui outro parâmetro importante para penetração nos biofilmes, pois os nanocarreadores com carga positiva apresentam maior atração pela superfície do biofilme (carga negativa), maior possibilidade de penetração e acumulação dos fármacos no interior dos biofilmes podendo erradicá-los (WANG, GUPTA, ROTELLO, 2016; LIU et al., 2019).

Além disso, para erradicar o biofilme torna-se essencial a interação direta do nanocarreador com células bacterianas do biofilme e/ou com as bactérias que se destacam da matriz polimérica, a interação ou desnaturação da matriz de EPS, além da indução de morte celular pela ação dos antimicrobianos (RAMOS et al., 2018; LIU et al., 2019; MALAEKEH-NIKOUEI et al., 2020). Assim, as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo CAZ e TOB desenvolvidas neste estudo são candidatas na terapêutica para infecções causadas por *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* formadoras de biofilme (RAMASAMY, LEE, 2016; XIU et al., 2020).

Conclusão

No presente estudo, inovadoras nanopartículas de zeína revestidas com quitosana co-encapsulando ceftazidima e tobramicina pelo método da nanoprecipitação foram obtidas. As nanopartículas apresentaram características apropriadas para administração por via oral ou nasal com tamanho de partículas entre 300 e 350 nm e alta eficiência de encapsulação dos fármacos, estabilidade térmica e em meio gástrico e intestinal simulados, baixa citotoxicidade em linhagens celulares humanas. A CAZ e TOB encapsuladas separadamente e co-encapsuladas nas nanopartículas de zeína revestidas de quitosana apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* frente a isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes aos antibióticos, além potencializar a inibição da formação do biofilme e a erradicação de biofilme. As nanopartículas CAZ-TOB-ZNPs/CH se oferecem como uma estratégia terapêutica promissora para infecções intestinais e respiratórias causadas por *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* resistentes aos antibióticos e produtoras de biofilme.

Financiamento

O presente projeto foi financiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil (MCTI, SisNANO/LARNano-UFPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq nº 40228/2013-2 e CNPq nº 426065/2018-2].

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE) (Recife, PE, Brasil) pelo suporte durante a execução de todo o projeto. LAAC agradece ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Referências

- ABOUNASSIF, Mohammad A.; MIAN, Neelofur Abdul Aziz; MAIN, Mohammad Saleem. Analytical profile of ceftazidime. In: **Analytical Profiles of Drug Substances**. Academic Press, 1990. p. 95-121.
- ALBANO, Mariana et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. Microbial pathogenesis, v. 126, p. 231-238, 2019.

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, n.1, p. 273-286, 2018.

AL-NEMRAWI, Nusaiba K. et al. Low molecular weight chitosan-coated PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of tobramycin for cystic fibrosis. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 28, 2018.

ANICUTA, Stoica-Guzun et al. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for characterization of antimicrobial films containing chitosan. **Analele Universităţii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară**, v. 2010, p. 1234-40, 2010.

ASHURST, J. V.; DAWSON, A. In: ASHURTS, J. V.; DAWSON, A. **Klebsiella Pneumoniae**. StatPearls Publishing: Treasure Island, 2018.

ASWATHY, R. G. et al. Biocompatible fluorescent zein nanoparticles for simultaneous bioimaging and drug delivery application. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 025006, 2012.

BALASUBRAMANIAN, Balamuralikrishnan; PARK, Jae Won; KIM, In Ho. Evaluation of the effectiveness of supplementing micro-encapsulated organic acids and essential oils in diets for sows and suckling piglets. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 626-633, 2016.

BAO, Xiaoyan; QIAN, Kang; YAO, Ping. Insulin-and cholic acid-loaded zein/casein-dextran nanoparticles enhance the oral absorption and hypoglycemic effect of insulin. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 31, p. 6234-6245, 2021.

BASSETTI, M. et al. Treatment of infections due to mdr gram-negative bacteria. **Frontiers in medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. **Current opinion in critical care**, v. 21, n. 5, p. 402-411, 2015.

BERNOCCHI, Beatrice; CARPENTIER, Rodolphe; BETBEDER, Didier. Nasal nanovaccines. **International journal of pharmaceutics**, v. 530, n. 1-2, p. 128-138, 2017.

BODELÓN, G. et al. Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. **Nature materials**, v. 15, n. 11, p. 1203-1211, 2016.

BÖTTGER, E. C.; CRICH, D. Aminoglycosides: Time for the Resurrection of a Neglected Class of Antibacterials?. **ACS infectious diseases**, v. 6, n. 2, p. 168-172, 2019.

CAI, Taimei et al. A novel pectin from Akebia trifoliata var. australis fruit peel and its use as a wall-material to coat curcumin-loaded zein nanoparticle. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 40-49, 2020.

CAO, S. et al. Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 1-11, 2019.

CARRASCO-SANDOVAL, Jonathan et al. Bioaccessibility of different types of phenolic compounds co-encapsulated in alginate/chitosan-coated zein nanoparticles. **LWT**, v. 149, p. 112024, 2021.

CASETTARI, Luca; ILLUM, Lisbeth. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 189-200, 2014.

CAVALCANTI, Iago Dillion Lima et al. Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, p. 102698, 2021.

CH'NG, Jun-Hong et al. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 82-94, 2019.

CHANG, S. C.; LEE, M. J.; LIN, H. Preparation of nano-and micrometric ceftazidime particles with supercritical anti-solvent technique. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 38, p. 14835-14842, 2008.

CHEN, Shuai et al. Core–Shell Biopolymer Nanoparticles for Co-Delivery of Curcumin and Piperine: Sequential Electrostatic Deposition of Hyaluronic Acid and Chitosan Shells on the Zein Core. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 41, p. 38103-38115, 2019.

CHEN, Shuai et al. Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. **Carbohydrate polymers**, v. 236, p. 116090, 2020.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, p. 1-13, 2016.

CLEMENTINO, Adryana Rocha et al. Structure and fate of nanoparticles designed for the nasal delivery of poorly soluble drugs. **Molecular Pharmaceutics**, v. 18, n. 8, p. 3132-3146, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2021.

COSTA-FERNANDEZ, Sandra et al. Nanostructured lipid carriers containing chitosan or sodium alginate for co-encapsulation of antioxidants and an antimicrobial agent for potential application in wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 668-680, 2021.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias et al. Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *blaKPC* and/or *blaVIM-2* genes in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2021

DA ROSA, Cleonice Gonçalves et al. Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337-344, 2015.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DASH, Alekha K. Tobramycin. In: **Analytical profiles of drug substances and excipients**. Academic Press, 1996. p. 579-613.

DASH, Alekha K.; SURYANARAYANAN, Raj. Solid-state properties of tobramycin. **Pharmaceutical research**, v. 8, n. 9, p. 1159-1165, 1991.

DE LEO, L. *et al.* Fasting increases tobramycin oral absorption in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1644-1646, 2010.

DE SANTANA, Maria Silmara Alves *et al.* Stability of ceftazidime pentahydrate investigated by thermal analysis techniques. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 109, n. 3, p. 1324-1329, 2020.

DE SOUSA MONTEIRO, Aliny Abreu *et al.* Effect of chemical modification on the solubility and swelling of microspheres based on carboxymethyl cashew gum and chitosan. **POLIMEROS-CIENCIA E TECNOLOGIA**, v. 25, p. 31-39, 2015.

DE SOUZA, Jaqueline Barbosa; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly; CAVALCANTI, Isabella Macário Ferro. Strategies for the treatment of colorectal cancer caused by gut microbiota. *Life Sciences*, p. 120202, 2021.

DEACON, Jill *et al.* Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). **Journal of Controlled Release**, v. 198, p. 55-61, 2015.

DUMITRU, Irina Magdalena *et al.* Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Associated with COVID-19. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 561, 2021.

ENGLAND, R. J. A. *et al.* Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67-68, 1999.

FAURE, Emmanuel; KWONG, Kelly; NGUYEN, Dao. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections: how to adapt within the host?. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2416, 2018.

FENG, Wei *et al.* Effect of sub-minimal inhibitory concentration ceftazidime on the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104748, 2021.

FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2297-2314, 2016.

FUSCO, Alessandra *et al.* The intestinal biofilm of *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus* is inhibited by antimicrobial peptides HBD-2 and HBD-3. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 6595, 2021.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11-27, 2016.

HALWANI, Majed *et al.* Bismuth–thiol incorporation enhances biological activities of liposomal tobramycin against bacterial biofilm and quorum sensing molecules production by *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of pharmaceutics**, v. 373, n. 1-2, p. 141-146, 2009.

HAMED, H. *et al.* Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 445-460, 2018.

HEDAYATI CH, Mojtaba *et al.* Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 6, p. 966-980, 2020.

HOFF, Ryan T.; PATEL, Ami; SHAPIRO, Alan. *Pseudomonas aeruginosa*: An Uncommon Cause of Antibiotic-Associated Diarrhea in an Immunocompetent Ambulatory Adult. **Case reports in gastrointestinal medicine**, v. 2020, 2020.

HONG, Peng-Zhi et al. Thermogravimetric analysis of chitosan. **Journal of applied polymer science**, v. 105, n. 2, p. 547-551, 2007.

HOSODA, Tomohiro et al. COVID-19 and fatal sepsis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, Japan, 2020. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 2, p. 556, 2021.

HU, Chen et al. Nanoparticles for the treatment of oral biofilms: Current state, mechanisms, influencing factors, and prospects. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 24, p. 1901301, 2019.

IRACHE, Juan M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, Carlos J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. *Nanomedicine*, v. 12, n. 11, p. 1209-1211, 2017.

ISLER, B. *et al.* New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1-17, 2019.

IWANAGA, Kazunori et al. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. **International journal of pharmaceuticals**, v. 157, n. 1, p. 73-80, 1997.

JAMIL, Bushra et al. Cefazolin loaded chitosan nanoparticles to cure multi drug resistant Gram-negative pathogens. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 682-691, 2016.

JI, N. *et al.* Chitosan coating of zein-carboxymethylated short-chain amylose nanocomposites improves oral bioavailability of insulin in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 313, n. 1, p. 1-13, 2019.

JIANG, Fangyuan et al. Fabrication and characterization of zein-alginate oligosaccharide complex nanoparticles as delivery vehicles of curcumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 342, p. 116937, 2021.

KERCKHOFFS, Angèle PM et al. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 2, p. 236-245, 2011.

KHALID, M.; EL-SAWY, Hossam S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International journal of pharmaceuticals**, v. 528, n. 1-2, p. 675-691, 2017.

KHAN, Muhammad Aslam et al. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol. **Journal of Food Engineering**, v. 258, p. 45-53, 2019.

LABIB, G. Overview on zein protein: A promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering. **Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 1, p. 65-75, 2018.

LANSBURY, Louise et al. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 81, n. 2, p. 266-275, 2020.

- LAWRIE, Gwen et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533-2541, 2007.
- LENCHENKO, Ekaterina et al. Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Veterinary world**, v. 13, n. 1, p. 197, 2020.
- LI, Shan et al. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 1, p. 18-30, 2017.
- LIANG, J. et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 19-24, 2017.
- LIU, Qianyan et al. Zein/fucoidan-based composite nanoparticles for the encapsulation of pterostilbene: Preparation, characterization, physicochemical stability, and formation mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, n. 1, p. 461-470, 2020.
- LIU, Weilin et al. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. **Food chemistry**, v. 196, p. 396-404, 2016.
- LIU, Yong et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 428-446, 2019.
- LOBO, Amar Sunil et al. Biofilm formation and extended spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates from respiratory samples in a tertiary care hospital. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, January-March, 2018; 3(1):6-9
- LU, Q. et al. Preparation and physicochemical characteristics of anallicin nanoliposome and its release behavior. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 686-695, 2014.
- LUEPKE, K. H. et al. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.
- LUO, Y. et al. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011.
- MADKOUR, Loutfy H. Nanoparticles as Targeted Drug Co-Delivery in Cancer Therapeutics. **Chronicles of Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 800-804, 2019.
- MAHDIUN, Faeze et al. The effect of tobramycin incorporated with bismuth-ethanedithiol loaded on niosomes on the quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 129-135, 2017.
- MALAEKEH-NIKOUEI, Bizhan et al. The role of nanotechnology in combating biofilm-based antibiotic resistance. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 101880, 2020.
- MANDELL, L. A.; NIEDERMAN, M. S. Aspiration pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 7, p. 651-663, 2019.

MARASINI, Nirmal; SKWARCZYNSKI, Mariusz; TOTH, Istvan. Intranasal delivery of nanoparticle-based vaccines. **Therapeutic delivery**, v. 8, n. 3, p. 151-167, 2017.

MAURICE, Nicholas M.; BEDI, Brahmchetna; SADIKOT, Ruxana T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 58, n. 4, p. 428-439, 2018.

MICHELON, H. *et al.* Efficacy and safety of subcutaneous administration of ceftazidime as a salvage therapy in geriatrics: a case report. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2019.

MISTRY, Alpesh *et al.* Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium. **Journal of drug targeting**, v. 17, n. 7, p. 543-552, 2009.

MORAGA, Paula *et al.* Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1151-1210, 2017.

MORENO, L. C. G. I. *et al.* Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International journal of pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.

MORENO-SASTRE, M. *et al.* Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. **International journal of pharmaceutics**, v. 498, n. 1-2, p. 263-273, 2016.

MOTTA, Jean-Paul *et al.* Gastrointestinal biofilms in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 5, p. 314-334, 2021.

MOUSSOUT, H. *et al.* Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, n. 1, p. 1-9, 2016.

NIETO, J. M.; PENICHE-COVAS, C.; DEL BOSQUE, J. Preparation and characterization of a chitosan-Fe (III) complex. **Carbohydrate polymers**, v. 18, n. 3, p. 221-224, 1992.

NKANGA, Christian I. *et al.* Co-encapsulation of rifampicin and isoniazid in crude soybean lecithin liposomes. **South African Journal of Chemistry**, v. 72, p. 80-87, 2019.

OLIVARES, Elodie *et al.* Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2894, 2020.

OTANI, Satoshi *et al.* Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 428-433, 2018.

PARDESHI, Chandrakantsing V.; BELGAMWAR, Veena S. Controlled synthesis of N, N, N-trimethyl chitosan for modulated bioadhesion and nasal membrane permeability. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 933-944, 2016.

PARK, C.; PARK, D.; KIM, B. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food science and biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1725-1733, 2015.

PARK, J. H. et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 28-41, 2010.

PAULUK, Daniele et al. Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food hydrocolloids**, v. 94, p. 411-417, 2019.

PERCIVAL, S. L. Importance of biofilm formation in surgical infection. **Journal of British Surgery**, v. 104, n. 2, p. e85-e94, 2017.

PETTIGREW, Melinda M. et al. Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 4, p. 604-613, 2019.

PIEL, Géraldine et al. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide; isolation and characterization of nimesulide–L-lysine–cyclodextrin complexes. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 4, p. 475-480, 1997.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 7, p. 641678, 2009.

PIPERAKI, E. T. et al. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

QU, Jiuxin et al. Persistent bacterial coinfection of a COVID-19 patient caused by a genetically adapted *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonizer. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 129, 2021.

QURASHI, M. S.; JONES, N. S.; MASON, J. The rheology of nasal mucus: a review. **Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**, v. 23, n. 5, p. 403-413, 1998.

RAMASAMY, Mohankandhasamy; LEE, Jintae. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

RAMOS, Matheus Aparecido Dos Santos et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1179, 2018.

RAO, Krishna et al. Enterobacterales infection after intestinal dominance in hospitalized patients. **Msphere**, v. 5, n. 4, p. e00450-20, 2020.

REYNOLDS, Dan; KOLLEF, Marin. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117-2131, 2021.

RODANTE, F.; MARROSU, G. Thermal analysis of some α -amino acids using simultaneous TG-DSC apparatus. The use of dynamic thermogravimetry to study the chemical kinetics of solid state decomposition. **Thermochimica acta**, v. 171, p. 15-29, 1990.

- ROSASCO, M. A. *et al.* Compatibility study of tobramycin and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, FTIR, DRX, and HPLC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1929-1941, 2018.
- ROZENBERG, M.; SHOHAM, G. FTIR spectra of solid poly-L-lysine in the stretching NH mode range. **Biophysical chemistry**, v. 125, n. 1, p. 166-171, 2007.
- RUAN, Yi-Ting *et al.* In vivo and in vitro comparison of three astilbin encapsulated zein nanoparticles with different outer shells. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 9784-9792, 2021.
- RYTTING, Erik *et al.* Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 5, n. 6, p. 629-639, 2008.
- SALATIN, Sara; YARI KHOSROUSHAHI, Ahmad. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 21, n. 9, p. 1668-1686, 2017.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, n. 1, p. 1-8, 2016.
- SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima *et al.* Occurrence of qnrB1 and qnrB12 genes, mutation in gyrA and ramR, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of blaKPC-2. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 4, p. 477-484, 2017.
- SCHIFFELERS, Raymond M. *et al.* In vivo synergistic interaction of liposome-coencapsulated gentamicin and ceftazidime. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 1, p. 369-375, 2001.
- SELVAKANNAN, P. R. *et al.* Capping of gold nanoparticles by the amino acid lysine renders them water-dispersible. **Langmuir**, v. 19, n. 8, p. 3545-3549, 2003.
- SILVA, Mariana M. *et al.* Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration. **Marine drugs**, v. 15, n. 12, p. 370, 2017.
- SIMON, S F. *et al.* Association between kinetic of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1183, 2019.
- SPIRESCU, Vera Alexandra *et al.* Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-date Overview. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 724, 2021.
- SRINIVASAN, Ramanathan *et al.* Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1106, 2021.
- STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- SUN, Fengjun *et al.* Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the ibpA gene and extracellular indole. **Journal of Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2019.
- SUN, Yu *et al.* Synthesis and characterizations of gentamicin-loaded poly-lactic-co-glycolic (PLGA) nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 23, n. 8, p. 1-15, 2021.

TORRES, Ieda Maria Sapateiro et al. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian journal of microbiology**, v. 43, n. 3, p. 984-992, 2012.

TROEGER, Christopher et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. 1191-1210, 2018.

VAIRO, Claudia et al. In vitro and in vivo antimicrobial activity of sodium colistimethate and amikacin-loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 29, p. 102259, 2020.

VARUM, Felipe JO et al. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 25, n. 3, 2008.

VESTBY, Lene K. et al. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

VON KLITZING, Eliane et al. Intestinal and systemic immune responses upon multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization of mice harboring a human gut microbiota. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2590, 2017.

VON ROSENVINGE, Erik C. et al. Microbial biofilms and gastrointestinal diseases. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 1, p. 25-38, 2013.

VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.

WALVEKAR, Pavan; GANNIMANI, Ramesh; GOVENDER, Thirumala. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 121-141, 2019.

WALVEKAR, Pavan; GANNIMANI, Ramesh; GOVENDER, Thirumala. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 121-141, 2019.

WANG, Li-Sheng; GUPTA, Akash; ROTELLO, Vincent M. Nanomaterials for the treatment of bacterial biofilms. **ACS infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 3-4, 2016.

WANG, Mei et al. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate β -carotene by anti-solvent precipitation method. **Food hydrocolloids**, v. 77, p. 577-587, 2018a.

WANG, Shaoning et al. Co-delivery of ciprofloxacin and colistin in liposomal formulations with enhanced in vitro antimicrobial activities against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Pharmaceutical research**, v. 35, n. 10, p. 1-13, 2018c.

WANG, Wei-Ping; DU, Yu-Min; WANG, Xiao-Ying. Physical properties of fungal chitosan. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2717-2720, 2008.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018b.

WANG, Y. et al. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 568-576, 2020.

WHO, World Health Organization, 2017. Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. The Anatomical Therapeutic Chemical (ATC), classification system.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature News**, v. 543, n. 7643, p. 15, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2019: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019**. Geneva: World Health Organization, 2020.

WU, Wei; LU, Yi; QI, Jianping. Oral delivery of liposomes. *Therapeutic Delivery*, v. 6, n. 11, p. 1239-1241, 2015.

XIAO, Yu et al. Synthesis, Characterization, and Evaluation of Genistein-Loaded Zein/Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles with Improved Water Dispersibility, Enhanced Antioxidant Activity, and Controlled Release Property. **Foods**, v. 9, n. 11, p. 1604, 2020.

XIU, Weijun et al. Recent development of nanomedicine for the treatment of bacterial biofilm infections. **View**, v. 2, n. 1, p. 20200065, 2021.

YAN, Jing; BASSLER, Bonnie L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 1, p. 15-21, 2019.

YE, Tiantian et al. Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of pharmaceutics**, v. 552, n. 1-2, p. 130-138, 2018.

YU, Xiao et al. Study on Self-Assembled Morphology and Structure Regulation of α -Zein in Ethanol–Water Mixtures. **Langmuir**, v. 36, n. 40, p. 11975-11984, 2020.

YUAN, Yongkai et al. Fabrication and characterization of zein nanoparticles by dextran sulfate coating as vehicles for delivery of curcumin. **International journal of biological macromolecules**, v. 151, p. 1074-1083, 2020.

ZHANG, Hong et al. Encapsulation of curcumin using fucoidan stabilized zein nanoparticles: Preparation, characterization, and in vitro release performance. **Journal of Molecular Liquids**, v. 329, p. 115586, 2021.

ZHANG, P. et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 1, p. 124, 2020.

ZHANG, Yaqiong et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food chemistry**, v. 142, p. 269-275, 2014.

ZHOU, Jian-Feng et al. Physicochemical properties and bioavailability comparison of two quercetin loading zein nanoparticles with outer shell of caseinate and chitosan. **Food Hydrocolloids**, p. 106959, 2021.

6 CONCLUSÕES

- As nanopartículas de zeína revestidas e não revestidas com quitosana contendo ceftazidima e tobramicina desenvolvidas pelos métodos de nanoprecipitação e de deposição eletrostática estão caracterizadas quanto ao tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulação, sendo consideradas apropriadas para estudos *in vivo*.
- As nanopartículas desenvolvidas nesse estudo foram caracterizadas por MEV, FTIR, DRX, DSC e TGA demonstrando morfologia esférica e lisa, comprovando a presença de possíveis interações entre os polímeros e os demais componentes da formulação, além da encapsulação dos antimicrobianos, proteção dos fármacos e estabilidade térmica;
- As ZNP, CAZ-ZNP, TOB-ZNP apresentam estabilidade ao longo do armazenamento durante 6 meses e as ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentam estabilidade ao longo do armazenamento durante 4 meses;
- ZNP-CH, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH foram estáveis em meio gástrico e intestinal pH simulado;
- CAZ e TOB foram liberadas de modo controlado por 24h a partir de CAZ-ZNP e TOB-ZNP em meio PBS e a partir de CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH por 24h em meio gástrico e intestinal pH simulado;
- As nanopartículas apresentaram citotoxicidade reduzida quando comparado aos fármacos livres para as linhagens celulares de hepatócitos (HepG2) e fibroblastos (L929);
- A ceftazidima e a tobramicina encapsuladas em nanopartículas (CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH) apresentaram atividade antibacteriana potencializada *in vitro*, e as nanopartículas co-encapsulando CAZ e TOB (CAZ-TOB-ZNP-CH) ou tratamento combinado (CAZ-ZNP + TOB-ZNP) apresentaram atividade antibacteriana potencializada *in vitro*, quando comparadas ao tratamento com CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH e TOB-ZNP-CH isoladamente, frente às cepas ATCC de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* e aos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistentes aos antibióticos;

- CAZ e TOB encapsuladas em nanopartículas de zeína (CAZ-ZNP e TOB-ZNP) revestidas com quitosana (CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH) tiveram sua ação antibacteriana e antibiofilme potencializada quando comparadas ao tratamento com CAZ e TOB não encapsuladas.
- CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH apresentaram CIMB em concentrações subinibitórias, contudo, CAZ-TOB-ZNP-CH ou o tratamento combinado (CAZ-ZNP + TOB-ZNP) demonstraram maior potencial de inibição da formação do biofilme *in vitro* frente às cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes.
- CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH apresentaram CEMB em concentrações supra-inibitórias, contudo, CAZ-TOB-ZNP-CH ou o tratamento combinado (CAZ-ZNP + TOB-ZNP) demonstraram maior potencial de erradicação do biofilme *in vitro* frente às cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes.
- CAZ-ZNP, TOB-ZNP, CAZ-ZNP-CH, TOB-ZNP-CH e CAZ-TOB-ZNP-CH apresentam-se como uma estratégia terapêutica promissora para infecções intestinais e respiratórias causadas por *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* sensíveis e resistentes produtoras de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ABE, C. M. et al. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* strains form Biofilm on Abiotic Surfaces Regardless of Their Adherence Pattern on Cultured Epithelial Cells. **BioMed Research International**, Nova York, p. 1-10, 2014.
- ADEKIYA, T. A. et al. A Review of Nanotechnology for Targeted Anti-schistosomal Therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 32, p. 1-20, 2020.
- AJEET, A. QSAR modeling of Beta-lactam antibiotic Cephalosporin against Transpeptidase using MLR method. **European Journal of Bioinformatics**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2013.
- AL-HASAN, M. N. et al. β -lactam and fluoroquinolone combination antibiotic therapy for bacteremia caused by gram-negative bacilli. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1386-1394, 2009.
- ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 273-286, 2018.
- ALIPOUR, Misagh et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth–ethanedithiol with tobramycin in liposomes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 684-693, 2010.
- ALIZADE, H. et al. An overview of diarrheagenic *Escherichia coli* in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 24, n. 23, p.1-34, 2019.
- ALLISON, D. et al. Synthesis and antimicrobial studies of novel derivatives of 4-(4-formyl-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl) benzoic acid as potent anti-*Acinetobacter baumannii* agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2017.
- AL-MALKY, G. et al. High-frequency audiometry reveals high prevalence of aminoglycoside ototoxicity in children with cystic fibrosis. **Journal of cystic Fibrosis**, v. 14, n. 2, p. 248-254, 2015.
- ALMARZOKY ABUHUSSAIN, S. S.; SUTHERLAND, C. A.; NICOLAU, D. P. Single β -lactams versus combinations as empiric therapy for infections with *Pseudomonas aeruginosa*: assessing the in vitro susceptibility. **Infectious Diseases**, v. 52, n. 1, p. 33-38, 2020.

AL-NEMRAWI, Nusaiba K. et al. Low molecular weight chitosan-coated PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of tobramycin for cystic fibrosis. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 28, 2018.

ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. **Cereal Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 159-173, 2011.

ANDES D. R, CRAIG W. A. Cephalosporins. In: **Principles and practice of infectious diseases**. 7ª Ed. Filadélfia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.

ANDES, D. R., CRAIG, W. A. Cephalosporins. In: **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 6ª Ed. Filadélfia: Churchill Livingstone Elsevier, 2005.

ANVISA. AGÊNCIA BRASILEIRA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde Nº 17**: Avaliação de Indicadores Nacionais das Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana do Ano de 2017. Janeiro, 2018.

ANVISA. AGÊNCIA BRASILEIRA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde – IRAS**: Pernambuco - 2012 até setembro de 2019. Dezembro, 2019.

ARMIGO, L. M. et al. Antibacterial activity of iron oxide, iron nitride, and tobramycin conjugated nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-27, 2020.

ARONSON, J. K.; REYNOLDS, D. J. ABC of monitoring drug therapy. Aminoglycoside antibiotics. **British Medical Journal**, v. 305, n. 6866, p. 1421, 1992.

ARRUDA, C. J. M. et al. Bibliographic review of Beta-lactam antibiotics. **Revista Saúde em Foco**, v.11, n.1, p. 982-995, 2019.

ARUMUGHAM, V.B.; CASCELLA, M. **Third Generation Cephalosporins**. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2020.

AVERY, L. M. *et al.* Pharmacodynamics of daptomycin in combination with other antibiotics for the treatment of enterococcal bacteraemia. **International journal of antimicrobial agents**, v. 54, n. 3, p. 346-350, 2019.

AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said *et al.* Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles Loaded with Peganum harmala Alkaloids with Promising Antibacterial and Wound Healing Activities. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2438, 2021.

BASSETTI, M. *et al.* Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in medicine**, v. 6, n. 74, p. 1-10, 2019.

BASSETTI, M.; RIGHI, E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections. **Current opinion in critical care**, v. 21, n. 5, p. 402-411, 2015.

BAUTISTA, G. F. M. *et al.* Nanodelivery system based on zein-alginate complexes enhances in vitro chemopreventive activity and bioavailability of pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] seed limonoids. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 1-13, 2019.

BEALE, J. Antibacterial antibiotics. In: **Organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. 12^a Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

BERNI, Elias; DE MELO BARBOSA, Raquel; DURÁN, Nelson. Chitosan-coated poly (ε-caprolactone) nanoparticles as acaricide carriers. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 1, p. 101849, 2022.

BISWAS, A. K. *et al.* Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 043001, 2014.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLUMER, J. L. *et al.* The efficacy and safety of meropenem and tobramycin vs ceftazidime and tobramycin in the treatment of acute pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. **Chest**, v. 128, n. 4, p. 2336-2346, 2005.

BODELÓN, G. *et al.* Detection and imaging of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm communities by surface-enhanced resonance Raman scattering. **Nature materials**, v. 15, n. 11, p. 1203-1211, 2016.

BODEY, G. P. Evolution of antibiotic therapy for infection in neutropenic patients: studies at MD Anderson Hospital. **Reviews of infectious diseases**, v. 11, n. 7, p. 1582-1590, 1989.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, v. 12, n. 7, p. 620-636, 2011.

BOTHRA, M.; LODHA, R.; KABRA, S. K. Tobramycin for the treatment of bacterial pneumonia in children. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 13, n. 4, p. 565-571, 2012.

BOYER, A. *et al.* Aminoglycosides in septic shock. **Drug safety**, v. 36, n. 4, p. 217-230, 2013.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

BULITTA, J. B. *et al.* Population pharmacokinetic comparison and pharmacodynamic breakpoints of ceftazidime in cystic fibrosis patients and healthy volunteers. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1275-1282, 2010.

CAI, Y. *et al.* A review of the combination therapy of low frequency ultrasound with antibiotics. **BioMed research international**, v. 2017, n. 1, p. 1-15, 2017.

CAMPOS, A. C. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing K pneumoniae: a systematic review. **American journal of infection control**, v. 44, n. 11, p. 1374-1380, 2016.

CAO, S. *et al.* Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 5, p. 1-11, 2019.

CAVALCANTI, Iago Dillion Lima *et al.* Fucoidan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, p. 102698, 2021.

CHAMOT, E. *et al.* Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2756-2764, 2003.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Microbiol Book Series**, v. 1, n. 1, p. 520-529, 2011.

CHANDRAN, A.; MAZUMDER, A. Erratum for Chandran and Mazumder, Pathogenic Potential, Genetic Diversity, and Population Structure of *Escherichia coli* Strains Isolated from a Forest-Dominated Watershed (Comox Lake) in British Columbia, Canada. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 2, p. 767, 2016.

CHANG, C. *et al.* Caseinate-zein-polysaccharide complex nanoparticles as potential oral delivery vehicles for curcumin: Effect of polysaccharide type and chemical cross-linking. **Food hydrocolloids**, v. 72, n. 1, p. 254-262, 2017.

CHANG, C. *et al.* Zein/caseinate/pectin complex nanoparticles: Formation and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, n. 1, p. 117-124, 2017.

CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clinical epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 205, 2013.

CHAUDHRY, W. N. *et al.* Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2017.

CHEESMAN, M. J. *et al.* Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 57, 2017.

CHEMSPIDER. **Tobramicina**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.33377.html>>. Acessado em 16 de junho de 2020.

CHEN, Shuai et al. Fabrication, characterization, physicochemical stability of zein-chitosan nanocomplex for co-encapsulating curcumin and resveratrol. **Carbohydrate polymers**, v. 236, p. 116090, 2020.

CHEN, Y. *et al.* Increasing prevalence of ESBL-producing multidrug resistance *Escherichia coli* from diseased pets in Beijing, China from 2012–2017. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 2852, 2019.

CHEUNG, Randy Chi Fai et al. Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156-5186, 2015.

CHILDS-KEAN, L. M. *et al.* Aminoglycoside Allergic Reactions. **Pharmacy**, v. 7, n. 3, p. 124, 2019.

CHOW, J. W.; VICTOR, L. Y. Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. **International journal of antimicrobial agents**, v. 11, n. 1, p. 7-12, 1999.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n. 20, p. 1-6, 2016.

CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced drug delivery reviews**, v. 85, n. 1, p. 7-23, 2015.

CLARKE, S. **New study to find cause of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii***. 2018.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 1, n. 1, p. 1-17, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2020.

COATES, A. R. M. *et al.* Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: synergy, rejuvenation and resistance reduction. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 1, n. 1, p. 5-15, 2020.

COLVIN, Kelly M. *et al.* The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 1, p. e1001264, 2011.

COOPER, S. *et al.* The Human Microbiome: Composition and Change Reflecting Health and Disease. **HAPS Educator**, v. 23, n. 2, p. 432-445, 2019.

COSTA-FERNANDEZ, Sandra *et al.* Nanostructured lipid carriers containing chitosan or sodium alginate for co-encapsulation of antioxidants and an antimicrobial agent for potential application in wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 668-680, 2021.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias *et al.* Emergence of rmtD1 gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaKPC and/or blaVIM-2 genes in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2021.

COUGHLAN, L. M. *et al.* New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2016.

CRAIG, W. A.; EBERT, S. C. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2577, 1992.

DA ROSA, Cleonice Gonçalves *et al.* Characterization and evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of zein nanoparticles loaded with phenolics monoterpenes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 337-344, 2015.

DALPIAZ, A. *et al.* Application of the “in-oil nanoprecipitation” method in the encapsulation of hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 283-290, 2016.

DAS, P.; YANG, X.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 696, p. 1-8, 2014.

DATE, A. A.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, v. 240, n. 1, p. 504-526, 2016.

DAVID, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. **Nature microbiology**, v. 4, n. 11, p. 1919-1929, 2019.

DAVIDOV-PARDO, G.; JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade protein-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: fabrication, characterization, and utilization. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 98, n. 1, p. 293-325, 2015.

DAVIS, B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 3, p. 1-10, 1987.

DE BREIJ, A. *et al.* Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*?. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. 1-8, 2010.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

DE LEO, L. *et al.* Fasting increases tobramycin oral absorption in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1644-1646, 2010.

DE LIMA, Jefferson Muniz *et al.* Chitosan/PCL nanoparticles can improve anti-neoplastic activity of 5-fluorouracil in head and neck cancer through autophagy activation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 134, p. 105964, 2021.

DE OLIVEIRA JÚNIOR, N. G.; FRANCO, O. L. Promising strategies for future treatment of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Future Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 63-79, 2020.

DE VILLIERS, M. M.; ARAMWIT, P.; KWON, G. S. **Nanotechnology in drug delivery**. 1 ed. New York: Springer-Verlag New York, 2008.

DE VRIES, A.; NIKIFORIDIS, C. V.; SCHOLTEN, E. Natural amphiphilic proteins as tri-block Janus particles: Self-sorting into thermo-responsive gels. **EPL (Europhysics Letters)**, v. 107, n. 5, p. 1-7, 2014.

DEACON, Jill et al. Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase). **Journal of Controlled Release**, v. 198, p. 55-61, 2015.

DEMIR, M. et al. Zein-based composites in biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 6, p. 1656-1665, 2017.

DEN HOLLANDER, J. G. et al. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an in vitro pharmacokinetic model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 1997.

DEN HOLLANDER, J. G. et al. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an in vitro pharmacokinetic model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 1997.

DESAI, S.; SANGHRAJKA, K.; GAJJAR, D. High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 277, 2019.

DOMALAON, R. et al. Repurposed antimicrobial combination therapy: tobramycin-ciprofloxacin hybrid augments activity of the anticancer drug mitomycin C against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1556, 2019.

DORTCH, M. J. et al. Infection reduction strategies including antibiotic stewardship protocols in surgical and trauma intensive care units are associated with reduced resistant gram-negative healthcare-associated infections. **Surgical infections**, v. 12, n. 1, p. 15-25, 2011.

DOS SANTOS-RAMOS, M. A. D. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1179, 2018.

DRUGBANK. **Ceftazidime**. Disponível em: <
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00438>>. Acessado em 16 de junho de 2020.

DRUGBANK. **Tobramicina**. Disponível em: <
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00684>>. Acessado em 16 de junho de 2020.

DUMARU, Rabina; BARAL, Ratna; SHRESTHA, Lok Bahadur. Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.

DUNN, G. L. Ceftizoxime and other third-generation cephalosporins: structure-activity relationships. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 1982.

EDSON, R. S.; TERRELL, C. L. The aminoglycosides. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 66, n.11, p. 1158-1164, 1991.

EL-SHABOURY, S. R. *et al.* Analysis of cephalosporin antibiotics. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 1, p. 1-19, 2007.

EL-WAFA, Wael Mohamed Abu; IBRAHIM, Yasser Musa. In vitro activity of fosfomycin in double and triple combinations with imipenem, ciprofloxacin and tobramycin against multidrug-resistant *Escherichia coli*. **Current microbiology**, p. 1-7, 2020.

ELZOGHBY, A. O.; ELGOHARY, M. M.; KAMEL, N. M. Implications of protein-and Peptide-based nanoparticles as potential vehicles for anticancer drugs. In: *Advances in protein chemistry and structural biology*. **Academic Press**, v. 98, n. 1, p. 169-221, 2015.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of controlled release**, v. 161, n. 1, p. 38-49, 2012.

ESTERLY, J. S. *et al.* Evaluation of clinical outcomes in patients with bloodstream infections due to Gram-negative bacteria according to carbapenem MIC stratification. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4885-4890, 2012.

EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; EL ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and drug resistance**, v. 11, n. 1, p. 2277, 2018.

FALCONE, M.; PATERSON, D. Spotlight on ceftazidime/avibactam: a new option for MDR Gram-negative infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2713-2722, 2016.

FAN, Y. *et al.* Formation of a Mixed-Species Biofilm Is a Survival Strategy for Unculturable Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in Daqu, a Chinese Traditional Fermentation Starter. **Frontiers in microbiology**, v. 11, n. 1, p. 138, 2020.

FAROOQUI, A. *et al.* Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. 1-14, 2015.

FAROUK, F.; AZZAZY, H. M. E.; NIESSEN, W. M. A. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. **Analytica chimica acta**, v. 890, n. 1, p. 21-43, 2015.

FARROKH, C. *et al.* Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International journal of food microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190-212, 2013.

FARZAMPANAH, L. *et al.* Preparation and Investigation of In Vitro Effect of Liposomal Ceftazidime on the Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Advanced Studies in Biology**, v. 9, n. 3, p. 105-111, 2017.

FATIMA, Saman *et al.* Polymeric nanoparticles as a platform for permeability enhancement of class III drug amikacin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 206-213, 2018.

FAUSTI, S. A. *et al.* An individualized, sensitive frequency range for early detection of ototoxicity. **Ear and hearing**, v. 20, n. 6, p. 497-505, 1999.

FELDMAN, M. B. *et al.* Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. **Nature chemical biology**, v. 6, n. 1, p. 54, 2010.

FENG, H. *et al.* The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

FENG, Wei *et al.* Effect of sub-minimal inhibitory concentration ceftazidime on the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 151, p. 104748, 2021.

FLECKENSTEIN, James M.; KUHLMANN, F. Matthew. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 3, p. 1-9, 2019.

FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269-284, 2015.

FONG, Stephanie Sally *et al.* Chitosan-Coated-PLGA Nanoparticles Enhance the Antitumor and Antimigration Activity of Stattic—A STAT3 Dimerization Blocker. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, p. 137, 2022.

FOURMY, D. *et al.* Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1367-1371, 1996.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416-422, 2016.

FRÖHLICH, E.; ROBLEGG, E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2297-2314, 2016.

GAO, L. *et al.* Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 2, p. 307-324, 2013.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **MedChemComm**, v. 7, n. 1, p. 11-27, 2016.

GEISINGER, E. *et al.* A global regulatory system links virulence and antibiotic resistance to envelope homeostasis in *Acinetobacter baumannii*. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. 1-28, 2018.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants—A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GORDYA, N. *et al.* Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. 1-19, 2017.

GORRIE, Claire L. *et al.* Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. **Clinical infectious diseases**, v. 65, n. 2, p. 208-215, 2017.

GRIFFIN, B. T. *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamic and biodistribution following oral administration of nanocarriers containing peptide and protein drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 106, p. 367-380, 2016.

GU, R. *et al.* Ebselen attenuates tobramycin-induced ototoxicity in mice. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2020.

GUO, H. X.; HEINÄMÄKI, J.; YLIRUUSI, J. Stable aqueous film coating dispersion of zein. **Journal of colloid and interface science**, v. 322, n. 2, p. 478-484, 2008.

GUTMANN, L. *et al.* Involvement of penicillin-binding protein 2 with other penicillin-binding proteins in lysis of *Escherichia coli* by some beta-lactam antibiotics alone and in synergistic lytic effect of amdinocillin (mecillinam). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 30, n. 6, p. 906-912, 1986.

HAAGENSEN, J. *et al.* Spatiotemporal pharmacodynamics of meropenem-and tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 12, p. 3357-3365, 2017.

HAGERMAN, J. K.; KNECHTEL, S. A.; KLEPSE, M. E. Tobramycin solution for inhalation in cystic fibrosis patients: a review of the literature. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 8, n. 4, p. 467-475, 2007.

HALWANI, Majed *et al.* Bismuth–thiol incorporation enhances biological activities of liposomal tobramycin against bacterial biofilm and quorum sensing molecules production by *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of pharmaceutics**, v. 373, n. 1-2, p. 141-146, 2009.

HAMEDI, H. et al. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 445-460, 2018.

HAN, Y. et al. In silico ADME and toxicity prediction of ceftazidime and its impurities. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 434, 2019.

HANCOCK, R. E. W; BRINKMAN, F. S. L. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 17-38, 2002.

HARIRI, G. et al. Are third-generation cephalosporins unavoidable for empirical therapy of community-acquired pneumonia in adult patients who require ICU admission? A retrospective study. **Annals of intensive care**, v. 7, n. 1, p. 35, 2017.

HARTMUTH, K.; VORNLOCHER, H. P.; LÜHRMANN, R. Tobramycin affinity tag purification of spliceosomes. In: **mRNA processing and metabolism**. 1^a Ed. New Jersey: Humana Press, 2004.

HASHEM, F. M. et al. Optimized zein nanospheres for improved oral bioavailability of atorvastatin. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 4059, 2015.

HAWKEY, P. M. et al. Treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: Report of the British society for antimicrobial chemotherapy/healthcare infection society/british infection association joint working party. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, p. 1-77, 2018.

HAYES, M. V.; ORR, D. C. Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 12, n. 2, p. 119-126, 1983.

HEDAYATI CH, Mojtaba et al. Niosome-encapsulated tobramycin reduced antibiotic resistance and enhanced antibacterial activity against multidrug-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 6, p. 966-980, 2021.

HEEP, G. et al. Zein-casein-lysine multicomposite nanoparticles are effective in modulate the intestinal permeability of ferulic acid. **International journal of biological macromolecules**, v. 138, n. 1, p. 244-251, 2019.

HEIMESAAT, Markus M. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* accelerate intestinal, extra-intestinal, and systemic inflammatory responses in human microbiota-associated mice with subacute ileitis. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 49, 2019.

HILL, Marcus et al. Formulation of antimicrobial tobramycin loaded PLGA nanoparticles via complexation with AOT. **Journal of functional biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 26, 2019.

HOBLEY et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 39, n. 5, p. 649-669, 2015.

HOUGHTON, J. L. et al. The future of aminoglycosides: the end or renaissance?. **ChemBioChem**, v. 11, n. 7, p. 880-902, 2010.

HSU, L. Y. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in south and southeast Asia. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 1-22, 2017.

HU, Chen et al. Nanoparticles for the treatment of oral biofilms: Current state, mechanisms, influencing factors, and prospects. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 24, p. 1901301, 2019.

HU, D. et al. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of food engineering**, v. 109, n. 3, p. 545-552, 2012.

HUGHES, D. L. Patent Review of Manufacturing Routes to Fifth-Generation Cephalosporin Drugs. Part 1, Ceftolozane. **Organic Process Research & Development**, v. 21, n. 3, p. 430-443, 2017.

HUGHES, Gareth; WEBBER, Mark A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 14, p. 2237-2246, 2017.

HUTINEL, M. et al. Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 37, p. 1-11, 2019.

IBRAHIM, H. M.; EL-ZAIRY, E. M. R. Chitosan as a biomaterial—structure, properties, and electrospun nanofibers. **Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials**, p. 81-101, 2015.

IRACHE, J. M.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Zein nanoparticles as vehicles for oral delivery purposes. **Future Medicine**, v. 12, n. 11, p. 1209-1211, 2017.

ISLER, B. *et al.* New treatment options against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1-17, 2019.

JACKSON, J.; CHEN, C.; BUISING, K. Aminoglycosides: how should we use them in the 21st century?. **Current opinion in infectious diseases**, v. 26, n. 6, p. 516-525, 2013.

JACOBS, D. M. *et al.* Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 76, 2017.

JAHANGIRIAN, H. *et al.* A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International journal of nanomedicine**, v. 12, n. 1, p. 2957, 2017.

JAMIL, Bushra *et al.* Cefazolin loaded chitosan nanoparticles to cure multi drug resistant Gram-negative pathogens. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 682-691, 2016.

JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 2017.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.

JI, N. *et al.* Chitosan coating of zein-carboxymethylated short-chain amylose nanocomposites improves oral bioavailability of insulin in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 313, n. 1, p. 1-13, 2019.

JIANG, M.; KARASAWA, T.; STEYGER, P. S. Aminoglycoside-induced cochleotoxicity: a review. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2017.

JONES, T. E. *et al.* Ceftazidime stability and pyridine toxicity during continuous iv infusion. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 76, n. 4, p. 200-205, 2019.

KAISER, G. E. **Illustration of Aminoglycosides Interfering with Translation by causing a Misreading of the Codons along the mRNA**. 2018.

KARDEC, Allan. **Evangelho Segundo o Espiritismo**. Trad. de Guillon Ribeiro. 131^a edição. Rio de Janeiro: FEB, 2013.

KANG, C. I. *et al.* Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 760-766, 2005.

KANJ, S. S.; KANAFANI, Z. A. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae, carbapenem-resistant enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 3, p. 250-259, 2011.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews**, v. 2, n. 2, p. 1-18, 2004.

KASHEF, N.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. **Nanophotonics**, v. 6, n. 5, p. 853-879, 2017.

KAUR, Christina Parvinder; VADIVELU, Jamuna; CHANDRAMATHI, Samudi. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. **Journal of digestive diseases**, v. 19, n. 5, p. 262-271, 2018.

KAWANISHI, Masanobu *et al.* In vitro genotoxicity analyses of colibactin-producing *E. coli* isolated from a Japanese colorectal cancer patient. **The Journal of toxicological sciences**, v. 44, n. 12, p. 871-876, 2019.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNANDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2005.

KHALID, M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 675-691, 2017.

KHALIL, Ibrahim A. et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. 1229-1240, 2018.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHODABANDEHLOO, H.; ZAHEDNASAB, H.; HAFEZ, A. A. Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. **Iranian journal of cancer prevention**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2016.

KIRTANE, Ameya R. et al. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. **Nature Nanotechnology**, v. 16, n. 4, p. 369-384, 2021. RAMOS, Matheus Aparecido Dos Santos et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1179, 2018.

KLEIN, N. C.; CUNHA, B. A. Third-generation cephalosporins. **The medical clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 705-719, 1995.

KOFTERIDIS, D. P. et al. Treatment pattern, prognostic factors, and outcome in patients with infection due to pan-drug-resistant gram-negative bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2020.

KORVICK, J. A. et al. Prospective observational study of *Klebsiella* bacteremia in 230 patients: outcome for antibiotic combinations versus monotherapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2639-2644, 1992.

KOU, Shijie Gabriel; PETERS, Linda M.; MUCALO, Michael R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 85-94, 2021.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 12, p. 3249-3256, 2000.

KRAUSE, K. M. *et al.* Aminoglycosides: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 6, p. 1-19, 2016.

KUMAR, A. *et al.* Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. **Critical care medicine**, v. 38, n. 9, p. 1773-1785, 2010.

KUMAR, Majeti NV Ravi. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LABIB, G. Overview on zein protein: A promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 65-75, 2018.

LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; KARLOWSKY, J. A. Ceftazidime–avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. **Core evidence**, v. 9, n. 1, p. 13, 2014.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LAM, P. L. *et al.* Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. **Nanomedicine**, v. 12, n. 4, p. 357-385, 2017.

LAM, S. J. *et al.* Antimicrobial polymeric nanoparticles. **Progress in polymer science**, v. 76, n. 1, p. 40-64, 2018.

LANG, X. *et al.* Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, n. 1, p. 433-445, 2020.

LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 596-632, 2014.

LECLEIR, L. K.; PETTIT, R. S. Piperacillin-tazobactam versus cefepime incidence of acute kidney injury in combination with vancomycin and tobramycin in pediatric cystic fibrosis patients. **Pediatric pulmonology**, v. 52, n. 8, p. 1000-1005, 2017.

LEE, C. R. *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. 1, p. 55, 2017.

LEE, E. J.; LEE, N. K.; KIM, I. S. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 106, n. 1, p. 157-171, 2016.

LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. **Chemical engineering science**, v. 125, n. 1, p. 75-84, 2015.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156-167, 2011.

LENCHENKO, E. *et al.* Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. **Veterinary World**, v. 13, n. 1, p. 197, 2020.

LI, H. *et al.* Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein. **Food Hydrocolloids**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2020.

LI, K. K. *et al.* Continuous preparation of zein colloidal particles by Flash NanoPrecipitation (FNP). **Journal of food engineering**, v. 127, n. 1, p. 103-110, 2014.

LI, Shan *et al.* Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 1, p. 18-30, 2017.

LIANG, J. *et al.* Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 19-24, 2017.

LIANG, Jin et al. Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. **Food chemistry**, v. 231, p. 19-24, 2017.

LIKINE, E. F.; SELIGSON, D. Rifampin and tobramycin combination with PMMA antibiotic cement. **European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology**, v. 29, n. 2, p. 499-500, 2019.

LIN, M. F.; LAN, C. Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. **World Journal of Clinical Cases: WJCC**, v. 2, n. 12, p. 787, 2014.

LIN, T. C. et al. Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, n. 11, p. 635-641, 2015.

LIU, Yong et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 2, p. 428-446, 2019.

LODE, H. Tobramycin: a review of therapeutic uses and dosing schedules. **Current therapeutic research**, v. 59, n. 7, p. 420-453, 1998.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. 1, p. 28-36, 2017.

LÓPEZ-GARCÍA, Jorge et al. HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. **Journal of functional biomaterials**, v. 5, n. 2, p. 43-57, 2014.

LORTHOLARY, O. et al. Aminoglycosides. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 761-787, 1995.

LUCIO, D. et al. Optimization and evaluation of zein nanoparticles to improve the oral delivery of glibenclamide. In vivo study using *C. elegans*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 121, p. 104-112, 2017.

LUEPKE, K. H. et al. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications.

Pharmacotherapy: **The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 37, n. 1, p. 71-84, 2017.

LUO, Y. *et al.* Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 145-152, 2011.

LUO, Y. Perspectives on Important Considerations in Designing Nanoparticles for Oral Delivery Applications in Food. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2020.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836-843, 2012.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro-and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 16, p. 1-12, 2014.

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, H. F. Aminoglycosides. In: **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 13^a Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2017.

MACVANE, S. H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections. **Journal of intensive care medicine**, v. 32, n. 1, p. 25-37, 2017.

MADKOUR, Loutfy H. Nanoparticles as Targeted Drug Co-Delivery in Cancer Therapeutics. **Chronicles of Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 800-804, 2019.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 477-498, 2005.

MAHDIUN, Faeze *et al.* The effect of tobramycin incorporated with bismuth-ethanedithiol loaded on niosomes on the quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 129-135, 2017.

MALAEKEH-NIKOUEI, Bizhan *et al.* The role of nanotechnology in combating biofilm-based antibiotic resistance. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 101880, 2020.

MARSTON, H. D. *et al.* Antimicrobial resistance. **Jama**, v. 316, n. 11, p. 1193-1204, 2016.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering**. v. 60, n. 1, p. 569-578, 2016.

MATARACI KARA, Emel *et al.* Evaluation of the synergy of ceftazidime/avibactam in combination with colistin, doripenem, levofloxacin, tigecycline, and tobramycin against OXA-48 producing Enterobacterales. **Journal of Chemotherapy**, v. 32, n. 4, p. 171-178, 2020.

MATTEUCCI, F. *et al.* Deployment and exploitation of nanotechnology nanomaterials and nanomedicine. **AIP conference proceedings**, v. 1990, n. 1, p. 1-26, 2018.

MAY, A. K. An argument for the use of aminoglycosides in the empiric treatment of ventilator-associated pneumonia. **Surgical infections**, v. 17, n. 3, p. 329-333, 2016.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013.

MCKINNON, P. S.; DAVIS, S. L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 271-288, 2004.

MEHRAD, B. *et al.* Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1413-1421, 2015.

MICHELON, H. *et al.* Efficacy and safety of subcutaneous administration of ceftazidime as a salvage therapy in geriatrics: a case report. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2019.

MITSCHER, L. A.; LEMKE, T.; GENTRY, E. J. Antibiotics and Antimicrobial Agents. In: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 6^a Ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MORENO, L. C. G. I. et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. *International journal of pharmaceutics*, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.

MORENO, L. C. G. I., et al. Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017

MORENO-SASTRE, M. et al. Pulmonary delivery of tobramycin-loaded nanostructured lipid carriers for *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with cystic fibrosis. **International journal of pharmaceutics**, v. 498, n. 1-2, p. 263-273, 2016.

MOROS, E. E. et al. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5787-5790, 2002.

MOYÁ, M. L. et al. Preparation and characterization of new liposomes. Bactericidal activity of cefepime encapsulated into cationic liposomes. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 69, 2019.

NAGAI, J.; TAKANO, M. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 19, n. 3, p. 159-170, 2004.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.

NEU, H. C. Tobramycin: an overview. **The journal of infectious diseases**, v. 384, n. 1, p. 3-19, 1976.

NEU, H. C. β -Lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties. **Reviews of infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 237-259, 1986.

NI, W. *et al.* In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 1, p. 8-18, 2015.

NI, W. *et al.* Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. **International journal of antimicrobial agents**, v. 47, n. 2, p. 107-116, 2016.

NKANGA, Christian I. *et al.* Co-encapsulation of rifampicin and isoniazid in crude soybean lecithin liposomes. **South African Journal of Chemistry**, v. 72, p. 80-87, 2019.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

NÚÑEZ *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

O'SULLIVAN, M. E. *et al.* Towards the prevention of aminoglycoside-related hearing loss. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, n. p. 1-14, 2017.

OCHOŃSKA, Dorota; ŚCIBIK, Łukasz; BRZYCHCZY-WŁOCH, Monika. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1345, 2021.

OGIER, J. M.; LOCKHART, P. J.; BURT, R. A. Intravenously delivered aminoglycoside antibiotics, tobramycin and amikacin, are not ototoxic in mice. **Hearing Research**, v. 386, n. 1, p. 1-12, 2020.

OLIVARES, Elodie *et al.* Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2894, 2020.

OLSSON, A. *et al.* Efficacy of Antibiotic Combinations against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Automated Time-Lapse Microscopy and Static Time-Kill Experiments. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1-11, 2020.

OTANI, Satoshi et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 428-433, 2018.

PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & diseases**, v. 6, n. 2, p. 109, 2019.

PAKHARUKOVA, N. et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. 5558-5563, 2018.

PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 189, n. 1, p. 108-122, 2014.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PARADIS, D. et al. Comparative study of pharmacokinetics and serum bactericidal activities of cefpirome, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem, and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 10, p. 2085-2092, 1992.

PARK, C.; PARK, D.; KIM, B. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food science and biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1725-1733, 2015.

PARK, J. H. et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 28-41, 2010.

PASCOLI, M.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. **Frontiers in chemistry**, v. 6, n.1, p. 6, 2018.

PATEL, A. R.; BOUWENS, E. C. M; VELIKOV, K. P. Sodium caseinate stabilized zein colloidal particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12497-12503, 2010.

PATEL, A. R.; VELIKOV, K. P. Zein as a source of functional colloidal nano-and microstructures. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 450-458, 2014.

PATERSON, D. L. "Collateral damage" from cephalosporin or quinolone antibiotic therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 341-345, 2004.

PATHAK, Y.; THASSU, D. **Drug delivery nanoparticles formulation and characterization**. 1ed. Estados Unidos da América: CRC Press, 2016.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, 2018.

PAUL, D.; BABENKO, D.; TOLEMAN, M. A. Human carriage of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* in North-East India: an analysis of STs and associated resistance mechanisms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 72-76, 2020.

PAUL, M. *et al.* Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 9, p. 2305-2309, 2014.

PAULUK, Daniele *et al.* Chitosan-coated zein nanoparticles for oral delivery of resveratrol: Formation, characterization, stability, mucoadhesive properties and antioxidant activity. **Food hydrocolloids**, v. 94, p. 411-417, 2019.

PEETERS, E. *ET al.* Modulation of the Substitution Pattern of 5-Aryl-2-Aminoimidazoles Allows Fine-Tuning of Their Antibiofilm Activity Spectrum and Toxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6483-6497, 2016.

PEHOURCQ, F.; JARRY, C. Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1-2, p. 159-178, 1998.

PELOQUIN, C. A. *et al.* Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 11, p. 1538-1544, 2004.

PEÑALVA, R. *et al.* Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p. 399-406, 2015a.

PEÑALVA, R. *et al.* Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103-110, 2017.

PEÑALVA, R. *et al.* Zein-based nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol and its anti-inflammatory effects in a mouse model of endotoxic shock. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 23, p. 5603-5611, 2015b.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M.; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.

PERIAYAH, Mercy Halleluyah; HALIM, Ahmad Sukari; SAAD, Arman Zaharil Mat. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. **Pharmacognosy reviews**, v. 10, n. 19, p. 39, 2016.

PETRI JR, W. A. Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In: **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 13^a Ed. New York: McGraw-Hill Education, 2017.

PETTIGREW, Melinda M. *et al.* Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 4, p. 604-613, 2019.

PIAZZINI, Vieri *et al.* Chitosan coated human serum albumin nanoparticles: A promising strategy for nose-to-brain drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 129, p. 267-280, 2019.

PILLAI, Chennakkattu KS; PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in polymer science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.

PIPERAKI, E. T. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

PLAPIED, L. *et al.* Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 16, n. 3, p. 228-237, 2011.

PLEGUEZUELOS-MANZANO, Cayetano *et al.* Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269-273, 2020.

PROKHOROVA, I. *et al.* Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 51, p. 1-10, 2017.

PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE. **Ceftazidime**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5481173>>. Acessado em 16 de junho de 2020.

PUBCHEM OPEN CHEMISTRY DATABASE. **Tobramicina**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36294>>. Acessado em 16 de junho de 2020.

QUINTANAR-GUERRERO, D. *et al.* Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future medicinal chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RAHMAN, Md Masuder *et al.* Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Pathogenic Potential of Enterotoxigenic and Enteropathogenic *Escherichia coli* Associated with Acute Diarrheal Patients in Tangail, Bangladesh. **Foodborne pathogens and disease**, v. 17, n. 7, p. 434-439, 2020.

RAI, M. *et al.* Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1-2, p. 67-78, 2017.

RAMASAMY, Mohankandhasamy; LEE, Jintae. Recent nanotechnology approaches for prevention and treatment of biofilm-associated infections on medical devices. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151-171, 2010.

RASAMIRAVAKA, T. *et al.* The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed research international**, v. 2015, n. 1, p. 1-17, 2015.

RATJEN, F.; BROCKHAUS, F.; ANGYALOSI, G. Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a review. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, n. 6, p. 361-369, 2009.

RAZA, Aun *et al.* PLGA encapsulated γ -cyclodextrin-meropenem inclusion complex formulation for oral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 120280, 2021.

REICHHARDT, C.; PARSEK, M. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 677, 2019.

REIS, C. P. *et al.* Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REISNER, S. L. *et al.* Monitoring the health of transgender and other gender minority populations: validity of natal sex and gender identity survey items in a US national cohort of young adults. **BMC public health**, v. 14, n. 1, p. 1224, 2014.

RIBEIRO, A. R.; SCHMIDT, T. C. Determination of acid dissociation constants (pKa) of cephalosporin antibiotics: Computational and experimental approaches. **Chemosphere**, v. 169, n. 1, p. 524-533, 2017.

RIBEIRO, A. R.; SURES, B.; SCHMIDT, T. C. Cephalosporin antibiotics in the aquatic environment: A critical review of occurrence, fate, ecotoxicity and removal technologies. **Environmental pollution**, v. 241, n. 1, p. 1153-1166, 2018.

RICHTER, S. E. *et al.* Risk factors for development of aminoglycoside resistance among gram-negative rods. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 76, n. 22, p. 1838-1847, 2019.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RITSEMA, J. A. S. et al. Relationship between polarities of antibiotic and polymer matrix on nanoparticle formulations based on aliphatic polyesters. **International journal of pharmaceutics**, v. 548, n. 2, p. 730-739, 2018.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p. 64-70, 2018.

ROBERTS, J. A. et al. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. **British journal of clinical pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 27-36, 2012.

ROBERTS, J. **Cephalosporins**. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 2000.

ROCA SUBIRÀ, I. et al. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. p. 148, 2012.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes and new infections**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 2015.

RUAN, J. et al. Novel oral administrated ellagic acid nanoparticles for enhancing oral bioavailability and anti-inflammatory efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 215-222, 2018.

RUDRAMURTHY, G. R. et al. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 836, 2016.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P. L.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of intensive care**, v. 5, n. 1, p. 21, 2015.

RYBAK, M. J. et al. Prospective evaluation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1549-1555, 1999.

RYBTKE, M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 23, p. 3628-3645, 2015.

SADER, H. S.; JONES, R. N. Historical overview of the cephalosporin spectrum: Four generations of structural evolution. **Antimicrobial Newsletter**, v. 8, n. 12, p. 75-82, 1992.

SAFARI, J; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

SÁNCHEZ-JUÁREZ, C. *et al.* Study of the properties and colloidal stability for the technological application of zein-based nanospheres. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 2, p.715-728, 2019.

SANNES, M. R. *et al.* Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 12, p. 2121-2128, 2004.

SANSEVERINO, I. *et al.* State of the Art on the Contribution of Water to Antimicrobial Resistance. **Brussels: European Union**, v. 1, n. 1, p. 1-109, 2018.

SANS-SERRAMITJANA, Eulalia *et al.* Free and nanoencapsulated tobramycin: effects on planktonic and biofilm forms of *Pseudomonas*. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 35, 2017.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, n. 1, p. 1-8, 2016.

SATPATHY, S. *et al.* Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 56-66, 2016.

SAUVAGE, E. *et al.* The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 234-258, 2008.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima et al. Occurrence of qnrB1 and qnrB12 genes, mutation in gyrA and ramR, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of blaKPC-2. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 4, p. 477-484, 2017.

SCHIFFELERS, Raymond M. et al. In vivo synergistic interaction of liposome-coencapsulated gentamicin and ceftazidime. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 1, p. 369-375, 2001.

SHAABAN, Mona I.; SHAKER, Mohamed A.; MADY, Fatma M. Imipenem/cilastatin encapsulated polymeric nanoparticles for destroying carbapenem-resistant bacterial isolates. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2017.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-319, 2016.

SHARMA, R.; PARK, T. E.; MOY, S. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination for the treatment of resistant gram-negative organisms. **Clinical therapeutics**, v. 38, n. 3, p. 431-444, 2016.

SHAWAR, R. M. et al. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2877-2880, 1999.

SHI, Hui-Qing et al. Opposite effects of cefoperazone and ceftazidime on S-ribosylhomocysteine lyase/autoinducer-2 quorum sensing and biofilm formation by an *Escherichia coli* clinical isolate. **Molecular medicine reports**, v. 10, n. 5, p. 2334-2340, 2014.

SHINDE, P. et al. Synthesis of luteolin loaded zein nanoparticles for targeted cancer therapy improving bioavailability and efficacy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 369-378, 2019.

SHRESTHA, A. et al. Prevalence of extended spectrum beta-Lactamase (ESBL) producing multidrug resistance gram-negative isolates causing urinary tract infection. **EC Microbiol**, v. 4, n. 5, p. 749-755, 2016.

SHRESTHA, S. K. et al. Amphiphilic tobramycin analogues as antibacterial and antifungal agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4861-4869, 2015.

SHRIVASTAVA, S. M.; SHUKLA, S. K.; CHAUDHARY, M. Minimum Inhibitory Concentration and Time Kill Curve Studies of Tobracef, A Fixed Dose Combination of

Ceftazidime and Tobramycin. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 6, n. 1, p. 325-330, 2016.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SHUKLA, Sudheesh K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International journal of biological macromolecules**, v. 59, p. 46-58, 2013.

SILVA, Mariana M. et al. Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration. **Marine drugs**, v. 15, n. 12, p. 370, 2017.

SIMON, S F. et al. Association between kinetic of early biofilm formation and clonal lineage in *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1183, 2019.

SINGH, A. P. et al. Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 4, n. 1, p. 1-21, 2019.

SON, G. H.; LEE, B. J.; CHO, C. W. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 47, n. 4, p. 287-296, 2017.

SONG, Gongshuai et al. Layer-by-layer self-assembly of hollow dextran sulfate/chitosan-coated zein nanoparticles loaded with crocin: Fabrication, structural characterization and potential biological fate. **Food Hydrocolloids**, v. 125, p. 107420, 2022.

SOO-KYOUNG, K.; JOON-HEE, L. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 71–85, 2016.

SORIANO, Alex et al. Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Serious Gram-Negative Infections with Limited Treatment Options: A Systematic Literature Review. **Infectious diseases and therapy**, p. 1-46, 2021.

SPIRESCU, Vera Alexandra et al. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An up-to-date Overview. **Polymers**, v. 13, n. 5, p. 724, 2021

SRINIVASAN, Ramanathan et al. Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1106, 2021.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection Epidemiology Med**, v. 2, n. 1, p. 25-32, 2016.

STURBELLE, R. T. et al. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. **Veterinary microbiology**, v. 180, n. 3-4, p. 245-252, 2015.

SULTANA, S. et al. Stability issues and approaches to stabilized nanoparticles based drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, v. 1, n. 1, p. 1-43, 2020.

SUN, C. et al. Simultaneous treatment of heat and high-pressure homogenization of zein in ethanol-water solution: Physical, structural, thermal and morphological characteristics. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 34, p. 161–170, 2016.

SUN, F. et al. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole. **Journal of Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2020.

SUN, Fengjun et al. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole. **Journal of Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2020.

SUN, Yu et al. Synthesis and characterizations of gentamicin-loaded poly-lactic-co-glycolic (PLGA) nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 23, n. 8, p. 1-15, 2021.

SURASSMO, S. et al. Surface modification of PLGA nanoparticles by carbopol to enhance mucoadhesion and cell internalization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, n. 1, p. 229-236, 2015.

SY, S. K. B. et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of ceftazidime–avibactam combination: a model-informed strategy for its clinical development. **Clinical pharmacokinetics**, v. 58, n. 5, p. 545-564, 2019.

TAKAHASHI, Y.; IGARASHI, M. Destination of aminoglycoside antibiotics in the 'post-antibiotic era'. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 1, p. 4-14, 2018.

TAMMA, P. D.; COSGROVE, S. E.; MARAGAKIS, L. L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 3, p. 450-470, 2012.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. **International journal of pharmaceutics**, v. 522, n. 1-2, p. 172-197, 2017.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TOLEDANO, M. *et al.* Novel Polymeric Nanocarriers Reduced Zinc and Doxycycline Toxicity in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, p. 550, 2019.

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

TRAN, P. H. L *et al.* The use of zein in the controlled release of poorly water-soluble drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 566, n. 1, p. 557-564, 2019.

TSENG, B. S. *et al.* The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 10, p. 2865-2878, 2013.

TUMBARELLO, M. *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. 7, p. 943-950, 2012.

VAIRO, Claudia *et al.* In vitro and in vivo antimicrobial activity of sodium colistimethate and amikacin-loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 29, p. 102259, 2020.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 6, p. 326-333, 2014.

VASOO, S.; BARRETO, J. N.; TOSH, P. K. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 3, p. 395-403, 2015.

VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **J Microbiol Exp**, v. 1, n. 3, p. 1-15, 2014.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, 2009.

VAUTHIER, C.; CABANE, B.; LABARRE, D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation?. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 466-475, 2008.

VAUTHIER, C.; PONCHEL G. **Polymer Nanoparticles for Nanomedicines**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.

VERDEROSA, Anthony D.; TOTSIKA, Makrina; FAIRFULL-SMITH, Kathryn E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 824, 2019. PERCIVAL, S. L. Importance of biofilm formation in surgical infection. **Journal of British Surgery**, v. 104, n. 2, p. e85-e94, 2017.

VESTERGAARD, M. *et al.* Antibiotic combination therapy can select for broad-spectrum multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 47, n. 1, p. 48-55, 2016.

VIJAYAKUMAR, S. *et al.* Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Frontiers in public health**, v. 4, n. 1, p. 105, 2016.

VILA, J. *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 437-463, 2016.

VINAY, D. *et al.* Botryomycosis in a lung cavity. **Lung India: official organ of Indian Chest Society**, v. 33, n. 5, p. 540, 2016.

VOGELEER, P. *et al.* Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 317, 2014.

VON KLITZING, Eliane *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* aggravates inflammatory responses in murine chronic colitis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

VOZZA, G. *et al.* Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 551, n. 1-2, p. 257-269, 2018.

VUOTTO, C. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; DONELLI, G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. **International journal of oral science**, v. 6, n. 4, p. 189, 2014.

WACHINO, J. I.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133-148, 2012.

WAGNER, S. *et al.* Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 13, p. 5929-5969, 2016.

WALVEKAR, Pavan; GANNIMANI, Ramesh; GOVENDER, Thirumala. Combination drug therapy via nanocarriers against infectious diseases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 121-141, 2019.

WANG, Li-Sheng; GUPTA, Akash; ROTELLO, Vincent M. Nanomaterials for the treatment of bacterial biofilms. **ACS infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 3-4, 2016.

WANG, S. Z.; ESEN, A. Primary structure of a proline-rich zein and its cDNA. **Plant physiology**, v. 81, n. 1, p. 70-74, 1986.

WANG, Shaoning et al. Co-delivery of ciprofloxacin and colistin in liposomal formulations with enhanced in vitro antimicrobial activities against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Pharmaceutical research**, v. 35, n. 10, p. 1-13, 2018.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

WEBER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 197-200, 2000.

WHITELEY, M. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 860-864, 2001.

WHO, World Health Organization, 2017. Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. The Anatomical Therapeutic Chemical (ATC), classification system.

WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

WIJESOORIYA, Chamari et al. Optimization of liposomal encapsulation for ceftazidime for developing a potential eye drop formulation. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 73, 2013.

WILLIAMS, C. L. et al. Characterization of *Acinetobacter baumannii* Copper Resistance Reveals a Role in Virulence. **Frontiers in microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2020.

WILLYARD, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. **Nature News**, v. 543, n. 7643, p. 15, 2017.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 35-48, 2014.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 5, p. 736-755, 2011.

WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C. Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. **The Journal of organic chemistry**, v. 78, n. 9, p. 4207-4213, 2013.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B.; MYERS, A. G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840-8869, 2014.

WU, H. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International journal of oral science**, v. 7, n. 1, p. 1, 2015.

XIE, Y. *et al.* Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. **Kidney international**, v. 59, n. 3, p. 959-974, 2001.

XIU, Weijun *et al.* Recent development of nanomedicine for the treatment of bacterial biofilm infections. **View**, v. 2, n. 1, p. 20200065, 2021.

XU, R. *et al.* Rapid startup of thermophilic anaerobic digester to remove tetracycline and sulfonamides resistance genes from sewage sludge. **Science of the Total Environment**, v. 612, n. 1, p. 788-798, 2018.

YADAV, Rajbharan *et al.* Meropenem-tobramycin combination regimens combat carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the hollow-fiber infection model simulating augmented renal clearance in critically ill patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. e01679-19, 2019.

YAN, Jing; BASSLER, Bonnie L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 1, p. 15-21, 2019.

YANG, Yang *et al.* Quorum-sensing gene luxS regulates flagella expression and Shiga-like toxin production in F18ab *Escherichia coli*. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 6, p. 355-361, 2014.

YE, Tiantian *et al.* Novel combination proliposomes containing tobramycin and clarithromycin effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of pharmaceutics**, v. 552, n. 1-2, p. 130-138, 2018.

YORK, J. A.; VARADARAJAN, M.; BARLOW, G. When are combinations of antibiotics clinically useful?. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 81, n. 2, p. 1-9, 2020.

ZADA, S. L. *et al.* Chemical Modifications Reduce Auditory Cell Damage Induced by Aminoglycoside Antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, n. 6, p. 3077-3087, 2020.

ZAKI, Noha M.; HAFEZ, Mohamed M. Enhanced antibacterial effect of ceftriaxone sodium-loaded chitosan nanoparticles against intracellular *Salmonella typhimurium*. **Aaps Pharmscitech**, v. 13, n. 2, p. 411-421, 2012.

ZARGAR, B. *et al.* Zein bio-nanoparticles: a novel green nanopolymer as a dispersive solid-phase extraction adsorbent for separating and determining trace amounts of azorubine in different foodstuffs. **RSC advances**, v. 6, n. 77, p. 73096-73105, 2016.

ZASOWSKI, E. J.; RYBAK, J. M.; RYBAK, M. J. The β -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 8, p. 755-770, 2015.

ZHANEL, G. G. *et al.* Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. **Drugs**, v. 73, n. 2, p. 159-177, 2013.

ZHANG, J.; SALTZMAN, M. Engineering biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery. **Chemical Engineering Progress**, v. 109, n. 3, p. 25, 2013.

ZHANG, P. *et al.* Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 1, p. 124, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. **Journal of controlled release**, v. 206, n. 1, p. 206-219, 2015.

ZHAO, L. et al. Levofloxacin-ceftazidime administration regimens combat *Pseudomonas aeruginosa* in the hollow-fiber infection model simulating abnormal renal function in critically ill patients. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2020.

ZHAO, X. et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **RSC advances**, v. 7, n. 58, p. 36670-36683, 2017.

ZHONG, Q. et al. Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical anti-solvent process. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 697-700, 2009.

ZOU, T. et al. Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. **Food hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumo de capítulo internacional publicado no livro

Encyclopedia of Infection and Immunity

Editora: Elsevier

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NANOTECNOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DE BACTÉRIAS PATOGENICAS GRAM-POSITIVAS E GRAM- NEGATIVAS PRODUTADORAS DE BIOFILME

Luís André de Almeida Campos^{1, 2}, João Victor de Oliveira Santos², Iago Dillion Lima Cavalcanti¹, Azael Francisco Silva Neto¹, Mariane Cajubá de Britto Lira-Nogueira^{1, 3}, Nereide Stela Santos-Magalhães¹, Isabella Macário Ferro Cavalcanti².

¹ Instituto Keizo Asami (ILIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

³ Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura Celular (NanoBioCel), Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

O biofilme bacteriano é uma forma de vida composta por células bacterianas aderidas a superfícies imersas em uma complexa matriz autoproduzida de polissacarídeos, DNAs extracelulares e proteínas. A formação de biofilmes é um processo regulado e complexo com etapas contínuas associadas a mecanismos complexos guiados por processos químicos, físicos e biológicos. Os biofilmes permitem que a infecção persista, dificultam a entrada de antimicrobianos e promovem resistência aos antibióticos, dificultando o tratamento de infecções bacterianas. Nesse sentido, os biofilmes bacterianos são um problema emergente na saúde pública mundial, causando grande preocupação à população, profissionais de saúde e comunidade científica. As terapias convencionais atuais são inadequadas para o tratamento seguro

e eficaz de biofilmes, uma vez que altas doses de antibióticos são necessárias para erradicar os biofilmes, indicando que o tratamento com biofilmes precisa de novas estratégias terapêuticas. Estudos mostram que nanoestruturas e sua associação com estímulos físicos externos são alternativas promissoras para a erradicação de biofilmes. Assim, este capítulo de livro promove a compilação de estudos sobre o uso de nanocarreadores e estímulos físicos externos no tratamento de infecções por biofilme bacteriano.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Biofilmes. Estímulos físicos externos. Infecções. Nanopartículas inorgânicas. Lipossomas. Nanotecnologia. Nanopartículas poliméricas. Detecção de Quórum. Resistência.

APÊNDICE B – Resumo de capítulo internacional aceito no livro *Studies in Natural Products Chemistry*

Editora: Elsevier

**PRODUTOS NATURAIS E TERAPIA COMBINADA COMO ESTRATÉGIA
CONTRA O BIOFILME BACTERIANO**

Luís André de Almeida Campos^{1, 2}, João Victor de Oliveira Santos², Iago Dillion Lima Cavalcanti¹, Azael Francisco Silva Neto¹, Mariane Cajubá de Britto Lira-Nogueira^{1, 3}, Nereide Stela Santos-Magalhães¹, Isabella Macário Ferro Cavalcanti²

¹ Instituto Keizo Asami (ILIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

³ Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura Celular (NanoBioCel), Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Biofilmes bacterianos são comunidades de bactérias cercadas por substâncias, principalmente polissacarídeos, proteínas e fragmentos de DNA produzidos pela própria bactéria. A presença de biofilmes protege as bactérias do sistema imunológico humano e da exposição a antibióticos, reduzindo assim a eficácia terapêutica de vários agentes antimicrobianos. As bactérias que vivem em biofilmes apresentam maior resistência aos antibióticos, dificultando sua eliminação. A combinação de antibióticos é mais eficaz no combate aos biofilmes bacterianos em comparação com a monoterapia. No entanto, apesar dos benefícios, a terapia combinada pode induzir resistência bacteriana, formação de biofilmes recalcitrantes e desenvolvimento de toxicidade. Com poucos antibióticos eficazes contra o biofilme e a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, novas drogas com atividade antibiofilme eficiente e baixa toxicidade estão sendo cada vez mais procuradas. Durante anos,

produtos naturais extraídos de plantas, fungos e animais têm sido uma importante fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com atividades antibacterianas e antibiofilme. Por isso, alguns estudos têm investido na combinação de produtos naturais que possam degradar ou prevenir a formação de biofilmes associados a fármacos que possam atuar sobre bactérias dentro do biofilme. Assim, este capítulo se propôs a destacar os usos atuais de produtos naturais e terapia combinada contra bactérias produtoras de biofilme.

Palavras-chave: Resistência bacteriana. Terapia antibiofilme. Alternativas Terapêuticas. Plantas. Fúngico. Animais. Antibióticos. Sinergismo.