

Estudo da interação nanopartículas-bactéria através da funcionalização superficial de estruturas nanométricas

Orientador: Mateus Borba Cardoso

LNLS

Resumo

O presente projeto tem o intuito de sintetizar nanopartículas de sílica (SiO₂NPs) e modificá-las superficialmente com distintos grupamentos químicos (mercaptop, glicidil, isocianato, amino e feniletil) com o objetivo de entender como os diferentes grupos funcionais favorecem a interação das nanopartículas com o envelope de diferentes bactérias. A modificação das SiO₂NPs com os diferentes grupos funcionais visa o entendimento de como a interação nanopartícula-bactéria pode ser potencializada, vislumbrando a utilização dos efeitos superficiais em materiais avançados. As nanopartículas formadas serão caracterizadas por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV) e análise termo-gravimétrica (TGA). A eficiência da modificação e funcionalização das SiO₂NPs será monitorada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) bem como por potencial zeta. Experimentos de incubação com as bactérias *Escherichia coli* (gram negativa), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus lysodeikticus* (gram positivas) serão realizados. Alíquotas do material incubado (nanopartículas + bactérias) serão analisados por microscopia de varredura em diferentes intervalos de tempo com o intuito de investigar o efeito da funcionalização das nanopartículas frente a interação com os diferentes tipos de bactérias.

Motivação e Metodologia

Atualmente a resistência aos antibióticos é um problema mundial, visto que novos microrganismos resistentes podem ultrapassar as barreiras geográficas e se propagar entre continentes com facilidade.¹ O uso inapropriado e irracional dos medicamentos é um dos grandes motivos por trás da seletividade dos microrganismos, já que fornece condições favoráveis para seu crescimento e persistência.² De acordo com a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO) um alto percentual das infecções hospitalares adquiridas são causadas pela alta

resistência das bactérias e 440 000 novos casos de tuberculose resistente a drogas emergem atualmente, ocasionando no mínimo 150 000 mortes.²

Na União Europeia cerca de 25 000 pacientes morrem por ano de infecções causadas por bactérias resistentes a medicamentos, e o tratamento associado é estimado em cerca de 1,4 bilhões de euros por ano.³ Nos Estados Unidos da América, infecções com esses patógenos custam aproximadamente 20 bilhões de dólares (US\$) enquanto o custo social anual ultrapassa os US\$35 bilhões.³ No Brasil, cerca de 62 casos de tuberculose são diagnosticados a cada 100 000 pessoas, estando posicionado em 15º lugar no ranking mundial. Se compararmos os pacientes infectados com micro-organismos resistentes e os susceptíveis aos medicamentos, os que sofrem da doença resistente possuem maior tempo de tratamento, maiores doses medicamentosas e maior taxa de mortalidade. Sem um antibiótico de última geração e efetivo, hospitais enfrentam o dilema de não terem opções de tratamentos eficazes. Sendo assim, novos sistemas alternativos e com diferentes mecanismos de ação têm se mostrado mais necessários a cada dia que passa.

Novos estudos evidenciam que sistemas de entrega de drogas (*drug delivery*) têm se mostrado eficazes contra diversos tipos de infecções. O estudo de novos carreadores a base de sílica mesoporosa tem chamado atenção para aprisionamento de agentes antitumores, marcadores, proteínas, genes, dentre outros.⁴ Seu amplo uso está associado à sua alta estabilidade, superfície altamente hidrofílica, sua biocompatibilidade e fácil funcionalização de sua superfície.⁴ Tais funcionalizações aumentam a capacidade de armazenamento de drogas ou biomoléculas nos poros da sílica. Além disso, a funcionalização da superfície pode fazer com que o sistema aumente a sua interação com as bactérias. Baseado nesse pressuposto, esse trabalho visa sintetizar nanopartículas de sílica recobertas com diferentes grupos funcionais e então estudar a interação delas com diferentes bactérias. As nanopartículas serão sintetizadas através do método de Stober modificado. Durante a síntese, 380 µL de TEOS serão adicionados a 12 mL de etanol anidro e a mistura será mantida sob agitação magnética por 30 minutos. Então, 570 µL de NH₄OH serão adicionados e o sistema será mantido em agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Passado esse tempo, 400 µL do silano funcionalizado ((3-mercaptopropil) trimetoxisilano; (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano; 3-(trietoxisilil)propilisocianato, trimetoxi(2-feniletil)silano; ou 3-(aminopropil) trimetoxisilano) será adicionado e o sistema será mantido sob agitação por mais 24 horas.

MET e MEV serão utilizados para verificar a forma, tamanho e distribuição das nanopartículas de sílica no LNNano. MEV também será utilizado para estudar as bactérias incubadas com as nanopartículas. A estrutura mesoporosa do nanocompósito de sílica será investigada através de adsorção/dessorção de nitrogênio. As amostras serão previamente tratadas a 110 °C sob vácuo (10^{-2} mbar) por 24 h e as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio serão medidas à temperatura do N₂ líquido em um equipamento Autosorb®-1 (Quantacrome). As medidas de SAXS serão utilizadas para determinar tamanho, forma e polidispersão das nanopartículas. As medidas serão realizadas na linha D1B-SAXS1 do LNLS. FT-IR será utilizado para verificar a eficiência da funcionalização das nanopartículas durante o processo de síntese. Os espectros das pastilhas contendo 0,5 % em massa da amostra em KBr serão obtidos utilizando o equipamento Spectrum Two (Perkin-Elmer). A carga da superfície das nanopartículas será determinada através das medidas do potencial zeta que indicarão a eficiência da funcionalização. Para realizar as medidas, suspensões (1 mg.mL^{-1}) dos nanocompósitos serão preparadas em uma solução aquosa de 40 mM KCl. As amostras serão sonicadas por 10 min antes das medidas que serão realizadas em um equipamento Malvern Nano HT Zetasizer.

Os testes bacteriológicos serão realizados com as bactérias *Escherichia coli* (gram negativa), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus lysodeikticus* (gram positivas). O meio de cultura que será utilizado para preparação do pré-inóculo será Luria-Bertani (LB). Inicialmente, será preparado um pré-inóculo utilizando 5 mL de meio LB (sem ágar bacteriológico) e uma pequena quantidade de bactéria de OD conhecida. Em seguida, serão incubadas 50 µL solução contendo a bactéria e um determinado volume solução contendo as nanopartículas. Os tubos serão agitados em um *shaker* a 200 rpm e a 37 °C por diferentes períodos de tempo quando uma alíquota será retirada. A mistura (bactéria + nanopartícula) será desidratada e posteriormente analisada por microscopia eletrônica de varredura. Os experimentos serão realizados em triplicata.

Referências

1. CDC, *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. 2013, Centers for Disease Control and Prevention.
2. Organization, W.H., *Antimicrobial Resistance*. Fact Sheet, 2012. **Vol. 194**.
3. ECDC-EMEA, *Technical Report: The bacterial Challenge: time to react*. European Centre for Disease Prevention and Control: Stockholm, 2009.
4. Irvine, D.J., *Drug delivery: One nanoparticle, one kill*. Nature Materials, 2011. **10**(5): p. 342-243.