



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação do potencial anti-*Helicobacter pylori* de
compostos de coordenação de prata (I) incorporados ou
não em sistema nanoestruturado de liberação de
fármacos**

BRUNA ALMEIDA FURQUIM DE CAMARGO

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Bento da Silva

Araraquara-SP

2020



Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Avaliação do potencial anti-*Helicobacter pylori* de compostos de coordenação de prata (I) incorporados ou não em sistema nanoestruturado de liberação de fármacos

BRUNA ALMEIDA FURQUIM DE CAMARGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Profa. Dra. Taís Maria Bauab
Orientadora

Profa. Dra. Patrícia Bento da Silva
Coorientadora

Araraquara-SP
2020

C173a

Camargo, Bruna Almeida Furquim de.

Avaliação do potencial *anti-Helicobacter pylori* de compostos de coordenação de prata (I) incorporados ou não em sistema nanoestruturado de liberação de fármacos / Bruna Almeida Furquim de Camargo. – Araraquara: [S.n.], 2020.
99 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Taís Maria Bauab.

Coorientadora: Patrícia Bento da Silva.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Biofilme. 3. Nanopartícula polimérica. 4. Compostos de coordenação. 5. Prata. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Silva, Patrícia Bento da, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do potencial anti-Helicobacter pylori de compostos de coordenação de prata (I) incorporados ou não em sistema nanoestruturado de liberação de fármacos

AUTORA: BRUNA ALMEIDA FURQUIM DE CAMARGO

ORIENTADORA: TAIS MARIA BAUAB

COORDENADORA: PATRÍCIA BENTO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. FLAVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 18 de fevereiro de 2020

Dedico esse trabalho à toda minha família, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, vocês são minha essência. Aos meus pais, Antônio Carlos e Valdiza, minha base, e se hoje estou aqui é graça a vocês. Obrigada por tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Dedico ainda aos meus segundos pais, Angelo e Ana Paula, que estão sempre presentes e dispostos a me ajudarem em tudo que preciso. As minhas queridas irmãs, Ana Julia, Maria Luiza e Giovana, simplesmente por vierem ao mundo como minhas irmãs, obrigada pela confiança e admiração que vocês colocam em mim.

Obrigada pelo incentivo e motivação de cada um de vocês durante esse percurso da minha vida.

Amo vocês!

Meus mais sinceros agradimentos a...

Aos meus pais, Antônio Carlos, Valdiza, Angelo e Ana Paula, pela confiança que sempre depositaram em mim, obrigada pelo carinho, pelo incentivo e força. Essa vitória é de vocês. Amo vocês.

As minhas irmãs, Ana Julia, Maria Luiza e Giovana, pelo carinho de cada uma, vocês são minha vida. Como irmã mais velha, espero que um dia possa ser motivo de orgulho para vocês. Amo vocês.

Ao meu avô Cicero, que não se cansa de me incentivar toda vez que vou visita-lo, obrigada pelo carinho e admiração pela sua parte.

As minhas avós (*in memoriam*) Mariana e Darci, gostaria que pudessem ver onde consegui chegar até agora, sei que estariam orgulhosas, pois muito vocês fizeram por mim.

A Flávia e Eloy, pela amizade de cada um e por sempre estarem dispostos a me ajudarem. E a minha querida sobrinha Rafaela, por ser essa criança pura, simpática e carismática, obrigada por fazer meus finais de semana em Rio Claro melhores. A Tia Bu te ama demais.

Minha querida Tia/Madrinha Neide, um exemplo de determinação, obrigada por sempre estar presente e me ajudar em todos os momentos da minha vida.

As minhas tias Sueli, Maria, Cleri, Zuleide, Zulene e Juraci, por todo incentivo e presença em minha vida. A todos meus primos (as) e tios (as), obrigada a cada um.

A minha querida, amada e linda Lazy, pelo universo ter colocado ela na minha vida no começo desse ciclo. Pois foi ela que me ajudou a me adaptar quando cheguei aqui, um amor incondicional eu tenho por esse ser de quatro patas, que é mais que uma gata para mim.

As minhas amigas e vizinhas, Adriana, Júlia e Nathaly, pela amizade e companherismos de todas vocês. Por serem as melhores vizinhas e tornarem Araraquara um lar melhor.

A Profa. Dra. Taís Maria Bauab, minha orientadora e a pessoa responsável por tudo que aprendi e fiz durante o mestrado. Meus eternos agradecimentos, por ter me aceitado, sem ao menos me conhecer. Por depositar confiança e me incentivar a buscar novos conhecimentos sempre. Obrigada pelo carinho e dedicação que a professora sempre teve, não só comigo, mas com todos no laboratório. Somos frutos do seu conhecimento. Sou imensamente grata por tudo que aprendi e espero aprender com a professora. Muito obrigada.

A minha coorientadora Profa. Dra. Patrícia Bento da Silva, por todo conhecimento e disposição para me ensinar, obrigada por fazer parte desse trabalho e por acreditar em mim para executá-lo. Obrigada ainda por toda ajuda e disposição com a elaboração e execução do artigo. Sou eternamente grata pelos ensinamentos na área de farmacotécnica. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto e sua aluna de doutorado Débora Eduarda Soares Silva, por cederem as amostras utilizadas nesse trabalho, bem como confiar e incentivar o trabalho. Obrigada pela paciência, principalmente pela parte da Débora, a qual sempre esteve disposta a tirar minhas dúvidas e explicar, essa parte da química. Obrigada pela parceria, obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, a primeira pessoa que tive contato aqui na Unesp, obrigada por acreditar em mim e me indicar para profa. Taís. Obrigada pela colaboração nos ensaios nanotecnológicos, pela ajuda e orientações da parte de farmacotécnica do artigo. Agradeço pela amizade e carinho, e ainda agradeço por confiar e me aceitar como aluna no Doutorado e por compor a banca de defesa desse trabalho. Muito obrigada.

A Prof. Dra. Flávia Aparecida Resende, pela parceria com os ensaios de mutagênicidade, bem como por abrir as portas do laboratório para que eu pudesse aprender. Agradeço também por compor a banca de defesa. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan e sua aluna de doutorado Débora Campos pela parceria nos ensaios de citotoxicidade. Obrigada Débora, pela amizade e sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira e sua aluna de doutorado Tamara Ribeiro pela parceria no ensaio com as larvas de *Galleria mellonella*. Obrigada Tamara, por todo ensinamentos e disposição para os ensaios.

A Coordenadora do Programa de Pós-graduação Prof. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e a Pós Doutoranda Karen dos Santos, por comporem a banca de Qualificação e ajudarem com suas arguições. Obrigada pela amizade e carinho.

Ao meu amigo Anderson Noronha, meu eterno veterano Derso. Um amigo da época de Graduação que encontrei quando cheguei. Obrigada por todo ensinamento e conhecimento que você me passou sobre nosso querido Hp, mas principalmente, pela amizade. Uma amizade sincera que sei que levarei para o resto da minha vida.

A minha amiga Bruna Bonifácio, uma pessoa que logo me identifiquei quando cheguei. Obrigada por tirar minhas dúvidas, mesmo estando longe. Obrigada pela parceria e companherismo, por dar seus sinceros conselhos quando preciso. Acima de tudo, obrigada pela amizade, a qual já se provou ser além da Unesp.

Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia de Microrganismos. Ao Gabriel Marena, por toda ajuda na parte estatística desse trabalho, a qual não teria conseguido sem sua ajuda. Agradeço a Luciani Toledo, Giovanna Fortunato, Matheus Ramos e Felipe Hilário, por toda ajuda e disposição, pelos momentos de risadas e descontração no laboratório. Às alunas de Iniciação Científica, Laura, Maira e Tamires, pela ajuda e disposição sempre que preciso. Sucesso a todos vocês.

Aos meus amigos do laboratório de Farmacotécnica, que em pouco tempo que os conheço já se tornaram mais que amigos, uma família aqui em Araraquara. Meus sinceros agradecimentos a cada um de vocês: Franciele, Amanda, Suzana, Victor, Leonardo, Bruno, Aline, Jonatas, Leidiana e Maurício. Obrigada e sucesso a todos.

A minha amiga Fernanda, do laboratório de Cosmetologia, pelos momentos de risadas e sinceros conselhos dados. Por fazer parte dessa família unespiana. Sucesso sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica: Rodrigo, Maria Leonor, Maria Angélica e Alexandra, os quais tive o privilégio de

conhecer em disciplinas, e levar como amigos que a Unesp me proporcionou. Sucesso a todos vocês.

As minhas amigas do Laboratório de Micobacteriologia, Débora, Manu, Rachel, Ana e Mel, por toda ajuda nos ensaios de cito e coisas do dia a dia. Obrigada meninas pela amizade, sucesso a vocês.

As secretárias que passaram durante esses dois anos pelo Departamento de Ciências Biológicas, obrigada pela atenção e disposição.

A Débora, técnica do laboratório de Microbiologia, por todo cuidado, apoio, conhecimento e carinho, estando sempre disposta a nos ajudar. Obrigada.

A todos os porteiros, em especial ao Paulo e Leandro, sempre alegres, fazendo com que nosso dia comece bem, com um simples bom dia. Obrigada.

A todos os funcionários da limpeza da FCFAr, que estão sempre presentes, deixando nosso ambiente de trabalho melhor. Obrigada.

As funcionárias da Cantina, Grazi, Regiane e Jaque, pela simpatia e disposição sempre. Obrigada por fazerem nossos mimos. Agradeço o carinho de todas.

As funionárias da Seção de Pós-Graduação Aniele Vilella e Claúdia Molina e aos demais estagiários. Agradeço imensamente a disposição, atenção, cuidado e carinho que tive de todos.

A Irani e a todos os funcionários da Biblioteca da FCFAr, por toda ajuda e disposição nas correções deste trabalho, muito obrigada.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido (Código de Financiamento 001)

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido (Processo: 134170/2018-0)

A todos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP/FCFAr.

RESUMO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o epitélio gástrico e embora esteja frequentemente associado a infecções assintomáticas, pode promover o desenvolvimento de distúrbios gástricos, como úlcera péptica, gastrite aguda e crônica, tecido linfoide associado à mucosa (Linfoma de MALT) e adenocarcinomas gástricos. Encontra-se na lista de bactérias que são cada vez mais resistentes aos fármacos e apresentam uma grande ameaça à saúde pública. Os perfis de resistência aos antimicrobianos estão relacionados à ocorrência de fatores virulência dos microrganismos, especialmente a produção de biofilme. A importância do *H. pylori* na área da saúde bem como os problemas enfrentados no tratamento de infecções provocadas por esse microrganismo, impulsiona a busca por novas alternativas terapêuticas que visam fornecer menores efeitos colaterais, custo e maior eficácia, pois ainda há uma falha no tratamento, devido a fatores como resistência a antibióticos, consumo de vários medicamentos ao mesmo tempo, período de terapia, além dos efeitos colaterais apresentados pelos antibióticos utilizados atualmente. A prata e seus derivados compreendem importantes propriedades antimicrobianas e possuem a capacidade de formar complexos, os quais atraem interesse ao fornecer novas abordagens medicamentosas. Assim, a incorporação em sistemas de liberação de fármacos denota-se como estratégia para aprimorar a atividade antimicrobiana de compostos metálicos, bem como possibilitar uma melhor solubilização e liberação dos mesmos. Este trabalho visou avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* dos compostos $[Ag(PhTSC \cdot HCl)_2](NO_3) \cdot H_2O$ (1), $[Ag(HTSC \cdot HCl)_2](NO_3) \cdot H_2O$ (2), $[Ag(PhTSC \cdot HCl)_2](Cl) \cdot H_2O$ (3) e $[Ag(HTSC \cdot HCl)_2](Cl) \cdot H_2O$ (4), não incorporados e incorporados em nanopartícula polimérica (NP) frente ao *H. pylori* ATCC 43504. O composto que apresentou melhor atividade (não incorporado e incorporado) foi avaliado sobre a formação de biofilme e biofilme maduro do *H. pylori* e avaliados quanto ao potencial citotóxico sobre as linhagens celulares MRC-5 e J774A.1, potencial mutagênico e potencial tóxico em modelo alternativo *in vivo* de *Galleria mellonella*. A NP constituída de polímero poli (ϵ - caprolactona), de um tensoativo (poloxamer 407) e de uma fase aquosa (tampão fosfato pH 7,4) foi preparada por nanoprecipitação. Os ensaios de caracterização do sistema (dispersão de luz dinâmica, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão (MET)) mostraram que as NPs possuem tamanhos de partículas de $155,10 \text{ nm} \pm 3,60$ a $180,0 \text{ nm} \pm 1,13$, índice de polidispersão de $0,093 \pm 0,028$ a $0,266 \pm 0,032$ e potencial zeta de $-3,17 \text{ mV} \pm 0,359$ a $-0,16 \text{ mV} \pm 0,045$. Foi realizado a estabilidade das formulações por 90 dias, e diante dos resultados de CIM, juntamente com a estabilidade, foi selecionando a nanopartícula incorporada com o composto 1 (NP1) como melhor amostra para seguir com os demais ensaios. As imagens de MET confirmaram a formação das NPs. A atividade antibacteriana foi verificada através da técnica de microdiluição. O composto 1 exibiu uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de $3,90 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e após a incorporação sua ação foi potencializada para $0,78 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e uma Concentração Bactericida Mínima (CBM) de $7,81 \text{ } \mu\text{g/mL}$ livre para $1,56 \text{ } \mu\text{g/mL}$ na NP1. Para o biofilme, a NP1 apresentou melhor atividade frente ao composto 1, tanto na formação do biofilme, quanto no biofilme maduro de *H. pylori*. A formação do biofilme foi analisada em diferentes tempos de formação (4, 24 e 36 horas) o qual foi proposto como 4 horas o tempo suficiente para o *H. pylori* formar o biofilme. Na análise de citotoxicidade, o sistema possibilitou melhores resultados, proporcionando um aumento de seletividade ao *H. pylori* de cerca de 7 vezes para MRC-5 e 3 vezes mais quando comparado a J774A.1, além da NP1 não apresentar citotoxicidade frente as linhagens celulares na mesma concentração referente ao CIM. NP1 permitiu a inibição da mutagenicidade apresentada pelo composto livre. No ensaio *in vivo* em *Galleria mellonella*, o sistema permitiu a sobrevivência das larvas na concentração máxima preparada. Está é a primeira demonstração de atividade de complexos de prata em associação a nanopartícula polimérica contra *H. pylori* e indica um potencial fármaco contra *H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*. Biofilme. Nanopartícula polimérica. Compostos de coordenação. Prata.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium that colonizes gastric epithelium and although often associated with asymptomatic infections, it can promote the development of gastric disorders such as peptic ulcer, acute and chronic gastritis, mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma) and gastric adenocarcinomas. It is on the list of bacteria that are increasingly resistant to drugs and pose a major threat to public health. Antimicrobial resistance profiles are related to the occurrence of virulence factors of microorganisms, especially biofilm production. The importance of *H. pylori* in health, as well as the difficulties faced in the treatment of infections caused by this microorganism, drives the search for new therapeutic alternatives that aim to provide lower side effects, cost and greater effectiveness, because there is still a failure in treatment, due to factors such as antibiotic resistance, consumption of several drugs at the same time, period of therapy in addition to the effects caused by the antibiotics currently used. Silver and its derivatives have important antimicrobial properties and have the ability to form complexes, which attract interest in providing new drug approaches. Thus, the incorporation in drug release systems is presented as a strategy to improve the antimicrobial activity of metallic compounds, as well as to enable a better solubilization and release of them. This work aimed to evaluate the activity of silver (I) coordination compounds: $[\text{Ag}(\text{PhTSC}\cdot\text{HCl})_2](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Ag}(\text{HTSC}\cdot\text{HCl})_2](\text{NO}_3)\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Ag}(\text{PhTSC}\cdot\text{HCl})_2](\text{Cl})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3) and $[\text{Ag}(\text{HTSC}\cdot\text{HCl})_2](\text{Cl})\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4), unloaded and loaded into a polymeric nanoparticle (PN) against *H. pylori* ATCC 43504. The compound that showed the best activity (unloaded and loaded) was evaluated on the formation of mature *H. pylori* biofilm and biofilm and evaluated for cytotoxic potential on MRC- 5 and J774A.1 cell line, mutagenic potential and toxic potential in alternative *in vivo* model of *Galleria mellonella*. The PN composed of polymer (polycaprolactone), a surfactant (poloxamer 407) and an aqueous phase (phosphate buffer pH 7.4) was prepared by nanoprecipitation. The system characterization assays (dynamic light scattering, zeta potential and transmission electron microscopy (TEM)) showed that the PNs have particle sizes from $155.10\text{ nm} \pm 3.60$ to $180.0\text{ nm} \pm 1.13$, polydispersity index from 0.093 ± 0.028 to 0.266 ± 0.032 and zeta potential from $-3.17\text{ mV} \pm 0.359$ to $-0.16\text{ mV} \pm 0.045$. The stability of the formulations was performed for 90 days, and in view of the MIC result, together with the stability, the nanoparticle incorporated with compound 1 (PN1) was selected as the best sample to follow with the other tests. TEM images confirmed the formation of PNs. Antibacterial activity was evaluated by the microdilution technique. The unloaded compound 1 had a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of $3.90\text{ }\mu\text{g/mL}$ and after loaded its action was potentiated to $0.78\text{ }\mu\text{g/mL}$ and a Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of $7.81\text{ }\mu\text{g/mL}$ free for $1.56\text{ }\mu\text{g/mL}$ in PN1. For biofilm, PN1 showed better activity against compound 1, both in biofilm formation and in mature *H. pylori* biofilm. Biofilm formation was analyzed at different formation times (4, 24 and 36 hours) which was proposed as 4 h long enough for *H. pylori* to form the biofilm. In the cytotoxicity analysis, the system provided better results, providing *H. pylori* selectivity increase of about 7 times for MRC-5 and 3 times more when compared to J774A.1, in addition to PN1 not showing cytotoxicity against cell lines at the same concentration as MIC. PN1 allowed the inhibition of the mutagenicity presented by the free compound. In the *in vivo* assay on *Galleria mellonella*, the system allowed larvae survival at the maximum concentration prepared. This is the first demonstration of the activity of silver complexes in association with a polymeric nanoparticle against *H. pylori* and indicates a potential drug against *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*. Biofilm. Polymeric nanoparticle. Coordinating compounds. Silver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i>	22
Figura 2. Representação do processo de formação de um biofilme microbiano através da chegada dos microrganismos (1) adesão primária (2), adesão irreversível (3), maturação (4) e dispersão (5).....	28
Figura 3. Estrutura geral da tiossemicarbazona.....	30
Figura 4. Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas.....	31
Figura 5. Forma aniônica da tiossemicarbazona.....	31
Figura 6. Classificação das nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural, classificada em nanocápsula e nanoesfera e mecanismos de encapsulamento do princípio ativo, por aprisionamento no interior ou adsorção na superfície na nanopartícula.....	34
Figura 7. Processo de síntese do composto $[Ag(PhTSC \cdot HCl)_2](NO_3) \cdot H_2O$ como representativo da síntese dos compostos (1), (2), (3) e (4).....	37
Figura 8. Representação esquemática do preparo da nanopartícula polimérica incorporada...38	
Figura 9. Cepa de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504.....	41
Figura 10. Configuração da microplaca para o ensaio de microdiluição frente às células planctônicas de <i>H. pylori</i>	42
Figura 11. Reação de redução da resazurina.....	43
Figura 12. Esquema ilustrativo da placa de AS para ensaio de CBM para <i>H. pylori</i>	44
Figura 13. Reação de redução do XTT.....	45
Figura 14. Representação esquemática do ensaio inibição da formação de biofilme.....	46
Figura 15. Representação esquemática do ensaio inibição de biofilmes maduros.....	47
Figura 16. Estrutura química dos compostos de coordenação de prata (I).....	52
Figura 17. Nanopartícula polimérica base (A) e nanopartículas poliméricas incorporadas (NP1(B), NP2 (C), NP3 (D) e NP4(E)).....	53
Figura 18. Análise do tamanho de partícula (A), IPD (B) e Zeta (C) da nanopartícula polimérica base (NPB) e das nanopartículas poliméricas incorporadas (NP1, NP2, NP3 e NP4), analisadas a cada 15 dias, durante 90 dias.....	56
Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MET da NPB (A) e NP1 (B) sob aumento de 200.00 X.....	58
Figura 20. Atividade metabólica de biofilmes pré-formados por <i>H. pylori</i> , após o tratamento com o composto 1 (A) e NP1 (B), analisados nos tempos de 4, 24 e 36 horas de formação.....	62

Figura 21. Atividade metabólica de biofilmes pré-formados de <i>H. pylori</i> , após o tratamento com AMOX (A), CLARI (B) e TETRA (C), analisados nos tempos de 4, 24 e 36 horas de formação.....	63
Figura 22. Atividade metabólica de biofilmes maduros de <i>H. pylori</i>	64
Figura 23. Viabilidade das linhagens MRC-5 (A) e J774A.1 (B) tratadas com o composto 1, L ₁ e AgNO ₃ e DMSO como controle de solvente.....	67
Figura 24. Viabilidade das linhagens MRC-5 (A) e J774A.1 (B) tratadas com com NP1 e NPB, PCL e PLX.....	68
Figura 25. Porcentagem de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> (analisadas às 24, 48 e 72 horas) após tratamento com o composto 1 (5 - 300mg/kg) e NP1 (8mg/kg).....	72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos diâmetros das partículas, IPD e Potencial Zeta da nanopartícula base (NPB) e das nanopartículas incorporadas (NP1, NP2, NP3 e NP4).....	54
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima dos compostos ($\mu\text{g/mL}$) (1, 2, 3 e 4), incorporados ($\mu\text{g/mL}$) (NP1, NP2, NP3 e NP4) e DMSO (%) sobre as cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>H. pylori</i>	59
Tabela 3. Concentração Bactericida Mínima dos compostos ($\mu\text{g/mL}$) (1, 2, 3 e 4), incorporados ($\mu\text{g/mL}$) (NP1, NP2, NP3 e NP4) e DMSO (%) sobre as cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>H. pylori</i>	61
Tabela 4. Atividade anti- <i>H. pylori</i> e avaliação da citotoxicidade frente as linhagens celulares MRC-5 e J774A.1 com os respectivos valores de índice de seletividade (IS). Os valores de CIM_{90} e IC_{50} estão apresentados em $\mu\text{g/mL}$, com exceção para NP, PLX, PCL e DMSO (%)......	66
Tabela 5. Mutagenicidade apresentada através do número revertentes/placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) do composto 1 e NP1 contra <i>S. typhimurium</i> com (+ S9) e sem (- S9) atividade metabólica sobre as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ag – Prata

AgNO₃ – Nitrato de prata

AMH - Ágar Müller Hinton

AMOX – Amoxicilina

AMP – Ampicilina

AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais

AS - Ágar Müeller Hinton acrescido a 5% de sangue de carneiro

ATCC – *American Type Culture Collection*

CBM - Concentração bactericida mínima

CC – Controle de crescimento

CIM - Concentração inibitória mínima

CLARI - Claritromicina

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMH - Caldo Müller Hinton

CN – Controle negativo

CO₂ - Gás carbônico

CP – Controle positivo

DMSO – Dimetilsulfóxido

IC₅₀ – Índice de citotoxicidade

IBP – Inibidor da bomba de prótons

IM – Índice de mutagenicidade

IPD - Índice de polidispersão

IS – Índice de seletividade

J774A.1 - Macrófagos de camundongos

L₁ - (PhTSC = 2-piridinacarboxaldeído-N(4)-feniltiossemicarbazona)

L₂ - (HTSC = 2-piridinacarboxaldeído-tiossemicarbazona)

MALT - Tecido linfóide associado à mucosa

MEP - Matriz extracelular polimérica

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MRC-5 - Fibroblatos pulmonares

NP – Nanopartícula polimérica

NPs – Nanopartículas poliméricas

NPB – Nanopartícula polimérica base

NP1- Nanopartícula polimérica incorporada com o composto 1

NP2- Nanopartícula polimérica incorporada com o composto 2

NP3 – Nanopartícula polimérica incorporada com o composto 3

NP4 - Nanopartícula polimérica incorporada com o composto 4

OMP – Omeprazol

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS – Solução de tampão fosfato pH 7,4

PCA - aldeído 2- piridina-carboxaldeído

PCL – Poli (ε-caprolactona)

PLX – Poloxamer

PZ – Potencial zeta

rpm – Rotações por minuto

SFB - Soro fetal bovino

TETRA – Tetraciclina

TSC - Tiossemicarbazona

XTT- 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. Infecções microbianas e resistência.....	21
2.2. <i>Helicobacter pylori</i>	21
2.2.1. Nomenclatura e aspectos gerais.....	21
2.2.2. Fatores de virulência.....	22
2.2.3. Doenças associadas ao <i>H. pylori</i>	25
2.2.4. Terapias medicamentosas utilizadas para a erradicação do <i>H. pylori</i>	26
2.3. Biofilme.....	27
2.4. Atividade antibacteriana de metais.....	29
2.4.1. Prata.....	29
2.4.2. Tiossemicarbazona.....	30
2.4.3. Compostos de coordenação.....	32
2.5. Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos.....	33
2.5.1. Nanopartícula polimérica.....	33
3.OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Obtenção dos compostos de coordenação de prata (I).....	37
4.2. Preparo da formulação nanoestruturada.....	37
4.2.1. Nanopartículas poliméricas - NPs.....	37
4.2.2. Caracterização das NPs.....	38
4.2.2.1. Dispersão de luz dinâmica.....	38
4.2.2.2. Potencial zeta.....	39
4.2.2.3. Estabilidade.....	39
4.2.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	40
4.3. Determinação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i>	40
4.3.1. Microrganismos	40
4.3.2. Padronização das suspensões bacterianas.....	41
4.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	41
4.3.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	43
4.4. Ensaio de inibição de biofilmes.....	44
4.4.1. Inibição da formação dos biofilmes.....	44
4.4.2. Inibição de biofilmes maduros.....	46
4.5. Determinação do potencial citotóxico.....	47
4.6. Avaliação do potencial mutagênico.....	49
4.7. Avaliação do potencial tóxico agudo em <i>Galleria mellonella</i>	50
4.8. Análise estatística.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Obtenção dos compostos de coordenação de prata (I).....	52
5.2. Preparo da formulação nanoestruturada.....	53
5.2.1. Nanopartículas poliméricas - NPs.....	53

5.2.2. Caracterização das NPs.....	54
5.2.2.1. Dispersão de luz dinâmica.....	54
5.2.2.2. Potencial zeta.....	54
5.2.2.3. Estabilidade	55
5.2.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	58
5.3. Determinação do potencial antibacteriano <i>in vitro</i>	59
5.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	59
5.3.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	60
5.4. Ensaio de inibição de biofilmes.....	61
5.4.1. Inibição da formação dos biofilmes.....	61
5.4.2. Inibição de biofilmes maduros.....	64
5.5. Determinação do potencial citotóxico.....	65
5.6. Avaliação do potencial mutagênico.....	69
5.7. Avaliação do potencial tóxico agudo em <i>Galleria mellonella</i>	72
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

Dentre os grandes temas que geram preocupação no mundo destacam-se as doenças infecciosas, que podem ser originadas por um microrganismo patogênico ou oportunista, tais como fungos, bactérias, parasitas ou vírus, os quais variam o modo de transmissão, podendo ser transmitida diretamente ou indiretamente de um para outro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). É considerado um problema de saúde pública, provocando sintomas clínicos que levam a vários efeitos indesejáveis à saúde humana, levando constantemente o paciente a óbito (BATISTA et al., 2010).

A morte mediante doenças infecciosas ainda é uma preocupação mundial, crescente em vários países, até nos mais desenvolvidos, sendo principalmente devido ao número de microorganismos resistentes aos fármacos (BIBI et al., 2011; DHANYALAYAM et al., 2017).

A ocorrência de inúmeros microorganismos patogênicos, bem como seu acelerado desenvolvimento tem provocado um grande impacto na saúde (JONES et al., 2008). Diante da rápida propagação desses microrganismos, o quadro de doenças infecciosas está constantemente crescendo (FAUCI; MORENS, 2012).

A resistência microbiana aos antibióticos tornou-se um problema significativo, pois gradativamente as bactérias adquirem a capacidade de resistência a medicamentos, tornando uma ameaça para a saúde pública (CUSHNIE; LAMB, 2011; CAMARGO et al., 2014). A capacidade genética destes microrganismos está associada ao desenvolvimento da resistência, através de mutações espontâneas e recombinações de genes e assim os fármacos antimicrobianos atuam como agentes seletivos (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; BERTOLLO; LUTKEMEYER; LEVIN, 2018).

A combinação da resistência bacteriana com a falta no desenvolvimento de novos medicamentos, resulta no fracasso da antibioticoterapia, exercendo significativo impacto social e econômico (PARISI et al., 2017). Com potencial considerável para o tratamento de doenças infecciosas, vem sendo estudadas estratégias como incorporação em sistemas de entrega de fármacos com suporte da nanotecnologia, permitindo que a eficácia de vários princípios ativos seja aumentada, a inclusão de outros previamente desconsiderados devido suas propriedades desfavoráveis e o desenvolvimento substâncias inéditas antes que sejam lançadas ou aplicadas na terapia (MAINARDES et al., 2006; BONIFÁCIO et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2017 uma lista contendo 12 famílias de bactérias que apresentam uma grande ameaça à saúde pública. A lista é dividida de

acordo com a necessidade de novos antibióticos, classificando os microrganismos em prioridade crítica, alta ou média. Destaca-se como uma das bactérias que são cada vez mais resistente aos fármacos o *Helicobacter pylori*, inclusa na lista como prioridade alta (OPAS, 2017).

O *H. pylori* é classificado como uma bactéria Gram-negativa que coloniza seletivamente o epitélio gástrico e embora esteja frequentemente associado a infecções assintomáticas pode promover o desenvolvimento de distúrbios gástricos, como úlcera péptica, gastrite aguda e crônica, tecido linfóide associado à mucosa (Linfoma de MALT) e adenocarcinomas gástricos (WESSLER et al., 2017; HATHROUBI et al., 2018).

A persistência de *H. pylori* no estômago humano depende de dois eventos iniciais, a neutralização do pH ácido do suco gástrico e sua penetração na mucosa gástrica. Uma variedade de genes de virulência, sua morfologia celular e estratégias para modular as respostas de si e do hospedeiro, são fatores que possibilitam a colonização por *H. pylori* na mucosa gástrica e no epitélio. Dentre os vários fatores de virulência, destacam-se a produção de urease, citotoxina associada ao gene A (CagA), motilidade, citotoxina vacuolizante (VacA) e a capacidade de formar biofilme (BONIFÁCIO et al., 2014; KUMAR; DHIMAN, 2018).

Considerado fatores de virulência, biofilmes são definidos como comunidades microbianas multicelulares que associam a seus artefatos extracelulares formando uma matriz polimérica orgânica a qual se aderem a um substrato ou interface. Assim, biofilmes microbianos são responsáveis pela fixação dos microrganismos às superfícies, colonização dos tecidos do hospedeiro, captura eficiente de nutrientes, e estão diretamente envolvidos na patogênese e na proteção contra substâncias antimicrobianas. As altas taxas de reprodução, ampla capacidade de adaptação e de síntese de substâncias e estruturas extracelulares, como por exemplo, o glicocálice, um componente que auxilia as células em um biofilme a se fixarem ao seu ambiente-alvo, são algumas características apresentadas pelas bactérias, as quais as tornam produtoras de biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002; KASNOWSKI et al., 2010).

Segundo estudos epidemiológicos, no Brasil, a predominância da infecção pelo *H. pylori* é alta em áreas urbanas e rurais, em indivíduos expostos a má qualidade de vida, apresentando renda baixa e recursos de saúde limitados, sendo adquirida principalmente na infância. Segundo estudos, o predomínio de infecção é alta durante os primeiros 2 anos, podendo atingir até 50% em crianças de 2 a 5 anos, 70% a 90% em crianças até 10 anos, e em adultos valores semelhantes a este último. Contudo, são encontradas taxas de prevalência mais baixas em indivíduos com nível superior, famílias com melhor status socioeconômicos, crianças que possuem pais mais

instruídos e aqueles que habitam cidades que possuem condições de saneamento básico melhores (COELHO et al., 2018).

Classificada como infecção bacteriana crônica mais prevalente em humanos, com percentual acima de 50% da população mundial infectada e mais de 80% encontrada em países em desenvolvimento, busca-se novas terapias para controle desta bactéria, pois ainda há uma falha no tratamento, devido a fatores como resistência a antibióticos, consumo de vários medicamentos ao mesmo tempo, período de terapia, além dos efeitos colaterais apresentados pelos antibióticos utilizados atualmente (MOUBRI et al., 2019; SHAHBAZI; SHARIATPANAH, 2019).

Desta forma, devido o predomínio de bactéria resistentes, a pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana e com novos mecanismos de ação é extremamente importante (SALINA; EKINS; MAKAROV, 2018). Adicionalmente, as dificuldades enfrentadas para tratar infecções causadas por *H. pylori*, impulsiona a busca por novas alternativas que visam fornecer estratégias terapêuticas com menores efeitos colaterais, custo e maior eficácia.

Conhecidos por apresentarem atividades antimicrobianas e com moderada citotoxicidade em humanos, os íons metálicos vêm demonstrando atividade contra um amplo espectro de microrganismos (CHEN et al., 2018). A prata é um dos metais mais antigos documentados com aplicações medicinais, principalmente por possuir atividade antibacteriana, além de outras aplicações, como por exemplo, no tratamento de queimaduras de pele, com a utilização da sulfadiazina de prata. Outro derivado largamente utilizado é o nitrato de prata, o qual auxilia na profilaxia da oftalmia neonatal em recém-nascidos e no tratamento de úlceras de pele e feridas pós-cirúrgicas (SHEN et al., 2017; LIANG et al., 2018).

A prata como íon Ag(I) vem sendo muito empregada em compostos de coordenação como centro metálico com diferentes ligantes, os quais são ajustados para uma melhor precisão de liberação dos íons. Expressa atividade antiproliferativa *in vitro*, característica associada à baixa citotoxicidade da prata no corpo humano, tornando assim tais compostos candidatos atraentes à novos fármacos terapêuticos (ARMSTRONG et al., 2018; SANTOS et al., 2018; MOVAHEDI; REZVANI; RAZMAZMA, 2019).

A busca por novos complexos metálicos vem ganhando área com base no combate a resistência antimicrobiana e diversos ligantes tem sido utilizados para ajustar e melhorar a liberação dos íons (ARMSTRONG, et al., 2018).

As tiossemicarbazonas constituem uma categoria de ligantes de relevância devido seus atributos químicos e biológicos, como por exemplo, capacidade de formar compostos de

coordenação, a qual atribui sua propriedade quelante. Na literatura há estudos de sua atividade como agentes antivirais, antitumorais, antifúngicos, antimaláricos, antibacterianos, entre outras. (BERALDO, 2004; TENÓRIO et al., 2005).

Assim, com a capacidade de apresentar consideráveis vantagens para a administração de fármacos, tem havido um aumento na utilização de sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos, os quais são capazes de melhorar a biodisponibilidade de substâncias lipofílicas e hidrofílicas, gerar um aumento na seletividade, como, também, uma redução da dose total necessária, além de diminuir os efeitos colaterais tóxicos (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009). Dentre os sistemas de liberação criados a partir do arranjo de nanoestruturas encontram-se microemulsões, lipossomas, nanoemulsões, micelas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, entre outros (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018; MARKWALTER et al., 2019).

As nanopartículas poliméricas classificam-se em estruturas nanométricas compreendidas na escala 10 a 1000 nanômetros e proporcionam propriedades físico-químicas que as caracterizam como importantes sistemas de liberação, como tamanho pequeno, uma vasta área superficial e possibilidade de diferentes cargas superficial. Neste contexto, as nanopartículas poliméricas atraem interesse devido suas propriedades facilmente ajustáveis, como tamanho, composição e funcionalização de sua superfície (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008; RAMOS et al., 2018; MARKWALTER et al., 2019).

A relevância das infecções provocadas pelo *H. pylori* bem como as dificuldades no controle destas infecções justificam este estudo. Adicionalmente, o uso da nanotecnologia como ferramenta que objetiva potencializar a atividade antibacteriana de compostos de Ag (I) sugere uma nova estratégia no controle das infecções causadas por esse microrganismo. Neste cenário, com a relevância das infecções causadas pelos microrganismos tratados nesse estudo e as dificuldades nos seus tratamentos, bem como a exploração da prata como agente antimicrobiano devido sua ação de largo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, propomos a avaliação de novos compostos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra esses microrganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções microbianas e resistência

Classificada como uma das maiores questões de saúde pública, a infecção bacteriana acomete milhões de pessoas todos os anos. Para combater esses microrganismos, utiliza-se os antibióticos, contudo, com seu uso demasiado e incorreto, esta cada vez mais difícil o tratamento dessas infecções. Seu uso excessivo tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes, dificultando ainda mais os tratamentos (ZHOU et al., 2015; JI; SUN; QU, 2016).

A resistência aos antibióticos possibilita um aumento da morbimortalidade, diminui a eficácia terapêutica, promove a transmissão de infecções a outros indivíduos, traz risco à segurança do paciente, além de elevados custos para os cuidados da saúde (MONTEMAYOR; BOFARULL; MOCHALES, 2014).

Como a maior parte dos compostos antimicrobianos são obtidos naturalmente, o desenvolvimento de resistência é favorecido, os quais podem ser mediante mutações, síntese de substâncias capazes de suprimir a ação do antibiótico ou aquisição de genes de resistência provenientes de demais microrganismos presente no meio. Ainda sim, a pesquisa de novos compostos antimicrobianos são baseados nos mecanismos de ação já conhecidos. Portanto, é de interesse a investigação de novos compostos com mecanismos de ação inéditos, podendo ser a solução para a resistência aos fármacos atuais (SILVA; AQUINO, 2018).

2.2. *Helicobacter pylori*

2.2.1. Nomenclatura e aspectos gerais

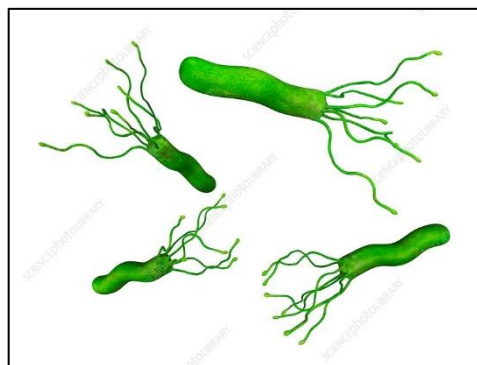
Classificada inicialmente no gênero *Campylobacter*, com o nome de *C. pyloridis*, o qual foi posteriormente corrigido para *C. pylori*, apresentava evidências de que a bactéria poderia não pertencer ao gênero. Devido a presença de ácidos graxos incomuns a outras campylobactérias, diferença na estrutura, sendo que *C. pylori* era lisa, enquanto as outras não, presença de até seis flagelos embainhados, ao invés de um, característica de outras campylobactérias, sugeriu-se a mudança de gênero (PENNER, 1988). Assim, a bactéria foi incluída em um novo gênero, denominado *Helicobacter*. O nome *Helicobacter* remete à

morfologia dos organismos, que são helicodais *in vivo*, e geralmente semelhantes a varetas *in vitro* (GOODWIN et al., 1989).

O gênero *Helicobacter*, pertencente a família *Helicobacteraceae*, é composto por 37 espécies gástricas e não gástricas (*Helicobacteres* enterohepáticos), sendo *H. pylori* (Figura 1) a principal espécie encontrada na mucosa gástrica humana (van der MEE-MARQUET et al., 2017).

A bactéria *H. pylori* identificada em 1982, por Barry Marshall e J. Robin Warren, foi isolada de amostras de biópsias gástricas de pessoas com gastrite crônica e úlceras. Mediante os postulados de Koch, Barry Marshall confirmou que *H. pylori* era a principal causa de patologias gástricas, sendo classificada como Gram negativa, espiralada em forma de S, possuindo de 5 a 7 flagelos, microaerófila e fastidiosa (WARREN; MARSHALL, 1983; BONIFÁCIO et al., 2014). Apresenta morfologia homogênea, ou seja, superfície lisa, extremidades arredondadas, móvel e não-esporulada. Sua forma helicoidal contribui com a movimentação impulsionada por seus flagelos o qual promove uma ruptura no revestimento protetor do estômago e associado com o processo inflamatório crônico e liberação de citocinas e quimiocinas, pode promover o desenvolvimento de distúrbios gástricos, como úlcera péptica, gastrite aguda e crônica, linfoma da mucosa gástrica associada ao tecido linfóide (MALT) e adenocarcinomas gástricos (PROCTOR; DEANS, 2014; WESSLER et al., 2017; SPÓSITO et al., 2019).

Figura 1. *Helicobacter pylori*.



Fonte: Science Photo Library, 2019

Embora mais de 50% da população esteja infectada, não são todos indivíduos infectados que desenvolvem a doença clinicamente. A taxa de infecção varia de acordo com a área geográfica, condições socioeconômico, idade e etnia. A ocorrência é maior em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos, sendo que nos últimos anos ela diminuiu diante da melhora do saneamento básico (SUGIYAMA et al., 2019).

2.2.2. Fatores de virulência

Determinadas espécies de microrganismos apresentam perfis de resistência aos mais diversos antimicrobianos disponíveis na prática clínica, e este perfil está relatado com a aparecimento de fatores de virulência atribuídos a cada espécie. A característica de multirresistência pode ser considerada como uma das estratégias desempenhadas pelos microrganismos para vencer as barreiras imunológicas do hospedeiro e possibilitar a sua colonização (DHAR et al., 2003).

Dentre os fatores que auxiliam no desenvolvimento de doenças gastroduodenais graves, encontra-se os fatores de virulência desenvolvidos por cepas patogênicas. O *H. pylori* apresenta, como fatores de virulência, capacidade de adaptação às mudanças ambientais, produção de urease, citotoxina associada ao gene A (CagA), sua motilidade, citotoxina vacuolizante (VacA) e capacidade de formar biofilme.

Esse microrganismo, através da capacidade de sofrer transformação morfológica, consegue se adaptar às mudanças ambientais. Ocorrem em duas formas morfológicas, ou seja, espiral (viva e cultivável) e cocóide (viável mas não cultivável), sendo a transição observada através de condições ambientais abaixo do ideal, como alterações de temperatura ou pH, aerobiose, exposição a antibióticos ou IBP, estresse ou incubação prolongada. Tal forma, cocóide, apresenta altos níveis de proteínas que participam da replicação do DNA e da iniciação da carcinogênese, sendo então, consideradas virulentas (KRZYŻEK; BIERNAT; GOŚCINIAK, 2018).

A capacidade de sobreviver ao ácido clorídrico é de extrema relevância, visto que a mucosa gástrica é seu habitat usual. A urease, uma proteína que apresenta elevado peso molecular, sintetizada pela bactéria, permite que isso ocorra, pois promove a hidrólise da uréia, a qual está existente em circunstâncias fisiológicas no suco gástrico, assim, conduzindo a formação de amônia e dióxido de carbono. A amônia funciona como um receptor de H^+ , gerando um pH neutro no meio intracelular e no entorno da bactéria, conferindo resistência à acidez do meio gástrico. Desse modo, a bactéria é mantida protegida dos efeitos nocivos do pH ácido do estômago. Ademais, a urease está relacionada com a ativação de células de defesa do sistema imunológico, como neutrófilos e monócitos, resultando em uma inflamação no local de adesão (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003; BONIFÁCIO et al., 2014).

O *H. pylori* permanece dentro da camada de muco que cobre o epitélio gástrico, mantendo-se distante das células imunes que são recrutadas em resposta à inflamação. Através

das ações do seu sistema de secreção tipo IV (T4SS) codificado pela ilha de patogenicidade *cag* (*cagPAI*), a qual apresenta o gene cytotoxic-associated gene A (*cagA*), um marcador da presença da ilha de patogenicidade no genoma das diferentes estirpes, a bactéria induz a inflamação. O produto de secreção do gene *cagA* é a *oncoproteína cytotoxin-associated antigen A* (CagA) a qual é transportada para o interior das células epiteliais gástricas através do T4SS, onde se torna fosforilada, interagindo com vias de sinalização intracelulares, resultando na ativação de moléculas como NF- κ B, SHP2 e ERK. Como resultado da ação da CagA, ocorre uma desorganização morfológica das células epiteliais, afetando a polaridade e adesão intercelular, além da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A CagA é polimórfica, o que a confere ser responsável por diferentes risco de doenças, sendo implicada fortemente na carcinogênese gástrica (COELHO et al., 2016; LEHOURS; FERRERO, 2019).

Outro fator de virulência de grande importância é a citotoxina vacuolizante (VacA), codificada pelo gene *vacuolating cytotoxin* (*vacA*) que tem como principal ação a vacuolização celular por formação de poros na membrana das células epiteliais, além da despolarização da membrana, estimulação de apoptose, adesão intercelular e bloqueio de células T, este último ajuda o *H. pylori* a resistir à depuração imunológica, estabelecendo, assim, uma infecção persistente no hospedeiro. VacA exerce um papel fundamental na sobrevivência de *H. pylori*, levando um fluxo de íons e nutrientes da mucosa em direção ao lúmen do estômago, resultando em alterações na integridade das células do epitélio gástrico. É composta por duas subunidades – p33 e p55, sendo que o gene *vacA* é capaz de variar em três regiões: peptídeo sinal (s1 ou s2), região intermédia – p33 (i1 ou i2) e região média – p55 (m1 ou m2). A forma s1/i1/m1 é completamente ativa enquanto a forma s2/i2/m2 é inativa. Dentre as formas, a s1, tem uma maior chance de ulceração péptica, levando ao desenvolvimento de câncer gástrico. O gene VacA está presente em quase todas as cepas de *H. pylori*, porém, há considerável variação da atividade toxica existente entre as cepas (COELHO et al., 2016; CHAUHAN et al., 2019; FOEGEDING et al., 2019).

A forma em espiral e o flagelo do *H. pylori* desempenham um papel importante na colonização da mucosa gastrointestinal, facilitam o seu movimento e aderência ao epitélio gástrico, possibilitando assim a penetração na mucosa e a sobrevivência do organismo no estômago humano (GUIMARÃES; CORVELO; BARILE, 2008).

O *H. pylori* ainda tem a capacidade de persistir como entidade infecciosa e resistir ao arsenal de agentes antimicrobianos. Seu artifício para sobreviver se dá pela capacidade de

formação de biofilmes (CELLINI et al., 2008). Segundo Carron et al. (2006) as evidências fotográficas demonstraram a capacidade de *H. pylori* formar biofilme *in vivo*, através de biópsias gástricas de pacientes positivos para *H. pylori*.

2.2.3. Doenças associadas ao *H. pylori*

Após sua descoberta, em 1983, como fator etiológico da úlcera péptica, a infecção por *H. pylori* foi relacionada a outras doenças importantes do trato gastrointestinal, como gastrite crônica, linfoma da mucosa gástrica associada ao tecido linfóide (MALT) e carcinoma gástrico.

Dentre as patologias relacionadas ao *H. pylori*, a úlcera péptica se destaca como a mais prevalente provocada por esse patógeno, a qual engloba tanto úlceras gástricas quanto úlceras duodenais. É designada por uma ruptura na mucosa e desaparecimento do tecido superficial, devido a uma instabilidade entre ácido clorídrico, pepsina e uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) considerados fatores agressivos e secreção de bicarbonato e muco e a produção de prostaglandinas, fatores de proteção da mucosa gástrica, levando assim a formação de uma inflamação local (SRIKANTA; SATHISHA; DHARMESH, 2010; BRAZ et al., 2013). A sintomatologia da úlcera péptica consiste principalmente na dor de estômago ardente, podendo ser seguido de outros sintomas, como náuseas, inchaço, saciedade precoce, plenitude e intolerância a alimentos gordurosos. Porém, com uma menor frequência, podem aparecer sintomas mais graves, como vômitos (com presença ou não de sangue), presença de fezes escuras, sugestivo de sangue oculto nas fezes, mudança de apetite e perda de peso (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

Considerada o tipo mais comum de úlcera péptica, as úlceras duodenais podem ser assintomáticas, sendo essa ausência de sintomas encontrada em úlceras induzidas pelo uso de AINEs. Apresenta perfuração ou hemorragia digestiva como primeiro sintoma clínico da doença, sendo o sangramento considerado a complicação mais frequente e grave das úlceras, principalmente em pessoas acima de 60 anos (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

Fatores como fumo, ingestão de álcool, estresse, carência nutricional, uso excessivo e prolongado de AINEs e infecção por *H. pylori* colaboram no surgimento de úlceras gástricas (THORSEN et al., 2013). A proliferação dessa bactéria no estômago desenvolve um processo inflamatório que prejudica a mucosa gástrica e afeta o mecanismo de defesa natural, além de aumentar a lesão inflamatória da mucosa através da produção de imunoglobulinas ligadas aos antígenos de superfícies das células epiteliais gástricas (PEEK et al., 2010).

Das patologias causadas pelo *H. pylori*, enfatiza-se o desenvolvimento do câncer do estômago. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esse patógeno é classificado como carcinógeno Classe I para câncer gástrico e considerado fator de risco para o surgimento de adenocarcinoma gástrico e linfoma da mucosa gástrica associada ao tecido linfóide (MALT) (SUZUKI et al., 2013; FIORENTINO et al., 2013; PROCTOR; DEANS, 2014).

O adenocarcinoma do tipo intestinal é considerado o câncer gástrico mais frequentemente diagnosticado. Seu desenvolvimento consiste pela transição da mucosa normal para gastrite superficial crônica (gastrite não atrófica) provocada principalmente pela infecção pelo *H. pylori*. Em seguida, a gastrite evolui para gastrite atrófica, seguida de metaplasia intestinal e, finalmente, displasia e adenocarcinoma. A infecção por *H. pylori* é considerada o maior fator de risco para câncer gástrico, o qual é considerado a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer, além de ser o quarto mais comum em todo o mundo (DIAZ et al., 2018; HATAKEYAMA, 2019).

O linfoma MALT é um linfoma de baixo grau extranodal, originário de linfócitos B na zona marginal do MALT. Relativamente raro, é responsável por 1% a 6% de todas as neoplasias gástricas e 20% a 40% dos linfomas extranodais. Sob condições fisiológicas, a mucosa do estômago não contém tecidos linfóides, contudo, a infecção crônica por *H. pylori* induz a formação de MALT na mucosa gástrica como resultado de estímulos persistentes com antígenos de *H. pylori*. A infecção por *H. pylori* está implicada em cerca de 90% dos linfomas MALT gástricos e, portanto, a erradicação do patógeno constitui o tratamento de primeira linha para o linfoma MALT gástrico por *H. pylori* (+) (ESPINOZA et al., 2018; HATAKEYAMA, 2019).

Assim, o controle desta bactéria auxilia no tratamento e na prevenção dessas doenças gastroduodenais.

2.2.4. Terapias medicamentosas utilizadas para a erradicação do *H. pylori*

Os regimes convencionais de terapia para erradicação do *H. pylori* são baseados em antibióticos como amoxicilina, claritromicina, tetraciclina, metronidazol, bem como com auxílio de outros medicamentos, como inibidores da bomba de prótons (IBP) e sais de bismuto (OLEKHNOVICH et al., 2019).

A terapia anti-*H. pylori* varia de acordo com a região analisada. Em locais onde há baixa resistência a claritromicina, recomenda-se a utilização da terapia tripla clássica, a qual consiste em uma combinação de um IBP, claritromicina e amoxicilina ou metronidazol como alternativa

para pacientes alérgicos a penicilinas. Em áreas com alta resistência a claritromicina, a terapia quadrupla é uma das alternativas. A terapia quadrupla pode ser classificada como terapia tripla clássica com metronidazol ou não-bismuto (IBP, amoxicilina, claritromicina e metronidazol), terapia quádrupla clássica ou bismuto (IBP, bismuto, metronidazol e tetraciclina) e terapia tripla de segunda linha com a adição de bismuto (IBP, amoxicilina, levofloxacina e bismuto) (CALVET, 2018; HUANG et al., 2018).

Em áreas onde a resistência ao metronidazol não é muito significativa, ainda é realizado a substituição da claritromicina por metronidazol. Contudo, a dupla resistência à claritromicina e ao metronidazol prejudica a eficácia das terapias não-bismuto. A terapia bismuto demonstrou alta eficácia, apesar da resistência ao metronidazol na Europa. Assim, em regiões com alta resistência dupla à claritromicina e ao metronidazol, a terapia bismuto é considerada um tratamento de escolha (MALFERTHEINER et al., 2017).

Contudo, recentemente foram atualizadas diretrizes de consenso internacional e nacional sobre o tratamento adequado para *H. pylori*. Destaca-se a importância de ter acesso aos dados locais de resistência bacteriana para então selecionar o possível tratamento. Dentre as diretrizes, solicitam descontinuar a terapia tripla clássica em regiões em que a incidência de resistência à claritromicina seja superior a 15% e usar um regime quádruplo, com ou sem bismuto, com o intuito de obter mais sucesso (SALAR, 2019).

Existem três regras básicas que, se seguidas, otimizam o tratamento, que são: investigação de exposições anteriores dos pacientes a antibióticos, utilização de altas doses de IBPs e evitar a repetição de regimes terapêuticos que não funcionaram no passado (ZAGARI et al., 2018).

2.3. Biofilme

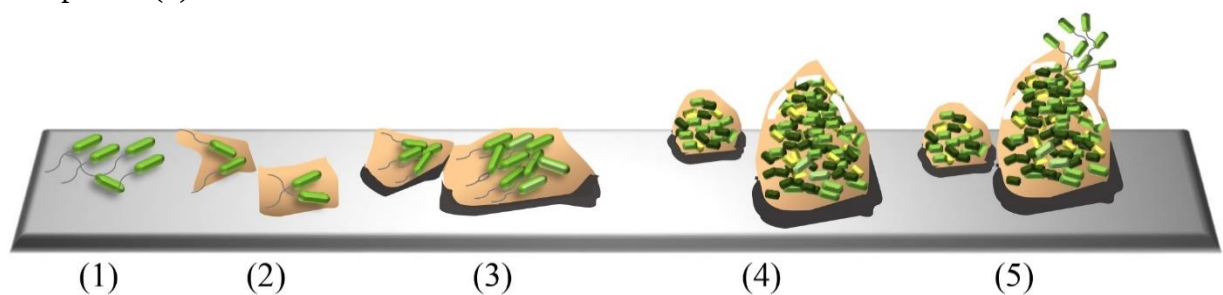
Biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos que aderem a superfícies bióticas ou abióticas através de uma matriz extracelular polimérica (MEP) (polímeros, como polissacarídeos, proteínas, DNA extracelular ou ácidos nucleicos, secretados pelas bactérias). A matriz de biofilme que circunda as bactérias as torna tolerantes a condições adversas e resistentes a tratamentos antibacterianos e fortemente resistentes a fagocitose, dificultando sua erradicação (DONLAN, 2002; REN et al., 2018; ROY et al., 2018).

A formação do biofilme engloba quatro principais etapas (Figura 2): chegada do microrganismos ao local de adesão, adesão primária, adesão irreversível, maturação e dispersão. Na etapa de adesão primária, as células planctônicas se aderem a uma determinada

superfície (biótica ou abiótica) através de forças de van der Waals, forças gravitacionais, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas, sendo esta etapa reversível. Após o período de adesão primária, onde é formada a primeira camada de microrganismos, a adesão de outros microrganismos é favorecida, ocorrendo assim a adesão irreversível, onde as células iniciam a produção de MEP, o qual, além de manter as células aderidas umas as outras, se comporta como uma membrana protetora a qual permite um ambiente interno diferenciado que possibilita alterações de pH, umidade, temperatura, produção de toxinas, expressão dos fatores de virulência e troca de plasmídeo, sendo essa aderência irreversível (através de interações dipolo-dipolo e ligações covalentes). Na etapa de maturação, a junção do crescimento bacteriano com a produção de MEP gera a formação da camada de biofilme, em questão de dias. Após a formação do biofilme maduro, ocorre a fase de dispersão, a qual gera o desprendimento das células deste biofilme já formado, os quais podem iniciar a formação de um novo biofilme em superfícies adjacentes (DONLAN, 2002; LANGER et al., 2018; RAMOS et al., 2018).

A persistência da infecção bacteriana e o aumento da resistência a antibióticos podem ser atribuídos à formação de biofilmes. As bactérias incorporadas no biofilme tornam-se resistentes a medicamentos devido a vários fatores que tornam a terapia antimicrobiana ineficaz, como a formação de MEP. Mesmo um microrganismo altamente sensível pode desenvolver uma resistência de 1000 vezes quando incorporado em um biofilme. A resistência pode ser devido a má expressão de proteínas, ao encapsulamento da matriz de MEP, fatores de crescimentos diminuídos, diferenças fenotípicas, ativação da bomba de efluxo e comunicação intercelular, assim, busca-se estratégias que podem ajudar a resolver esse problema sério (VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

Figura 2. Representação do processo de formação de um biofilme microbiano através da chegada dos microrganismos (1) adesão primária (2), adesão irreversível (3), maturação (4) e dispersão (5).



Fonte: Autora

2.4. Atividade antibacteriana de metais

Alguns metais cumprem funções celulares que não podem ser atendidas por moléculas orgânicas e, portanto, são indispensáveis para a bioquímica da vida em todos os organismos. A capacidade que os metais possuem de perder elétrons, formando espécies carregadas positivamente e se tornarem solúveis em sistemas biológicos os tornam relevantes para aplicações medicinais, possibilitando interações com moléculas biológicas, as quais possuem elétrons. Assim, há uma propensão para que essas cargas opostas dos íons metálicos e das moléculas biológicas interajam e se liguem (ADEYEMI; ONWUDIWE, 2018).

A atividade antimicrobiana dos metais pode ser aumentada quando estes são combinados com outros metais, antibióticos ou desinfetantes. Por exemplo, o citrato de bismuto e o salicilato de bismuto são utilizados em conjunto com os antibióticos utilizados na terapia contra *H. pylori* (LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Dentre os metais que apresentam atividade antimicrobiana e possuem um grande histórico de uso na medicina, destaca-se a prata.

2.4.1. Prata (Ag)

Conhecida por apresentar a mais alta refletividade dentre todos os metais, a prata, um metal de transição macio e brilhante, possui muitas propriedades úteis, dentre elas a atividade antimicrobiana (SIM et al., 2018).

As propriedades da prata já vêm sendo utilizadas desde os tempos antigos, há milhares de anos, quando foi utilizada na preservação de alimentos e produção de água. Mesmo quando não eram de conhecimento sobre microrganismos, mas existia o conhecimento sobre contaminações microbianas. Hipócrates, o pai da medicina, prescreveu preparações de prata contra infecções, os romanos, mais tarde, entenderam o uso medicinal do nitrato de prata, e continuaram sendo utilizados no tratamento de feridas e úlceras de pele. Mais tarde, surge a sulfadiazina de prata, a qual é utilizada até hoje no tratamento de infecções associadas a queimaduras (VIMBELA et al., 2017; LEITÃO et al., 2018).

Até o momento, existem três mecanismos de ação conhecidos da prata frente aos microrganismos, sendo eles: formação de poros e perfuração da parede celular bacteriana e reação com o componente peptidoglicano; permeação na célula bacteriana, com posterior inibição da respiração celular e interrupção das vias metabólicas resultando na formação de

espécies reativas de oxigênio e rompimento do DNA e de seu ciclo de replicação (SIM et al., 2018; SOLIMAN; ELSILK, 2018).

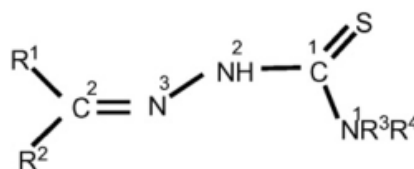
Dentre os estados de oxidação da prata, o estado de oxidação +1 ou (I) é o mais comum quando em combinação com algum elemento da tabela periódica. Contudo, quando se refere a complexos, o estado de oxidação +2 ou (II) é o mais comum, o qual proporciona geometria quadrado planar e são paramagnéticos. Porém, os complexos de Ag (I) são bastante utilizados, estes possuem geometria linear e são diamagnéticos (SOUZA et al., 2013).

Diante do sucesso da prata com atividade antibacteriana, é considerável sua utilização na síntese de novos complexos metálicos, como estratégia para a produção de novos compostos contra bactérias resistentes (ROCHA et al., 2011).

2.4.2. Tiossemicarbazona

As tiossemicarbazonas constituem uma classe de ligantes de interesse devido suas propriedades químicas e biológicas, como por exemplo, capacidade de formar compostos de coordenação, a qual atribui sua propriedade quelante. Na literatura há estudos de sua atividade como agentes antivirais, antitumorais, antifúngicos, antimaláricos, antibacterianos, entre outras. Sua atividade pode ser modulada através do desenho de seus ligantes e no caso de complexos metálicos, na escolha do metal utilizado (BERALDO, 2004; TENÓRIO et al., 2005). Nas ligações coordenadas com metais, sua ligação pode ser estabelecida tanto pelo átomo de enxofre, quanto através do átomo de nitrogênio azometínico (C=N) formado durante a reação quimiosseletiva de aldeídos ou cetonas com tiossemicarbazidas. A estrutura básica das tiossemicarbazonas é indicada na Figura 3 (SINGH; GARG; SINGH, 1978).

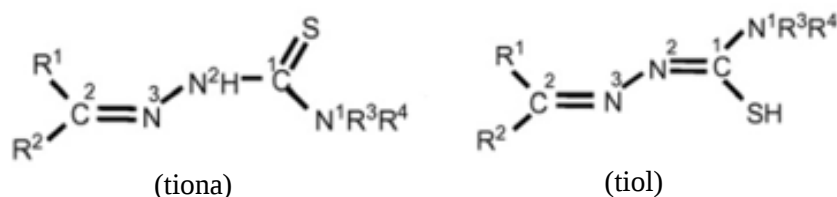
Figura 3. Estrutura geral da tiossemicarbazona.



Fonte: Lobana et al., 2009

As tiossemicarbazonas são classificadas em mono-tiossemicarbazonas e bis-tiossemicarbazonas, classificação a qual diferencia-as com relação aos seus diferentes substituintes R_1 , R_2 , R_3 e R_4 . Também apresentam-se sob duas formas tautoméricas: tiona ($=S$) e tiol (SH) (Figura 4), a qual direciona o modo de ligação entre o ligante e o metal (LOBANA et al., 2009).

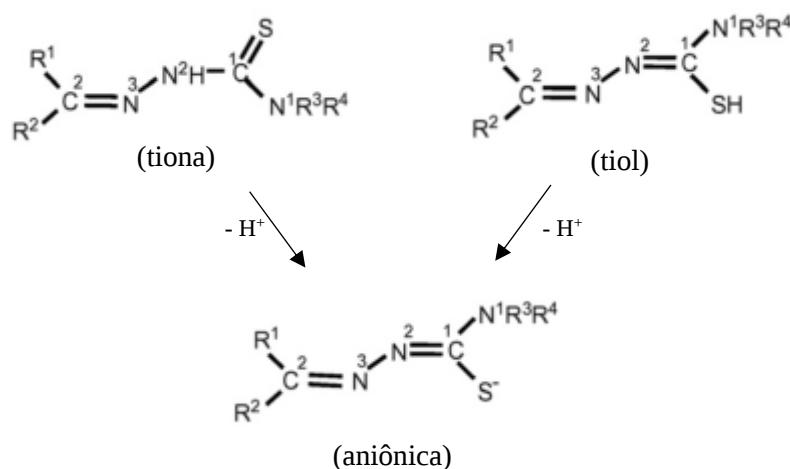
Figura 4. Formas tautoméricas das tiossemicarbazonas



Fonte: Lobana et al., 2009

A química de coordenação das tiossemicarbazonas foi descoberta em meados dos anos 1960. Suas propriedades biológicas são constantemente relatadas à coordenação com íons metálicos, a qual pode ocorrer através das formas neutra (tione) ou aniônica. A forma aniônica é gerada após a perda de íons hidrogênio N_2H (tione) ou SH (tiol) (Figura 5) (LOBANA et al., 2009).

Figura 5. Forma aniônica da tiossemicarbazona



Fonte: adaptado de Lobana et al., 2009

2.4.3. Compostos de coordenação

Compostos de coordenação ou complexos metálicos referem-se a um átomo ou íon metálico (ácido de Lewis) rodeado por um conjunto de ligantes (bases de Lewis). A ligação entre ácido e base de Lewis é definida como coordenada, também conhecida por ligação covalente dativa, sendo o átomo ou íon metálico o receptor de elétrons, enquanto que, os ligantes, os átomos doadores de elétrons (MIESSLER; TARR, 2011).

O uso de complexos metálicos na medicina ganhou impasse com o trabalho de Paul Ehrlich, o qual introduziu os primeiros conceitos de estrutura atividade, através do estudo de complexos de arsênio para o tratamento da sífilis. Contudo, foi Alfred Werner, que desenvolveu a teoria da ligação química nos complexos metálicos. A primeira descoberta de complexos metálicos com atividade biológica foi descrita por Barnett Rosenberg, em 1965, com o composto (*cis*[Pt(NH₃)₂Cl₂]), conhecido por cisplatina. A partir daí, o interesse pela busca de outros complexos metálicos com atividade farmacológica cresceu (BERALDO; GAMBINO, 2004). A complexação de moléculas ativas à íon metálicos vem sendo utilizada com a finalidade de potencializar a atividade antimicrobiana, no controle de infecções e a novos antibióticos (GRABCHEV et al., 2016). A coordenação de metais à antibióticos, por exemplo, à tetraciclina e as sulfas, tem apresentado uma potencialização na atividade comparada aos fármacos livres (ROCHA et al., 2011; APOHAN et al., 2017).

Os compostos de coordenação despertam notáveis benefícios em sua utilização nas ciências da saúde em virtude da possibilidade de ajustar a atividade antimicrobiana, bem como outras propriedades desejáveis através da modificação do número e tipo de ligantes coordenados ao íon metálico (SILVER, 2003; ISAB et al., 2010; ALTAF et al., 2013; SULLIVAN et al., 2014).

A interação entre os íons metálicos (cátions) e a maioria das moléculas biológicas, como proteínas e DNA (ânions), se dá através da atração de suas cargas opostas dentro dos sistemas biológicos. À vista disso, a coordenação de íons metálicos apresenta-se como uma alternativa na reversão da resistência aos antibióticos, como também um mecanismo para o desenvolvimento de novos fármacos (GRABCHEV et al., 2016). Porém, o uso de compostos de coordenação como fármacos implica algumas preocupações, como, por exemplo, sua baixa solubilidade em água (OLIVEIRA et al., 2006).

2.5. Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos

Na área da saúde, a nanotecnologia é definida através do emprego de pequenas estruturas, inferiores a 1000 nanômetros, que são planejadas com o intuito de apresentar propriedades específicas (DIMER et al., 2013). Um exemplo é o uso de sistemas nanoestruturados, os quais são capazes de aprimorar o desempenho biológico de vários princípios ativos e podem inclusive controlar sua liberação direcionando para determinados tecidos ou órgãos do organismo, aumentando sua seletividade. A redução da dose total necessária, a qual também permite uma redução dos efeitos colaterais, e o controle de liberação são estratégias que tem chamado a atenção das indústrias e da comunidade científica (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009).

A incorporação em sistemas de entrega de fármacos à base de nanotecnologia apresenta um potencial considerável para o tratamento de doenças infecciosas, o qual tem proporcionado um aumento na eficiência de diversos princípios ativos, além da inserção de outras substâncias ativas anteriormente descartadas devido suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novas substâncias antes que sejam efetivamente lançadas no mercado ou utilizadas na terapêutica (MAINARDES et al., 2006; BONIFÁCIO et al., 2014). Têm sido desenvolvidos novos veículos com o objetivo não só de aumentar a seletividade e eficácia de princípios ativos, como, também, redução da dose total necessária, além de diminuir os efeitos colaterais tóxicos (GRILL et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2009).

Para a obtenção de formulações nanotecnológicas, a seleção dos materiais é realizada de conforme suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento (DIMER et al., 2013).

Dentre os sistemas de liberação criados a partir do arranjo de nanoestruturas encontram-se microemulsões, lipossomas, nanoemulsões, micelas, dendrímeros, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas (KHOSA; REDDI; SAHA, 2018).

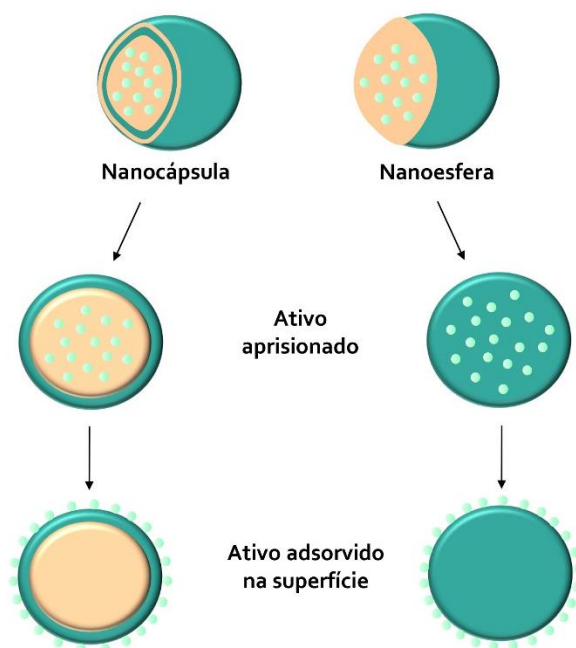
2.5.1. Nanopartícula polimérica

As nanopartículas poliméricas (NPs) representam uma área de aplicação da tecnologia de liberação controlada que está em uso clínico há mais de 25 anos para administração local e sistêmica de fármacos. Classificam-se em estruturas nanométricas compreendidas na escala 10

a 1000 nanômetros, proporcionam propriedades físico-químicas que as tornam importantes sistemas de liberação, como tamanho reduzido, grande área superficial e possibilidade de diferentes cargas superficial. Neste contexto, as NPs atraem interesse devido suas propriedades facilmente ajustáveis, como tamanho, composição e funcionalização de sua superfície (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008; TROIANO et al., 2016; RAMOS et al., 2018; MARKWALTER et al., 2019).

As NPs podem ser de dois tipos, nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo, o qual pode ser oleoso ou não, podendo o princípio ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Em contrapartida, as nanoesferas compreende uma matriz polimérica, na qual encontra-se dispersos uniformemente os compostos ativos e o polímero, e não apresentam óleo em sua composição. Assim, considerando os mecanismos de encapsulamento, as moléculas de princípio ativo podem encontrar-se aprisionadas no interior, dispersas na matriz polimérica ou adsorvidas à superfície das nanopartículas conforme ilustrado na Figura 6 (NAGAVARMA et al., 2012).

Figura 6. Classificação das nanopartículas poliméricas de acordo com a organização estrutural, classificada em nanocápsula e nanoesfera e mecanismos de encapsulamento do princípio ativo, por aprisionamento no interior ou adsorção na superfície na nanopartícula.



Fonte: Autora

As vantagens da aplicação de NPs como carreadores de moléculas envolvem a perspectiva de modulação do diâmetro e das características das NPs, as quais, por possuírem diâmetro pequeno, permitem a administração intravenosa, além de outras vias, como, oral, nasal, intraocular e tópica. Possuem alta estabilidade no corpo, longa estabilidade de armazenamento e maior biocompatibilidade e biodegradabilidade. Esses recursos permitem o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com diferentes tempos de degradação e liberação controlada, além de ser fácil o preparo e boa reprodutibilidade (MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAMOS et al., 2018).

Como sistemas de liberação de fármacos, apresentam interesse significativo devido a muitas características apresentadas pelos polímeros, como simplicidade de síntese, peso molecular controlável, baixo custo, responsabilidade ambiental, além de biocompatibilidade e biodegradabilidade. NPs devem possuir quantidade suficiente e liberar o princípio ativo na dose ideal. Já foi demonstrado que os conjugados polímero-droga podem melhorar o tempo de permanência no sangue, além de diminuir os efeitos colaterais (ALEXIS et al., 2008; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; LI; THAMBI; LEE, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho visou avaliar o potencial anti-bacteriano, especialmente frente ao *Helicobacter pylori* de compostos de coordenação de prata (I) não incorporados e incorporados em sistema de liberação de fármacos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos $[\text{Ag}(\text{PhTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Ag}(\text{HTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), $\text{Ag}(\text{PhTSC} \cdot \text{HCl})_2(\text{Cl}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3) e $[\text{Ag}(\text{HTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{Cl}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4), $[\text{L}_1 (\text{PhTSC} = 2\text{-piridinacarboxaldeído-}N(4)\text{-feniltiossemicarbazona})$ e $\text{L}_2 (\text{HTSC} = 2\text{-piridinacarboxaldeído-tiossemicarbazona})]$ frente ao *Helicobacter pylori* ATCC 43504.
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos em modelo de bactéria Gram + e Gram – nas espécies de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente;
- Preparar a formulação (nanopartícula polimérica) pela técnica de nanoprecipitação, para incorporação dos compostos de coordenação de prata (I);
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas pela técnica de dispersão de luz dinâmica, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos incorporados frente as bactérias;
- Avaliar a atividade do composto mais ativo (não incorporado e incorporado) sobre a formação do biofilme e biofilmes maduros de *H. pylori*;
- Determinar o potencial citotóxico do composto mais ativo (não incorporado e incorporado) sobre linhagem celular MRC-5 e J774A.1;
- Determinar o potencial mutagênico do composto mais ativo (não incorporado e incorporado);
- Determinar o potencial tóxico do composto mais ativo (não incorporado e incorporado) em modelo alternativo *in vivo* de *Galleria mellonella*.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos compostos de coordenação de prata (I)

Os compostos de coordenação de prata (I) - $[\text{Ag}(\text{PhTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Ag}(\text{HTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), $[\text{Ag}(\text{PhTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{Cl}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3) e $[\text{Ag}(\text{HTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{Cl}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4) foram sintetizados e caracterizados pela doutoranda Débora Eduarda Soares Silva do grupo do Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto do Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara, cujo processo de síntese está ilustrado na Figura 7.

Os ligantes L_1 (PhTSC = 2-piridinacarboxaldeído-*N*(4)-feniltiossemicarbazona) e L_2 (HTSC = 2-piridinacarboxaldeído-tiossemicarbazona) foram sintetizados sob agitação magnética e proteção da luz, em ± 350 rpm, à ± 65 °C, durante 4 - 6 horas.

Para a síntese dos compostos utilizou-se acetonitrila como solvente da reação. Os compostos I e II foram sintetizados com o sal AgNO_3 e os ligantes L_1 e L_2 , respectivamente. Enquanto os compostos III e IV com o sal AgCl e L_1 e L_2 , respectivamente. Os compostos foram mantidos sob agitação magnética, a ± 50 °C, ± 400 rpm durante 24 horas protegidos da luz. Após a síntese, os precipitados foram isolados por filtração, lavados com éter dietílico e seco sob vácuo.

Figura 7. Processo de síntese do composto $[\text{Ag}(\text{PhTSC} \cdot \text{HCl})_2](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ como representativo da síntese dos compostos (1), (2), (3) e (4).



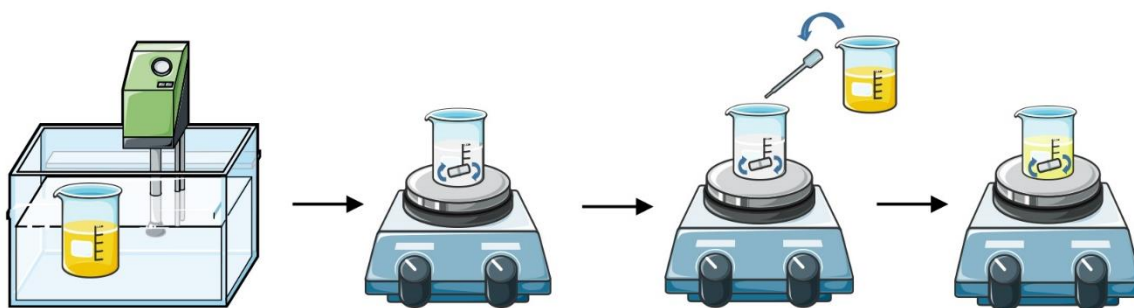
Fonte: Autora

4.2. Preparo da formulação nanoestruturada

4.2.1. Nanopartículas poliméricas – NPs

A Figura 8 ilustra o processo de obtenção do sistema polimérico. As NPs foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação descrita por Fessi et al (1989), empregando 9 mg do polímero poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e 200 mg dos compostos de coordenação (1, 2, 3 e 4), solubilizados em 5 mL de acetona e levados ao banho de ultrassom, por 10 min. Foram utilizados uma solução de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) (10 mL) e 15 mg de poloxamer 407 (PLX) 0,15% como fase aquosa. Posteriormente a dissolução dos componentes nas duas fases, a fase orgânica foi inserida lentamente sob a fase aquosa através de uma pipeta de Pasteur, sob agitação e a suspensão obtida foi mantida sob agitação a ± 400 rpm e temperatura ambiente até remoção total do solvente orgânico. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do composto, obtendo-se uma nanopartícula polimérica base (NPB).

Figura 8. Representação esquemática do preparo da nanopartícula polimérica incorporada.



Fonte: Autora

4.2.2. Caracterização das NPs

4.2.2.1. Dispersão de luz dinâmica

O diâmetro e a homogeneidade das gotículas foram obtidos pela técnica de correlação de fótons (*quase-elastic light scattering*). Para isso, utilizou-se o equipamento de dispersão dinâmica de luz (DLS, Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK), o qual determina pequenas mudanças no diâmetro médio das partículas ou pequenas variações no processo de manufatura. Assim, a técnica consiste na emissão de um feixe de luz sobre uma

dispersão coloidal, onde as partículas ou gotas permitem o espalhamento da luz em todas as direções, os quais são detectados e enviados a um computador. Então é calculado o raio hidrodinâmico das partículas coloidais, pela equação de Stokes-Einstei (equação 1):

$$D = KT/6\pi\eta Rh \quad (\text{equação 1})$$

onde, D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23}$ NmK⁻¹); T: temperatura absoluta (293,15 K); π : 3,141592; η : viscosidade ($1,002 \times 10^{-3}$ NM⁻² s); Rh: raio hidrodinâmico.

As nanopartículas poliméricas (não incorporadas e incorporadas) foram analisadas na célula eletroforética através do feixe de laser por toda sua extensão. As amostras foram diluídas (1:10) usando água Mili-Q. A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm, ângulo de detecção de 173° e o índice de refração conforme o índice observado para cada amostra analisada. Para cada amostra, 10 determinações do diâmetro foram realizadas, das gotículas e do índice de polidispersão (IPD) (n=3), calculando a média e o desvio padrão.

4.2.2.2. Potencial zeta (PZ)

O PZ foi obtido através da determinação da mobilidade eletroforética das nanopartículas poliméricas (não incorporadas e incorporadas), pela análise da carga elétrica na superfície das gotículas, utilizando o Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK. As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:10) e depois, inseridas na célula eletroforética. Foram realizadas 3 determinações do potencial de superfície para cada amostra, calculando-se a média e o desvio padrão.

4.2.2.3. Estabilidade

A estabilidade das nanopartículas foi analisada mediante determinação do diâmetro das gotículas, IPD e potencial zeta a partir do tempo 0 (zero), medidas durante intervalos de 15 dias, totalizando 90 dias. Realizou-se 3 leituras para cada amostra, calculando-se a média e o desvio padrão. Diante do perfil obtido na estabilidade, foi selecionado uma amostra para seguir com os ensaios seguintes.

4.2.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras [NPB e nanopartícula polimérica incorporada com o composto 1 (NP1)], diluídas em tampão PBS pH 7,4 foram colocadas na grade de cobre de 200 mesh e mantidas em repouso até adsorção, sendo o excesso retirado com papel de filtro. Posteriormente, foi inserido uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila para contrastação negativa. Após 2 minutos, o excedente foi retirado e as amostras foram secas à temperatura ambiente. Utilizou-se um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CX2 com aceleração de 200 kV e aumento de 200.00 vezes (ELOY et al., 2015) O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME), localizado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.3. Determinação do potencial antibacteriano *in vitro*

4.3.1. Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504. As cepas foram armazenadas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol (*E. coli* e *S. aureus*) e CMH + soro fetal bovino (SFB) a 20% acrescido de 20% de glicerol (*H. pylori*) a -20 °C. Foram repicadas em Ágar Mueller Hinton (AMH) (*E. coli* e *S. aureus*) e Ágar Mueller Hinton acrescido a 5% de sangue de carneiro (AS) (*H. pylori*) (Figura 9).

As cepas utilizadas nos ensaios biológicos são provenientes das bacterioteca do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP.

Figura 9. Cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504.



Fonte: Autora

4.3.2. Padronização das suspensões bacterianas

A partir de uma suspensão em CMH de 24 horas de incubação a 37 °C as bactérias (*E. coli* e *S. aureus*) foram padronizadas na escala 0,5 de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ céls/mL) pela leitura em espectrofotômetro a 620 nm e em seguida realizado uma diluição 1:10 em CMH obtendo uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ céls/mL. Para o *H. pylori*, colônias isoladas foram obtidas a partir de uma cultura em AS com 72 horas de incubação a 37 °C com 10% de CO₂ e umidade e adicionadas a CMH + SFB (1:1) até adquirir turvação igual à escala 2 de McFarland ($\sim 6 \times 10^8$ UFC/mL), confirmado pela absorbância em 570 nm, seguido de uma diluição 1:10 em CMH + SFB (1:1), obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL.

4.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi estabelecida através da técnica de diluição em microplacas, conforme a metodologia descrita na norma M7-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2006) para as bactérias aeróbicas (*E. coli* e *S. aureus*) e adaptado para as fastidiosas (*H. pylori*) seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006), com modificações (SPÓSITO et al., 2019).

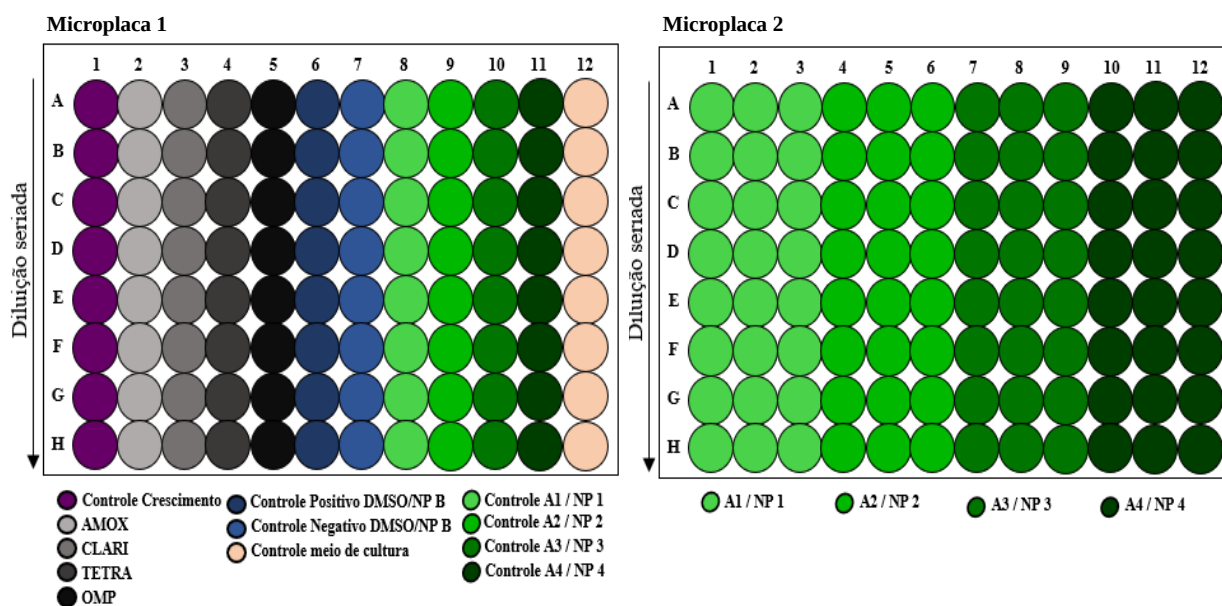
Em microplacas de 96 poços, foram depositados 80 µL de CMH para *E. coli*, *S. aureus* e 80 µL de CMH acrescido de SFB na proporção de 1:1 para *H. pylori*. Logo após foram

inseridos 100 μL das soluções dos compostos de coordenação solubilizados em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) (solução estoque) e posteriormente diluídos em água Mili-Q (25% para *E. coli* e *S. aureus* e 12,5% para *H. pylori*) e a nanopartícula polimérica incorporada com os compostos. Realizou-se a diluição seriada dos compostos de 1000 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$ para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e de 62,5 a 0,48 $\mu\text{g/mL}$ para *H. pylori*, e das NPs de 100 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e *S. aureus* e de 25 a 0,19 $\mu\text{g/mL}$ para *H. pylori*. Posteriormente foi analisado a atividade de L_1 e AgNO_3 (500 a 3,90 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e *S. aureus* e 62,5 a 0,48 $\mu\text{g/mL}$ para *H. pylori*). Em seguida, 20 μL das suspensões dos microrganismos foram distribuídos em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a amoxicilina (AMOX) (5 $\mu\text{g/mL}$), claritromicina (CLARI) (2,50 $\mu\text{g/mL}$), tetraciclina (TETRA) (4 $\mu\text{g/mL}$) e omeprazol (OMP) (150 $\mu\text{g/mL}$) para *H. pylori* e a ampicilina (AMP) a 50 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e a 25 $\mu\text{g/mL}$ para a *S. aureus*. Juntamente foram realizados o controle de crescimento, controle do meio de cultura, controle dos compostos de coordenação, controle das nanopartículas incorporadas e o controle negativo [DMSO e nanopartícula polimérica base (NPB)].

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para *E. coli* e *S. aureus*, e a 37 °C por 72 horas (10% CO_2 e umidade) para *H. pylori*. O ensaio foi realizado em triplicata.

A Figura 10 demonstra o esquema utilizado das microplacas para o ensaio contra *H. pylori*.

Figura 10. Configuração da microplaca para o ensaio de microdiluição frente às células planctônicas de *H. pylori*.

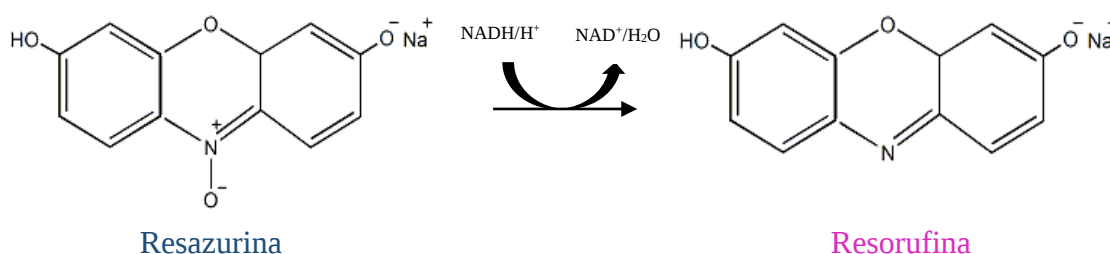


Fonte: Autora

Após o período de incubação, a viabilidade bacteriana foi investigada com o uso do revelador resazurina a 0,01%, adicionando 30 μ L em cada poço da microplaca e incubando até 2 horas a 37 °C para *S. aureus* e *E. coli* e até 3 horas a 37 °C – 10% CO₂ e umidade para *H. pylori* (PÉRICO et al., 2015).

A redução da resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) em resorufina se dá devido a relação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, sendo o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (O' BRIEN et al., 2000). A Figura 11 apresenta o mecanismo de redução da resazurina em resorufina.

Figura 11. Reação de redução da resazurina.

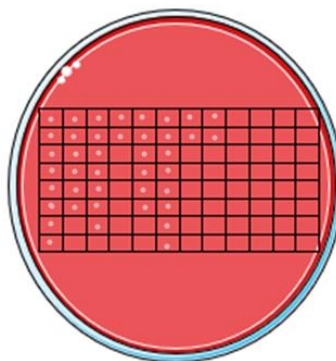


Fonte: Autora

4.3.4. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Com um auxílio de uma haste de madeira esterilizada foi replicado cada poço da microplaca para uma placa de AMH para as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e AS para *H. pylori* (Figura 12) antes da adição do revelador resazurina. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para *E. coli* e *S. aureus*, e a 37 °C por 72 horas (10% CO₂ e umidade) para *H. pylori*. A CBM foi determinada como a menor concentração dos compostos que não permitia o crescimento visível no meio sólido (DE TOLEDO et al., 2016). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 12. Esquema ilustrativo da placa de AS do ensaio de CBM para *H. pylori*.



Fonte: Autora

4.4. Ensaio de inibição de biofilmes

Baseando-se nos resultados encontrados nos experimentos de determinação da CIM e da estabilidade das nanopartículas poliméricas, selecionou-se o composto 1 (não incorporado e incorporado na NP) para a determinação da atividade tanto em biofilmes formados de *H. pylori* como na capacidade em inibir sua formação.

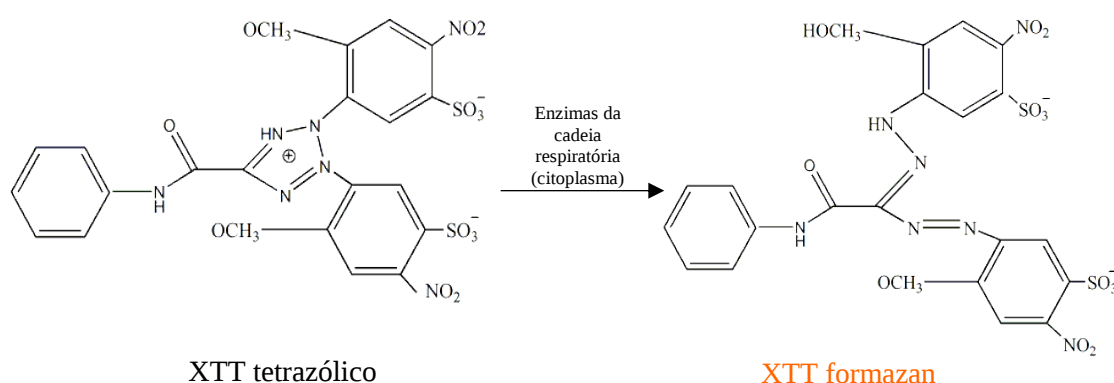
4.4.1. Inibição da formação dos biofilmes

Os biofilmes foram formados segundo as considerações propostas por Pierce et al. (2008) com modificações. A partir de um cultivo em AS de 72 horas (37 °C, 10% CO₂ e umidade), o inóculo bacteriano foi preparado e padronizado na escala 4 de McFarland. Em placas de 96 orifícios foram depositadas pérolas de vidro (5 mm) estéreis em cada um dos poços para formação do biofilme. Em seguida, 200 µL da suspensão padronizada de *H. pylori* foi depositada em cada poço e posteriormente submetido à incubação nas mesmas condições de cultivo durante 4 horas, com o intuito de determinar a pré-adesão do biofilme. Ao final deste período retirou-se o conteúdo dos poços, mantendo as pérolas e 100 µL das amostras (concentração inicial de 20 vezes o CIM para o composto 1 e 60 vezes o CIM para a NP1), preparadas em 100 µL de CMH + SFB (1:1) foram depositadas em cada poço. Foram realizados os controles de crescimento, controles positivos (amoxicilina, claritromicina e tetraciclina) na concentração de 20 vezes o CIM, dos solventes (DMSO e NPB) e esterilidade (meio de cultura,

amostras e solventes). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C (10% CO₂ e umidade).

Após o tempo de incubação, o conteúdo foi completamente removido (mantendo a pérola) e cuidadosamente lavado com solução salina 0.9% estéril e 200 µL de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT[®]) foi adicionado e incubado por 3 horas nas mesmas condições descritas anteriormente para determinar a viabilidade celular através do ensaio de redução do XTT tetrazólico (incolor) por enzimas da cadeia respiratória presentes no citoplasma para XTT formazan (alaranjado) (Figura 13) (Xu et al., 2016). Assim, nos poços que tiveram viabilidade celular, a coloração laranja foi adquirida. Após o período de revelação com o XTT foram realizadas leituras espectrofotométricas a 490 nm, para cálculo da % de atividade metabólica.

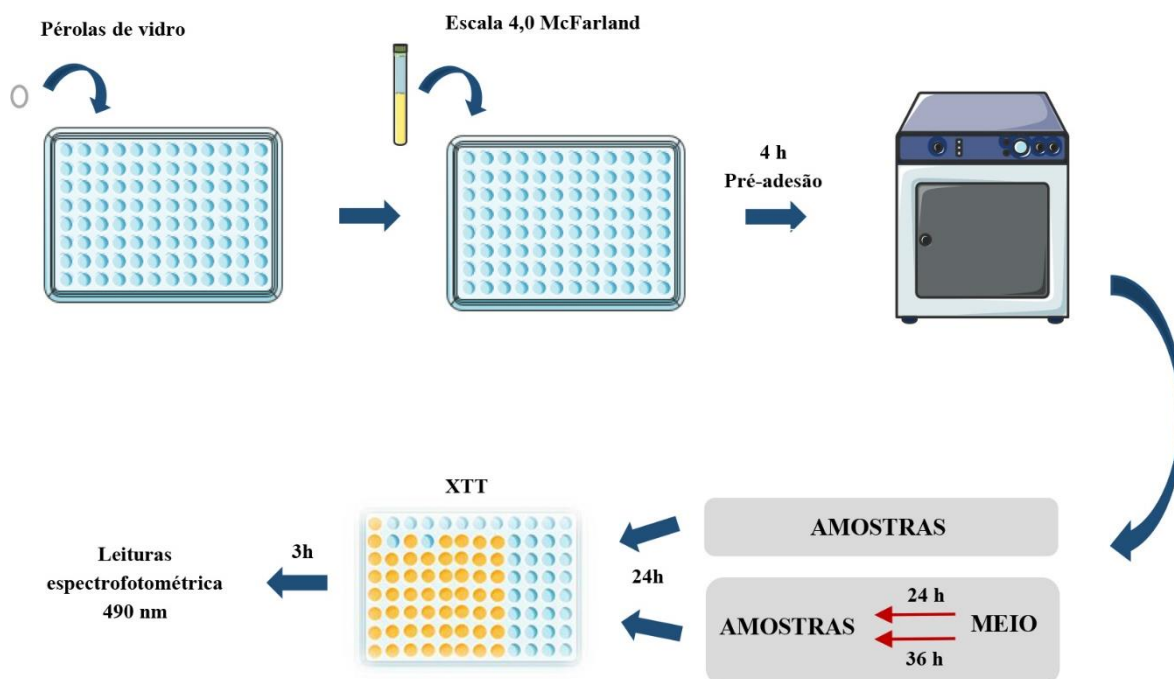
Figura 13. Reação de redução do XTT.



Fonte: Autora

O mesmo procedimento de pré-adesão de 4 horas foi realizado, com a renovação do meio em diferentes tempos (24 e 36 horas). Foram adicionadas as amostras e incubadas a 24 horas, nas mesmas condições descritas, para a determinação da viabilidade celular em diferentes tempos de formação do biofilme. A Figura 14 mostra o esquema representativo do ensaio.

Figura 14. Representação esquemática do ensaio inibição da formação de biofilme



Fonte: Autora

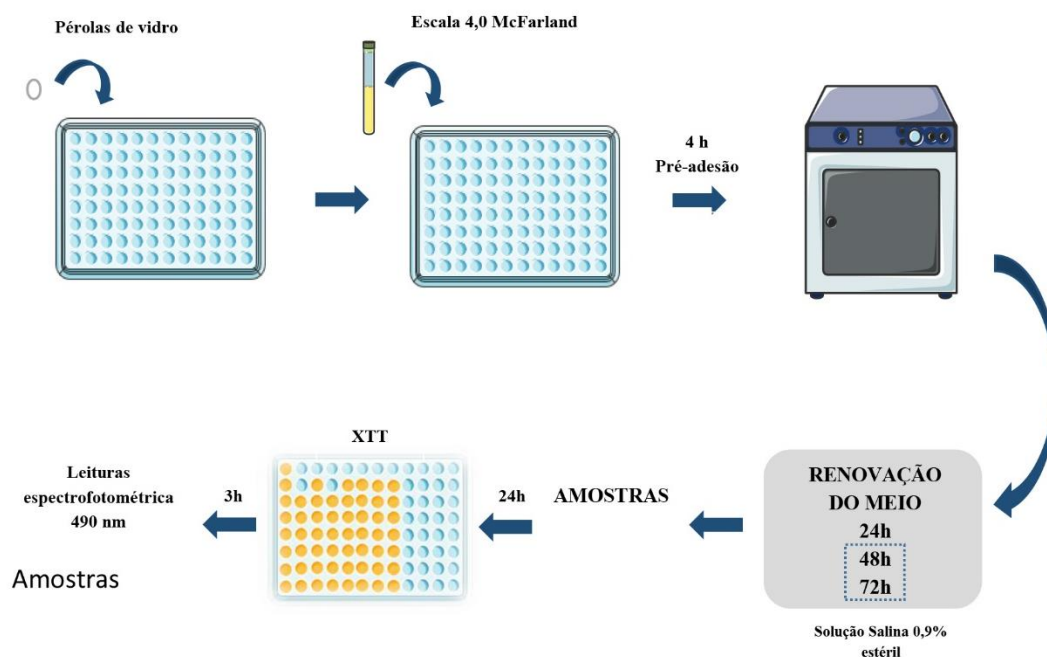
4.4.2. Inibição de biofilmes maduros

Para a formação dos biofilmes maduros foi empregada a mesma técnica descrita no item 4.4.1., entretanto, após o período de pré-adesão de 4 horas, retirou-se o conteúdo dos poços, mantendo as pérolas de vidro, 200 μ L de meio de cultura foram adicionados e incubados 24 horas. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio, incubando por mais 24 horas (período de 24 horas).

Passadas as 24 horas, o conteúdo foi retirado e os poços contendo as pérolas foram lavados com 200 μ L de solução salina 0,9% estéril, renovando o meio de cultura para mais 24 horas de incubação (período de 48 horas). O mesmo procedimento foi repetido no período de 72 horas. Sucessivamente a lavagem de 72 horas, adicionou-se as amostras e as microplacas incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Posteriormente o período de contato das amostras com os biofilmes maduros, as mesmas foram removidas e o biofilme foi lavado com solução salina 0,9% estéril. Por fim, a viabilidade dos biofilmes foi analisada pela atividade

metabólica no ensaio de redução do XTT, descrito anteriormente (SPÓSITO et al., 2019). A Figura 15 mostra o esquema representativo do ensaio.

Figura 15. Representação esquemática do ensaio inibição de biofilmes maduros



Fonte: Autora

4.5. Determinação do potencial citotóxico

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micobacteriologia (Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP), com a orientação da aluna de doutorado Débora Leite Campos, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan. A metodologia foi realizada conforme recomendado por Pavan et al. (2010).

As linhagens celulares MRC-5 (fibroblatos pulmonares ATCC CCL-171) e J774A.1 (macrófagos de camundongos ATCC TIB-67) foram utilizadas na determinação da citotoxicidade (IC₅₀). Até o momento do uso, as linhagens foram mantidas congeladas em freezer a -80 °C em tubos criogênicos (alíquota) contendo SFB (Vitrocell®) e 5% de DMSO.

As células foram descongeladas e posteriormente cultivadas em garrafas de cultura de 12,50 cm² contendo 6 mL de meio de cultura DMEM (Vitrocell®) ou RPMI (Vitrocell®), retrospectivamente, enriquecidos com 10% de SFB, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L), e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência celular. Logo após esse período, as células foram ressuspensas utilizando uma solução de tripsina (4 minutos a 37 °C com 5% de CO₂) para MRC-5 e um scraper para J774 e, posteriormente, submetidas a centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante, ressuspensando o sedimento celular com 2 mL de meio de cultura e então transferido para uma garrafa de 75,00 cm² com adequação do volume de meio de cultura. Após 48 horas de aderência e confluência celular, o procedimento de coleta e centrifugação foi realizado e a contagem das células/mL foi realizada na câmara de Neubauer, sendo ajustado para 2,50 x 10⁵ células/mL e 1 x 10⁶ células/mL em meio DMEM para MRC-5 e RPMI para J774, respectivamente. Dessa suspensão, foram colocados 100 µL em cada poço de uma microplaca de 96 orifícios e incubadas a 37 °C (5% de CO₂) por 24 horas para permitir a aderência celular à microplaca. O meio foi removido e as amostras a serem testadas, previamente diluídas nas concentrações de 200 a 0,39 µg/mL para as amostras (1, L₁, AgNO₃ e NP1), 50 a 0,19 µg/mL para os antibióticos (AMOX, CLARI, TETRA) e os controles da nanopartícula base (NPB, Tensoativo (PLX) e polímero (PCL) analisados em porcentagem de volume, foram adicionadas aos poços (100 µL) e incubadas por 24 horas. Foi determinada a citotoxicidade através da adição de 50 µL do revelador resazurina (0,01%) e realização da leitura após 4 horas de incubação. A leitura foi efetuada no leitor de microplacas Cytation (Biotek®), empregando filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. A citotoxicidade (IC₅₀) foi estabelecida como a menor concentração das amostras que permite a viabilidade de no mais que 50% das células. Como controle, o IC₅₀ do solvente utilizado para a amostra livre (DMSO) e incorporada (NPB), bem como seus constituintes (PLX e PCL), também foram determinados em todos os ensaios realizados em triplicata.

4.6. Avaliação do potencial mutagênico

A mutagenicidade do composto 1 (não incorporado e incorporado) foi avaliada pela metodologia de pré-incubação, elaborada por Maron e Ames (1983), utilizando linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102 que apresentam mutação no gene hisD (hisD3052) (MARON; AMES, 1983). Os experimentos foram executados com e sem ativação

metabólica e com cinco diferentes concentrações das amostras avaliadas (0,62 – 5 µg/placa) para todas as linhagens, no laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara (UNIARA), sob coordenação da Profa Dra Flávia Aparecida Resende Nogueira.

O inóculo bacteriano foi preparado em caldo nutriente (Oxoid nº 2) e incubado a 37 °C, por 14-16 horas, em shaker incubador (37 °C – 100 rpm), para a obtenção de uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

Às concentrações do complexo livre e incorporado foram adicionados 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, seguido de incubação a 37 °C por 20 - 30 minutos.

Nos ensaios com metabolização, foi empregada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, a qual foi constituída a partir de fígado de roedores expostos a agentes indutores de enzimas, aroclor 1254- 500 mg/kg) obtida da MOLTOX-Molecular Toxicology, Inc. USA. É possível demonstrar se a substância ou amostra é mutagênica em sua conformação original ou precisa ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica através da fração S9. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4 % de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril.

Após o período de incubação, foi adicionado 2 mL de ágar de superfície (*top-ágar*) contendo uma solução de L-histidina e D-biotina 0,05 mM na proporção de 10/100mL em cada tubo. Cada tubo foi homogeneizado plaqueado em ágar mínimo glicosado. Depois de solidificado o *top ágar*, as placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Transcorrido o tempo, contou-se manualmente o número de colônias revertentes por placa.

Como controle positivo foram utilizados agentes mutagênicos padrões para confirmação das propriedades de reversão e especificidade de cada cepa analisada. Para os experimentos sem a fração S9 foram utilizados 4- nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA97a e TA98, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102, enquanto nos experimentos com ativação metabólica utilizou-se 2-antramine (1,25 µg/placa) para TA97a, TA98 e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/placa), para TA102. Além do controle negativo (DMSO), controle espontâneo (crescimento bacteriano sem tratamento), controle da base (NPB), controle do Sal (AgNO₃) e do ligante (L₁). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A análise estatística foi realizada através do programa Salanal (U.S.Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear para avaliar os dados (revertentes/placa). O índice de mutagenicidade (IM) foi deliberado para cada concentração testada, conforme demonstrado na seguinte fórmula (equação 2)

$$\text{IM} = \frac{\text{Número de revertentes/placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{Número de revertentes/placa com o controle (solvente) negativo}} \quad (\text{equação 2})$$

Para ser mutagênica a amostra precisar apresentar uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM maior ou igual a dois em ao menos uma das doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

4.7. Avaliação do potencial tóxico agudo em *Galleria mellonella*

O ensaio de determinação da toxicidade aguda foi realizado em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Patogenicidade e Sinalização Química Bacteriana com orientação da aluna de doutorado Tamara Renata Machado Ribeiro sob supervisão do Prof. Dr. Cristiano Gallina Moreira. O ensaio foi realizado empregando larvas da espécie *Galleria mellonella* de acordo com as considerações de Allegra et al., (2018) com modificações. O experimento foi composto por grupos experimentais de 10 larvas (n=10). As larvas (0,25 a 0,30 g) foram mantidas no escuro a 27 °C. As amostras foram injetadas (10 µL) no último proleg usando uma seringa Hamilton Microliter™. Após a injeção, as larvas foram mantidas no escuro à temperatura ambiente e analisadas em 24, 48 e 72 horas. A morte foi considerada quando não houve reação após estimulação física, melanização e/ou perda total de mobilidade. Para o composto 1, foram analisadas concentrações de 5, 10, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/kg, seguidas de controle de solvente nas mesmas concentrações. Se a dose tóxica fosse superior a 300, o experimento iria continuar até que a concentração letal fosse estabelecida (dose máxima = 2000 mg/kg). A NP1 foi analisada na dose máxima preparada (8 mg/kg) e na sua base (NPB). Foi realizado um controle do trauma (a agulha foi introduzida no proleg sem composto). Para cada grupo foram utilizadas 10 larvas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

4.8. Análise Estatística

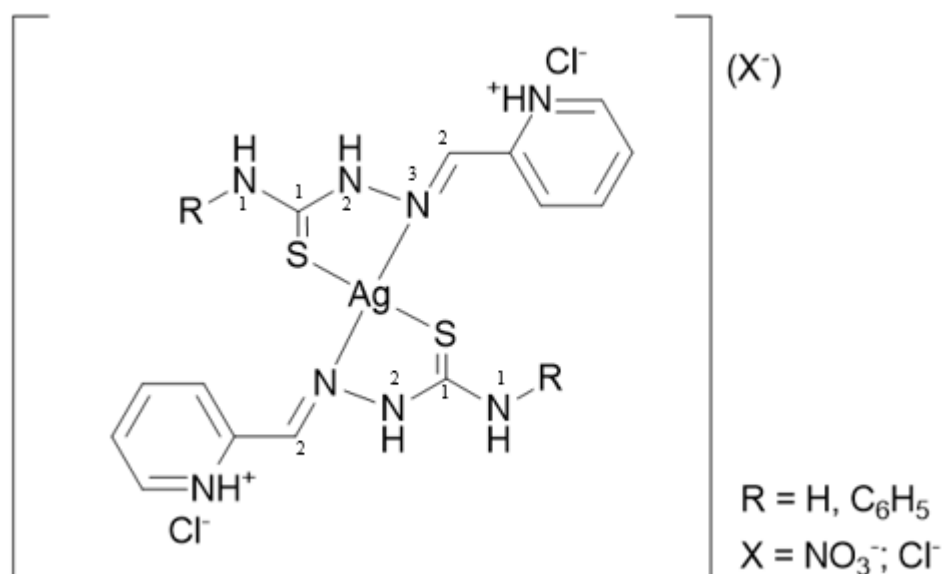
Para a análise estatística foi utilizado nos ensaios de Estabilidade, Biofilme maduro e Citotoxicidade a análise de variância ANOVA one-way e como pós teste Dunnett. No ensaio de formação de biofilme, utilizou a análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Tukey. Considerou-se $p < 0,05$ com o software Graph Pad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção dos compostos de coordenação de prata (I)

Para a síntese dos compostos de coordenação de prata foi utilizado como ligante a tiossemicarbazona (TSC) sintetizada a partir do aldeído 2- piridina-carboxaldeído. A tiossemicarbazona utilizada nos compostos em questão é uma mono-tiossemicarbazona, obtida a partir de um aldeído. Diante dos dados de caracterização (não mostrados) os compostos estão na forma predominante tiona e devido há não formação de monocristais dos compostos e dos dados espectrométricos, sugere-se que a estrutura dos compostos é a representada na Figura 16.

Figura 16. Estruturas química dos compostos de coordenação de prata (I).



Sendo assim, obteve-se 4 compostos: $[Ag(PhTSC \cdot HCl)_2](NO_3) \cdot H_2O$ (1), $[Ag(HTSC \cdot HCl)_2](NO_3) \cdot H_2O$ (2), $[Ag(PhTSC \cdot HCl)_2](Cl) \cdot H_2O$ (3) e $[Ag(HTSC \cdot HCl)_2](Cl) \cdot H_2O$ (4), os quais possuem, além do átomo de hidrogênio, um grupo heterocíclico no carbono C₂. Os substituintes em N₁ diferem para os compostos 1 e 3 ($R = C_6H_5$) dos compostos 2 e 4 ($R = H$).

Estes quatro compostos foram sintetizados e caracterizados pela doutoranda Débora Eduarda Soares Silva do grupo do Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto do Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara.

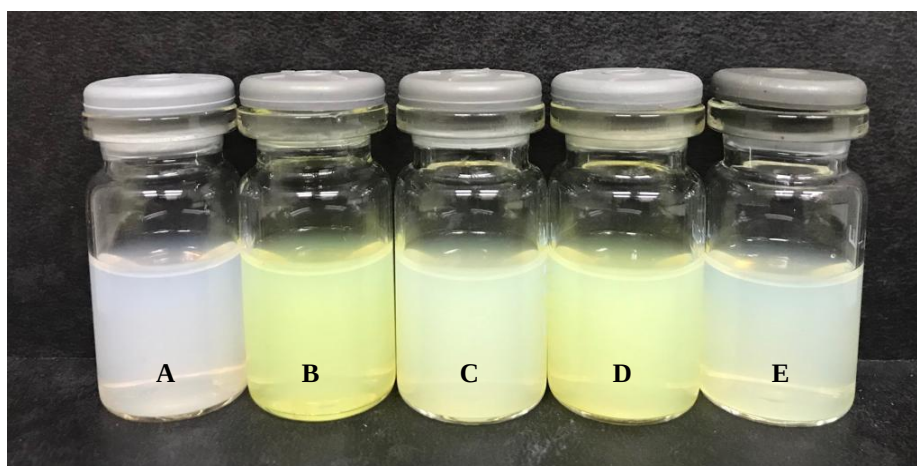
5.2. Preparo da formulação nanoestruturada

5.2.1. Nanopartículas poliméricas – NPs

As nanopartículas poliméricas (Figura 17) foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação, uma técnica fácil e reproduzível, que baseia na mistura de uma fase orgânica (polímero e solvente) em outra fase aquosa. Com o contato das duas fases, ocorre a difusão da fase orgânica para a aquosa, e assim, levando cadeias poliméricas dissolvidas, as quais, sob condição de supersaturação, se agregam e formam as nanopartículas (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004). O tempo de preparo variou de 6 a 8 horas, variando conforme cada amostra, bem como a temperatura ambiente.

Os compostos de coordenação de prata (I) 1, 2, 3 e 4 foram incorporados na nanopartícula polimérica originando as amostras: NP1, NP2, NP3 e NP4, respectivamente.

Figura 17. Nanopartícula polimérica base (A) e nanopartículas poliméricas incorporadas (NP1(B), NP2 (C), NP3 (D) e NP4(E)).



Fonte: Autora

5.2.2. Caracterização das NPs

A Tabela 1 apresenta os valores das médias e desvio padrão dos tamanhos das partículas, índice de Polidispersão (IPD) e Potencial Zeta (PZ) da NPB e das NPs incorporadas.

Tabela 1. Média e desvio-padrão dos diâmetros das partículas, IPD e Potencial Zeta da nanopartícula base (NPB) e das nanopartículas incorporadas (NP1, NP2, NP3 e NP4).

Amostras	Tamanho das partículas (nm)	IPD	PZ (mV)
NPB	155,10 $\pm$ 3,60	0,093 $\pm$ 0,028	- 2,83 $\pm$ 0,414
NP1	161,90 $\pm$ 1,80	0,132 $\pm$ 0,019	- 0,16 $\pm$ 0,045
NP2	180,00 $\pm$ 1,13	0,244 $\pm$ 0,055	- 1,26 $\pm$ 0,162
NP3	174,80 $\pm$ 1,10	0,266 $\pm$ 0,032	- 1,57 $\pm$ 0,321
NP4	169,10 $\pm$ 2,47	0,192 $\pm$ 0,037	- 3,17 $\pm$ 0,359

nm= nanômetro; mV: milivolts

5.2.2.1. Dispersão de luz dinâmica

Conforme demonstrado na Tabela 1, o diâmetro das partículas da NPB foi 155,10 nm com um desvio padrão de $\pm$ 3,60 e após a incorporação dos compostos, houve uma pequena variação nos tamanhos, indicando que provavelmente ocorreu a incorporação dos mesmos nas nanopartículas. Os valores alcançados estão dentro da faixa de referência relatada na literatura, entre 10 e 1000 nm (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008).

O IPD, um parâmetro empregado para associação da distribuição de tamanho das partículas, apresentou valores inferiores à 0,3, o qual indica a presença de populações monodispersas de partículas, evidenciando assim que as amostras apresentaram certa homogeneidade. Ainda é possível afirmar que as NP1 e NP4 são mais homogêneas comparadas as demais, devido seus valores de IPD menores (MARCANO et al., 2018).

5.2.2.2. Potencial Zeta (PZ)

Os valores de PZ obtidos das NPs pela observação da mobilidade eletroforética das gotículas submetidas a um campo elétrico é apresentado na Tabela 1. O potencial zeta é um parâmetro que depende dos constituintes do sistema, podendo ser influenciado pelas mudanças na área da partícula com o meio dispersante, em função da adsorção de espécies iônicas

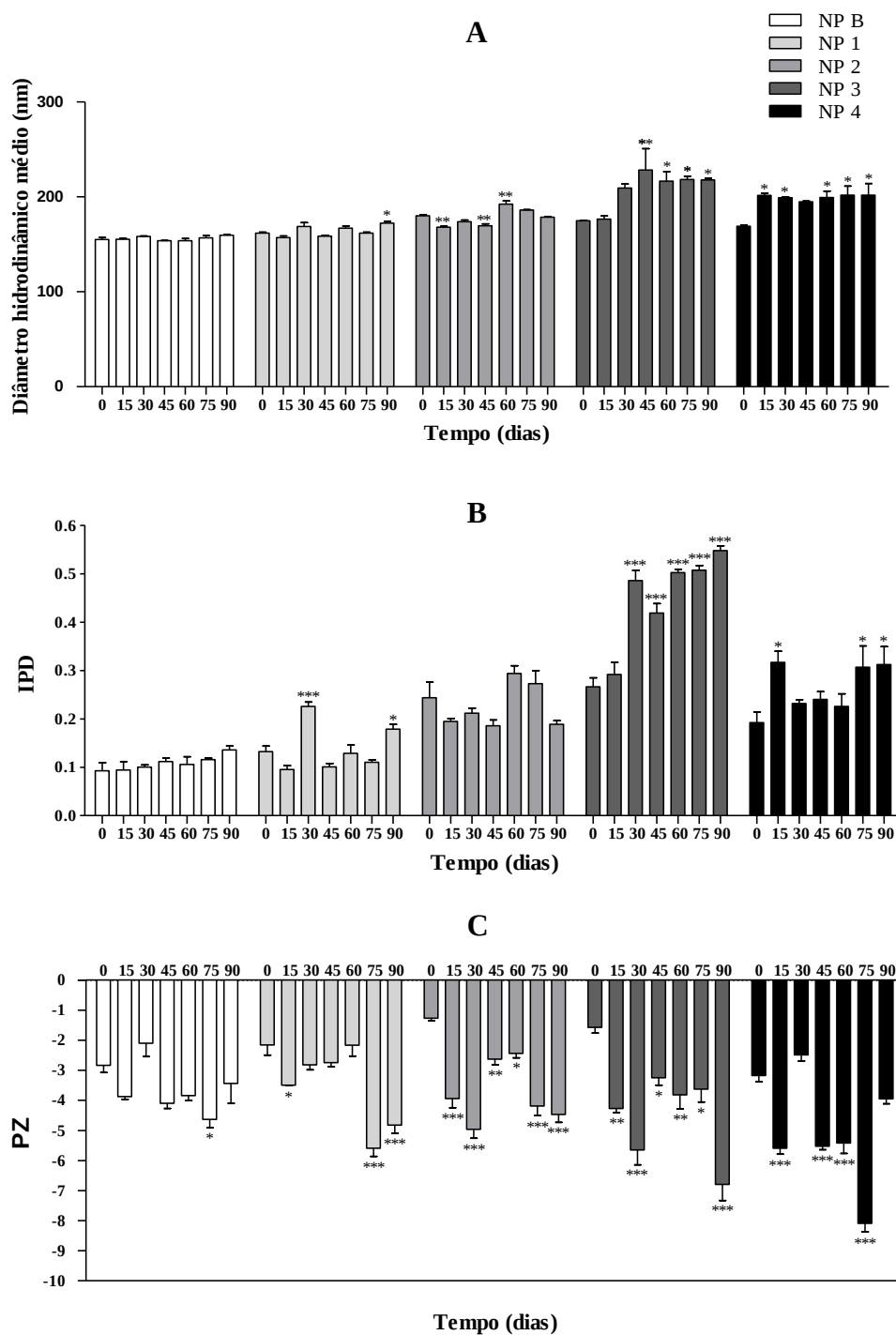
presentes no meio ou da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula (SCHAFFAZICK et al, 2003).

As NPs apresentaram um potencial zeta entre $-3,17$ mV e $-0,16$ mV, sendo que a carga negativa presente no sistema pode ser devido a presença de grupos carboxilas terminais ionizáveis do polímero (PCL) (MARCANO et al., 2018).

5.2.2.3. Estabilidade

Realizou-se as análises de tamanho de partículas, IPD e PZ das NPs em intervalos de quinze dias a partir do dia de preparo, totalizando 90 dias, a fim de estabelecer a estabilidade das formulações. As NPs foram armazenadas a ± 5 °C e protegidas da luz, sendo que a análise foi realizada com as amostras na temperatura ambiente. A Figura 18 apresenta os dados obtidos, os quais, em conjunto com a CIM apresentadas pelas NPs, possibilitou a escolha da NP incorporada para realização da MET e dos ensaios biológicos.

Figura 18. Análise do tamanho de partícula (A), IPD (B) e Zeta (C) da nanopartícula polimérica base (NPB) e das nanopartículas poliméricas incorporadas (NP1, NP2, NP3 e NP4), analisadas a cada 15 dias, durante 90 dias.



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão.

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Dunnett, sendo (*) fracamente, (**) moderadamente e (***) fortemente significativo.

Fonte: Autora

Na análise da estabilidade da NPB, não foi verificada diferença estatística nas leituras entre o dia 0 e 90 no tamanho das partículas ($p > 0,05$) e PDI ($p > 0,05$), enquanto para a comparação do PZ, a leitura do dia 75 apresentou uma pequena diferença estatística comparada com o dia 0 ($p < 0,05$).

No tamanho da NP1 foi verificada diferença estatística pequena apenas no último dia de leitura, enquanto o PDI apresentou uma diferença estatística significativa na leitura do dia 30 e uma diferença menor no dia 90, comparadas com o dia 0, porém, tais valores encontram dentro do valor preconizado, inferior a 0,3 (MARCANO et al., 2018). As leituras dos dias 15, 45, 60 e 75 não apresentaram diferença estatística quando comparados com o dia 0. Os valores de PZ da NP1 demonstraram que houve diferença no dia 15 com o dia 0 e diferença significativa nos dias 75 e 90 comparados com o dia 0, porém não houve diferenças nas leituras dos dias 30, 45 e 60.

Na análise estatística da NP2, foi verificada diferença estatística do tamanho nos dias 15, 45 e 60, enquanto os dias 30, 75 e 90 não apresentaram diferença, comparados com o dia 0. Os valores de PDI da NP2 não apresentaram diferença estatística dentre todos os dias de leituras. Todos os dias apresentaram diferença estatística na análise do PZ, sendo os dias 15, 30, 75 e 90 mais significativa a diferença que nos dias 45 e 60, comparados com o dia 0.

Para a NP3, a diferença estatística no tamanho foi apresentada a partir do dia 45 até o dia 90, visto que as duas primeiras leituras não apresentaram diferenças, comparados com o dia 0. Na análise do PDI, a leitura do dia 15 não apresentou diferença estatística comparado com o dia 0, ao passo que as demais leituras (30, 45, 60, 75 e 90), apresentaram diferenças significativas. Os valores de PZ demonstram uma variação de significância na análise estatística entre todos os dias de análise comparados com o dia 0.

Na análise da NP4, foi demonstrado que houve uma pequena diferença estatística no tamanho das partículas nos dias 15, 30, 60, 75 e 90 comparados com o dia 0. A leitura do dia 45 não apresentou diferença estatística. Para os valores de PDI, a diferença também foi pequena, sendo apresentadas apenas nos dias 15, 75 e 90 (os dias 30, 45 e 60 não apresentaram diferença estatísticas) comparados com o dia 0. Enquanto para o PZ, as diferenças estatísticas apresentadas foram significativas, porém apresentadas apenas nos dias 15, 45, 60 e 75, visto que os dias 30 e 90 não apresentaram diferenças estatísticas, comparados com o dia 0.

Todas as amostras mantiveram os valores de tamanho de partícula dentro do preconizado, entre 100 e 300 nm, durante os 90 dias de análise (SCHAFFAZICK et al., 2002).

Diante dos valores de IPD, pode-se constatar que as amostras NP3 e NP4, apresentaram um aumento em seus valores, ultrapassando 0,3 (MARCANO et al., 2018), indicando a não homogeneidade do sistema a partir do dia 30 e 15, respectivamente.

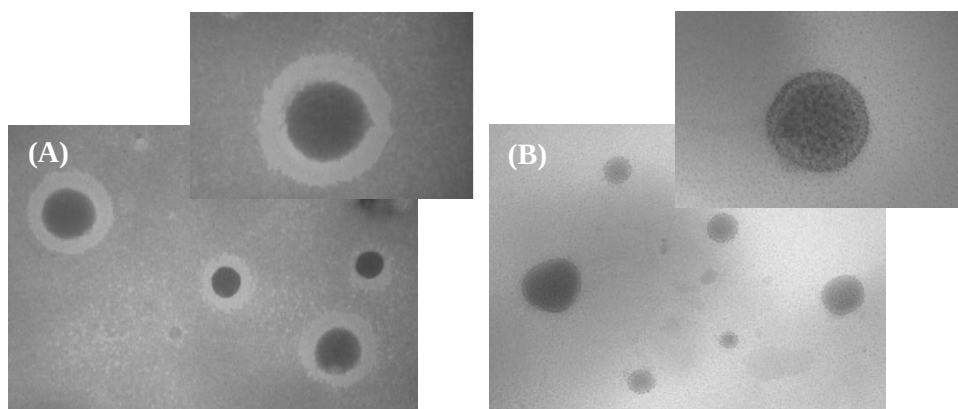
Segundo os valores adquiridos da estabilidade do PZ, pode-se observar que, seguido da NPB, que apresentou menor diferença estatística entre os dias de leituras, a NP1 apresenta uma menor diferença estatística comparada com as demais amostras.

A partir dos resultados obtidos da estabilidade das nanopartículas foi possível proceder com a escolha de uma amostra incorporada, a qual, juntamente com os valores de CIM, apresentasse o melhor conjunto de resultados. Foi selecionada a NP1 devido aos valores de tamanho de partícula e IPD estarem mais próximos a base (NPB) e diante dos resultados adquiridos de CIM para *H. pylori*, realizado paralelamente. Assim, pode-se eliminar a NP3 e NP4, com base nos valores de IPD coletados durante as análises, indicando uma possível instabilidade do sistema. A NP2 apresentou resultados favoráveis para todas as análises, porém, quando comparado a CIM, o valor obtido foi superior a CIM da NP1. Sendo assim, a NP1 foi escolhida dentre as demais incorporadas para os testes futuros por apresentar valor de CIM baixo, além de apresentar uma melhor estabilidade durante os 90 dias analisados, a qual é favorável pensando-se que para *H. pylori*, o tratamento é longo.

5.2.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A Figura 19 apresenta as fotomicrografias obtidas por MET da NPB e da NP1. As imagens estão sob aumento de 200.00 X.

Figura 19. Fotomicrografias obtidas por MET da NPB(A) e NP1(B) sob aumento de 200.00x.



Fonte: Autora

As fotomicrografias apresentadas acima mostram partículas bem definidas com forma esférica e os diâmetros observados são condizentes com os padrões estabelecidos e com os dados obtidos na análise de espalhamento de luz, confirmando a formação das nanopartículas poliméricas.

5.3. Determinação do potencial antibacteriano *in vitro*

5.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A avaliação do potencial antibacteriano das amostras foi realizado pelo método de microdiluição. A Tabela 2 apresenta os valores de CIM dos compostos de coordenação de prata (I) não incorporados e incorporados no sistema de liberação de fármacos contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima dos compostos ($\mu\text{g/mL}$) (1, 2, 3 e 4), incorporados ($\mu\text{g/mL}$) (NP1, NP2, NP3 e NP4) e DMSO (%) sobre as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*.

Amostra	CIM		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. pylori</i>
L ₁	125	250	0,24
AgNO ₃	<3,90	<3,90	7,81
1	15,62	SI	3,90
2	15,62	7,81	7,81
3	31,25	250	3,90
4	15,62	3,90	7,81
NP1	6,25	>100	0,78
NP2	6,25	>100	12,5
NP3	1,56	>100	0,39
NP4	3,12	12,5	6,25
NPB	SI	SI	SI
DMSO	25	25	SI
AMP	0,15	6,25	-
AMOX	-	-	0,078
CLARI	-	-	0,019
TETRA	-	-	0,5
OMP	-	-	1,17

CIM: concentração inibitória mínima; AMP: ampicilina; AMOX: amoxicilina; CLARI: claritromicina; TETRA: tetraciclina; OMP: omeprazol; SI: sem inibição; - : não aplicável.

Os resultados obtidos possibilitam concluir que os quatros compostos não incorporados (1, 2, 3 e 4) apresentaram atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas, com exceção do composto 1 frente a *E. coli*, além dos compostos apresentarem uma maior seletividade

frente ao *H. pylori*. Nota-se que L₁ apresenta valor de CIM inferior aos compostos, porém a sua utilização livre não é viável devido sua insolubilidade (apenas solúvel em 100% DMSO). Com o intuito de melhorar sua solubilidade, incorporou-se os compostos de coordenação em uma nanopartícula polimérica. Para o *S. aureus*, a incorporação no sistema potencializou a ação antibacteriana. Os compostos 1 e 2 apresentaram CIM de 15,62 µg/mL e quando incorporados apresentaram uma CIM de 6,25 µg/mL, uma potencialização em aproximadamente 3 vezes. Já o composto 3, que apresentou uma CIM de 31,25 µg/mL, obteve uma potencialização de 20 vezes após a incorporação, resultando em uma CIM de 1,56 µg/mL. Valor promissor também foi encontrado para o composto 4, que de uma CIM de 15,62 µg/mL foi para 3,12 µg/mL, potencializando em 5 vezes sua ação. Em relação ao *H. pylori*, os compostos 1 e 3 chamam a atenção, com uma potencialização na ação de 5 e 10 vezes respectivamente, enquanto o composto 1 melhorou sua ação de 3,90 µg/mL para 0,78 µg/mL, o composto 3, com mesma ação, após incorporado, obteve uma CIM de 0,39 µg/mL. O composto 4 teve uma pequena melhora em sua ação após a incorporação, porém não muito significativa, e apenas o composto 2 apresentou uma CIM mais alta comparada ao composto livre, indicando um possível aprisionamento da amostra no sistema, ou mesmo uma possível liberação mais lenta do mesmo. Para *E. coli*, os compostos 1, 2 e 3 quando incorporados não apresentaram atividade na concentração testada, enquanto apenas o composto 4 apresentou atividade após incorporado, porém, inferior ao composto livre. Adicionalmente verificou-se que a base do sistema (NPB) não possui atividade antibacteriana, o que comprova que a utilização deste sistema foi eficaz em potencializar a atividade biológica dos compostos.

5.3.2. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A Tabela 3 apresenta os valores de CBM dos compostos de coordenação de prata (I) não incorporados e incorporados no sistema de liberação de fármacos contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*.

Tabela 3. Concentração Bactericida Mínima dos compostos ($\mu\text{g/mL}$) (1, 2, 3 e 4), incorporados ($\mu\text{g/mL}$) (NP1, NP2, NP3 e NP4) e DMSO (%) sobre as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *H. pylori*.

Amostras	CBM ($\mu\text{g/mL}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>H. pylori</i>
L ₁	≥ 500	≥ 500	0,97
AgNO ₃	≥ 500	≥ 500	$\geq 7,81$
1	1000	1000	7,81
2	62,5	7,81	15,62
3	1000	500	7,81
4	62,5	31,25	15,62
NP1	>100	>100	1,56
NP2	100	>100	12,5
NP3	50	>100	0,78
NP4	50	100	12,5
NPB	SI	SI	SI
DMSO	SI	SI	SI
Ampicilina	0,15	12,5	-
Amoxicilina	-	-	0,078
Claritromicina	-	-	0,62
Tetraciclina	-	-	≥ 2
Omeprazol	-	-	≥ 75

CBM= concentração inibitória mínima; AMP: ampicilina; AMOX: amoxicilina; CLARI: claritromicina; TETRA: tetraciclina; OMP: omeprazol; SI= sem inibição; - = não aplicável

Conforme apresentado na Tabela 3, as amostras demonstraram perfil bacteriostático frente as cepas testadas, pelo fato da CBM ser inferior ao CIM, com excessão do composto 2 que foi bactericida na concentração de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli*, e da NP2 na concentração de 12,50 $\mu\text{g/mL}$ frente ao *H. pylori*.

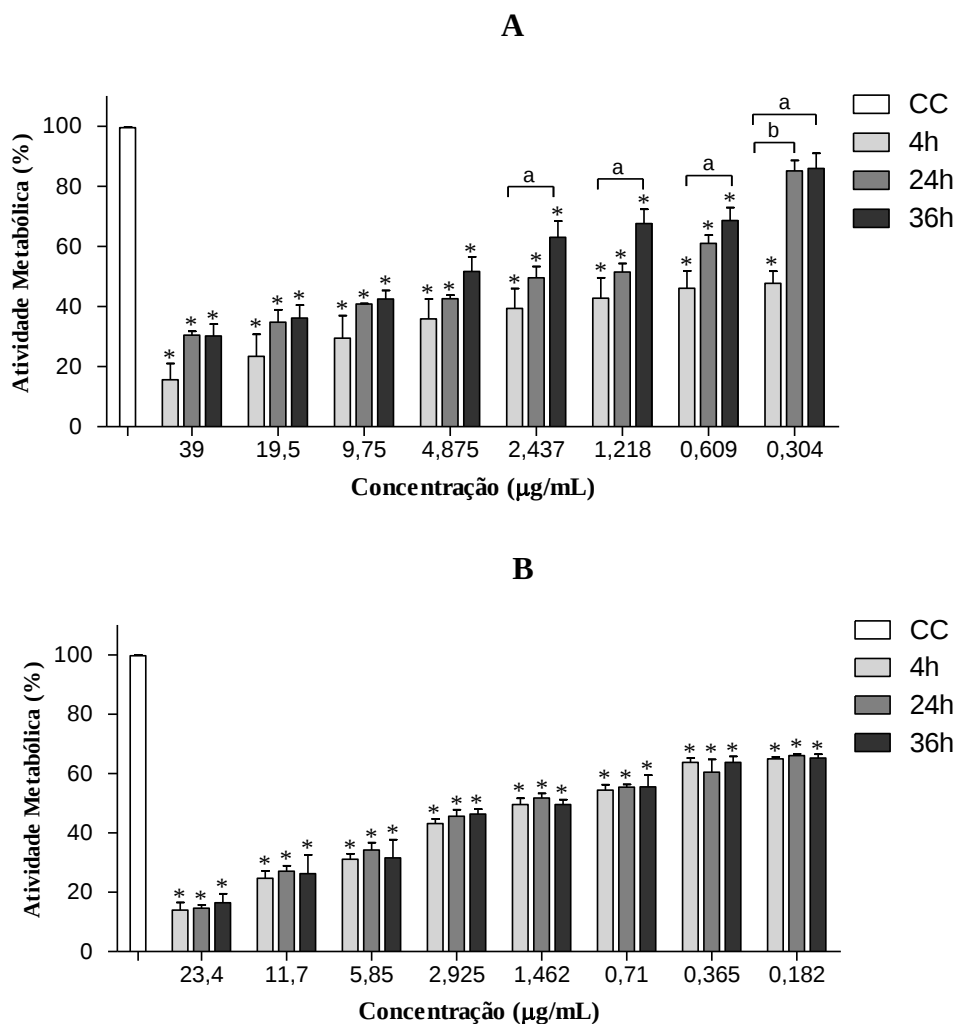
5.4. Ensaio de inibição de biofilmes

Para os ensaios de inibição de biofilmes, tanto na formação quanto no biofilme maduro, os dados são apresentados em porcentagem de atividade metabólica pelo método de redução do XTT. Os tratamentos empregados estão expressos em concentrações elevadas multiplicadas pelo valor de CIM obtido nos ensaios com células planctônicas de *H. pylori*.

5.4.1. Inibição da formação dos biofilmes

As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados obtidos para as amostras contra biofilmes pré-formados de *H. pylori*, analisando diferentes tempos de formação (4, 24 e 36 horas).

Figura 20. Atividade metabólica de biofilmes pré-formados por *H. pylori*, após o tratamento com o composto 1 (A) e NP1 (B), analisados nos tempos de 4, 24 e 36 horas de formação.

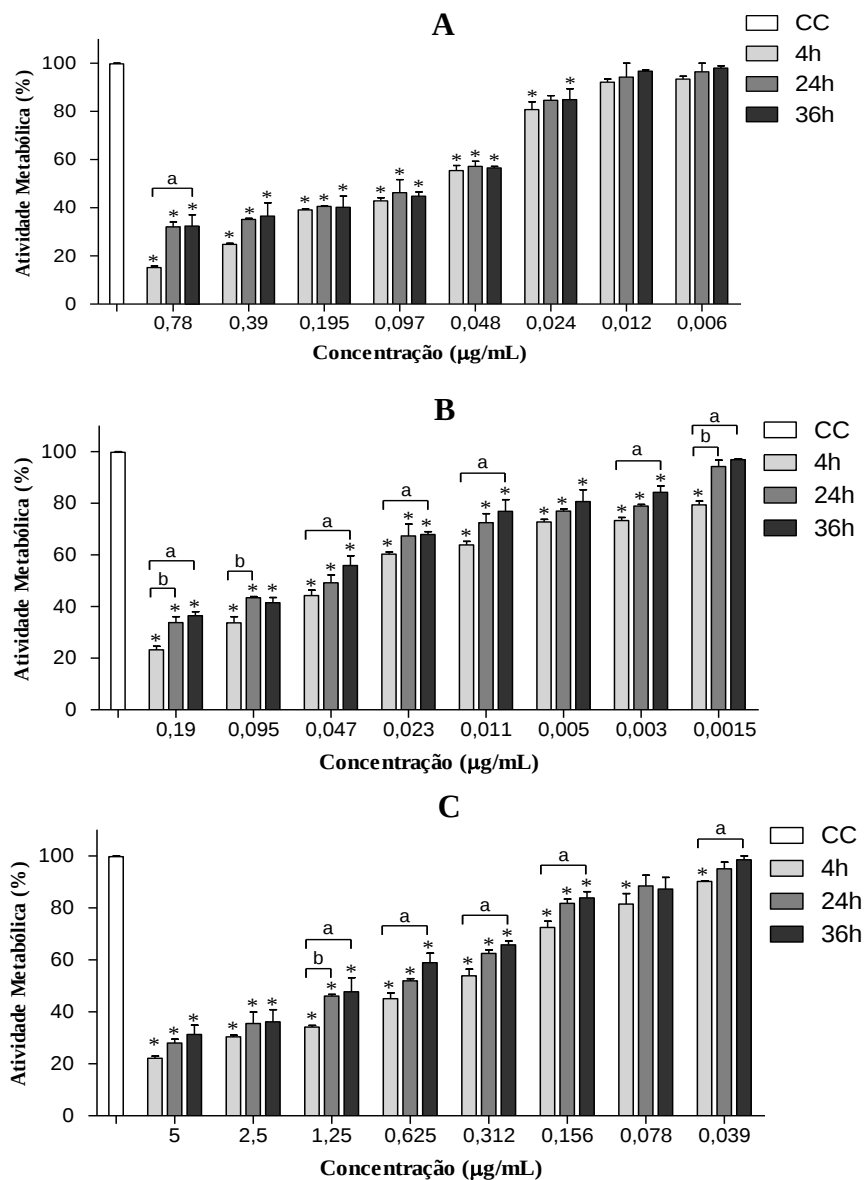


Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. A1: composto de coordenação de prata 1; NP1: nanopartícula polimérica incorporada com A1. CC: controle de crescimento.

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Tukey, onde (*) diferença comparado ao CC, (a) diferença entre 4h e 36h e (b) diferença entre 4 e 24 horas.

Fonte: Autora

Figura 21. Atividade metabólica de biofilmes pré-formados de *H. pylori*, após o tratamento com AMOX (A), CLARI (B) e TETRA (C), analisados nos tempos de 4, 24 e 36 horas de formação.



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. AMOX: amoxicilina; CLARI: claritromicina; TETRA: tetraciclina. CC: controle de crescimento.

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Tukey, onde (*) diferença comparado ao CC, (a) diferença entre 4h e 36h e (b) diferença entre 4h e 24h.

Fonte: Autora

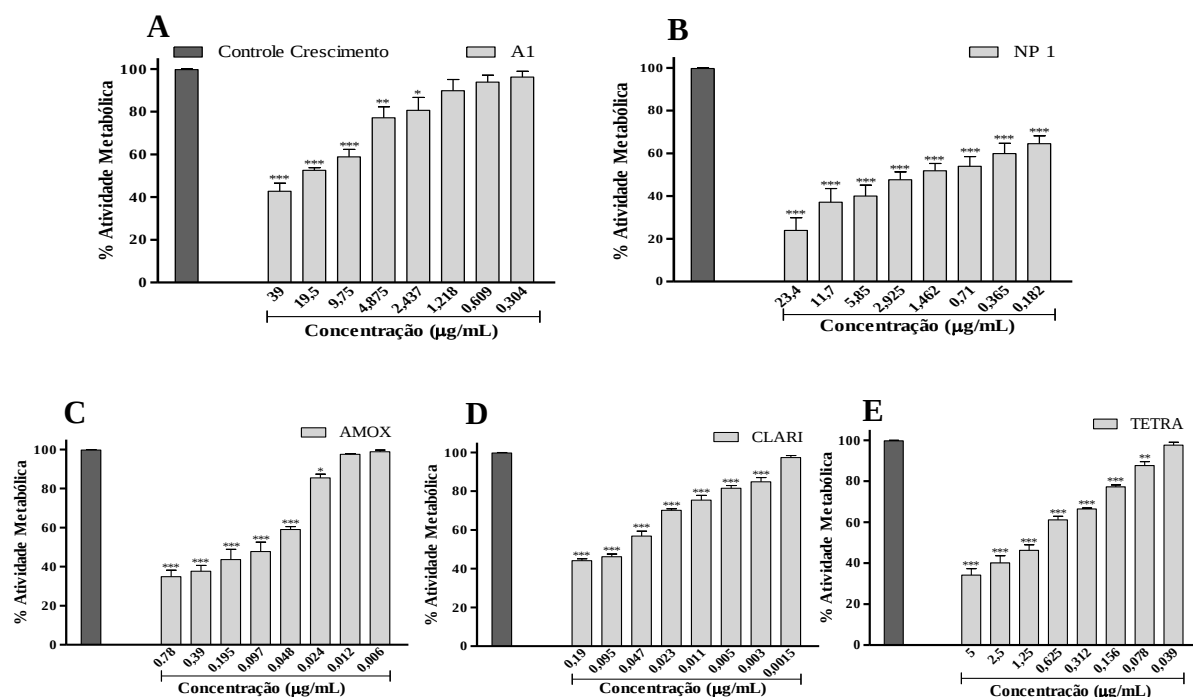
Conforme apresentado nas Figuras 20 e 21, foi demonstrado que as amostras foram capazes de inibir a formação do biofilme, sendo que o composto 1 após incorporação no sistema (NP1) apresentou uma potencialização da ação, permitindo uma inibição de aproximadamente

85% na máxima concentração analisada (23,40 $\mu\text{g/mL}$) nos três tempos analisados, comparado com o composto 1 que possibilitou uma inibição de aproximadamente 16% no tempo de 4 horas e 30% nos tempos de 24 e 36 horas com quase o dobro da concentração (39 $\mu\text{g/mL}$). Ademais, NP1 apresentou um perfil de atividade semelhante diante dos diferentes tempos de formação analisados, não apresentando diferenças estatísticas. Quando comparados os tempos de formação do biofilme, o tempo de formação de 4 horas não difere muito quando comparado a 24 horas, apresentando diferença estatística em poucas concentrações analisadas, contudo, quando comparado com o tempo de 36 horas, apresentam uma maior diferença estatística. Sendo assim, foi definido o tempo de 4 horas suficiente para formação do biofilme de *H. pylori*.

5.4.2. Inibição de biofilmes maduros

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos para as amostras frente a biofilmes maduros de *H. pylori*.

Figura 22. Atividade metabólica de biofilmes maduros de *H. pylori*



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. A: Composto 1; B: Nanopartícula polimérica incorporada com composto 1; C: Amoxicilina; D: Claritromicina; E: Tetraciclina.

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one- way seguida por pós teste Dunnett, sendo (*) fracamente, (**) moderadamente e (***) fortemente significativo.

Fonte: Autora

Todos os resultados demonstraram que os tratamentos foram eficazes contra biofilme maduro de *H. pylori*. Observa-se ainda, que o composto 1 quando incorporado (NP1) apresentou uma potencialização na ação, o qual permitiu uma inibição de aproximadamente 40% em sua menor concentração (0,182 µg/mL) comparado com o composto livre que inibiu apenas 3% em sua menor concentração (0,304 µg/mL). O sistema pode ser qualificado como promissor em potencializar a atividade anti-biofilme, bem como nos ensaios com células planctônicas.

5.5. Determinação do potencial citotóxico

O composto 1 e a NP1 foram avaliados em relação a sua citotoxicidade (IC₅₀) utilizando as linhagens MRC-5 (fibroblatos pulmonares) e J774A.1 (macrófagos de camundongos), com os quais foi definida a menor concentração das amostras capaz de inibir ao menos 50% das células. Determinou-se o índice de seletividade (IS) através da razão do IC₅₀ pelo CIM₉₀.

A Tabela 4 apresenta os resultados das determinações do IC₅₀ do composto 1, bem como dos seus precursores (L₁ e AgNO₃), do composto 1 incorporado na NP (NP1) juntamente com a nanopartícula base (NPB) e seus constituintes (PLX e PCL), dos antibióticos utilizados na terapia contra *H. pylori* (AMOX, CLARI e TETRA) e DMSO 20% (solvente) e a 50% (controle positivo). O IS foi estabelecido para as amostras analisadas na CIM₉₀.

Tabela 4. Atividade anti-*H. pylori* e avaliação da citotoxicidade frente as linhagens celulares MRC-5 e J774A.1 com os respectivos valores de índice de seletividade (IS). Os valores de CIM₉₀ e IC₅₀ estão apresentados em µg/mL, com exceção para NP, PLX, PCL e DMSO (%).

Amostra	CIM ₉₀	MRC-5		J774A.1	
		IC ₅₀	IS	IC ₅₀	IS
A1	3,90	7,90	2,02	23,95	6,14
L ₁	0,24	68,72	286,33	77,19	321,62
AgNO ₃	7,81	8,10	1,03	12,27	1,57
NP1	0,78	12,02	15,41	17,62	22,58
NPB	0,0	>50	-	37,80	-
PLX	-	>50	-	38,56	-
PCL	-	>50	-	>50	-
AMOX	0,078	46,24	592,82	31,07	398,33
CLARI	0,019	>50	2.631,57	>50	2.631,57
TETRA	0,5	>50	100	43,93	87,86
DMSO 20%	-	7,88	-	7,09	-
DMSO 50%	-	5,66	-	5,66	-

CIM₉₀: concentração inibitória mínima; IC₅₀: índice de citotoxicidade; IS: índice de seletividade. MRC-5: fibroblatos pulmonares; J774A.1: macrófagos de camundongos; PLX: poloxamer; PCL: poli (ε- caprolactona); AMOX: amoxicilina; CLARI: claritromicina; TETRA: tetraciclina.

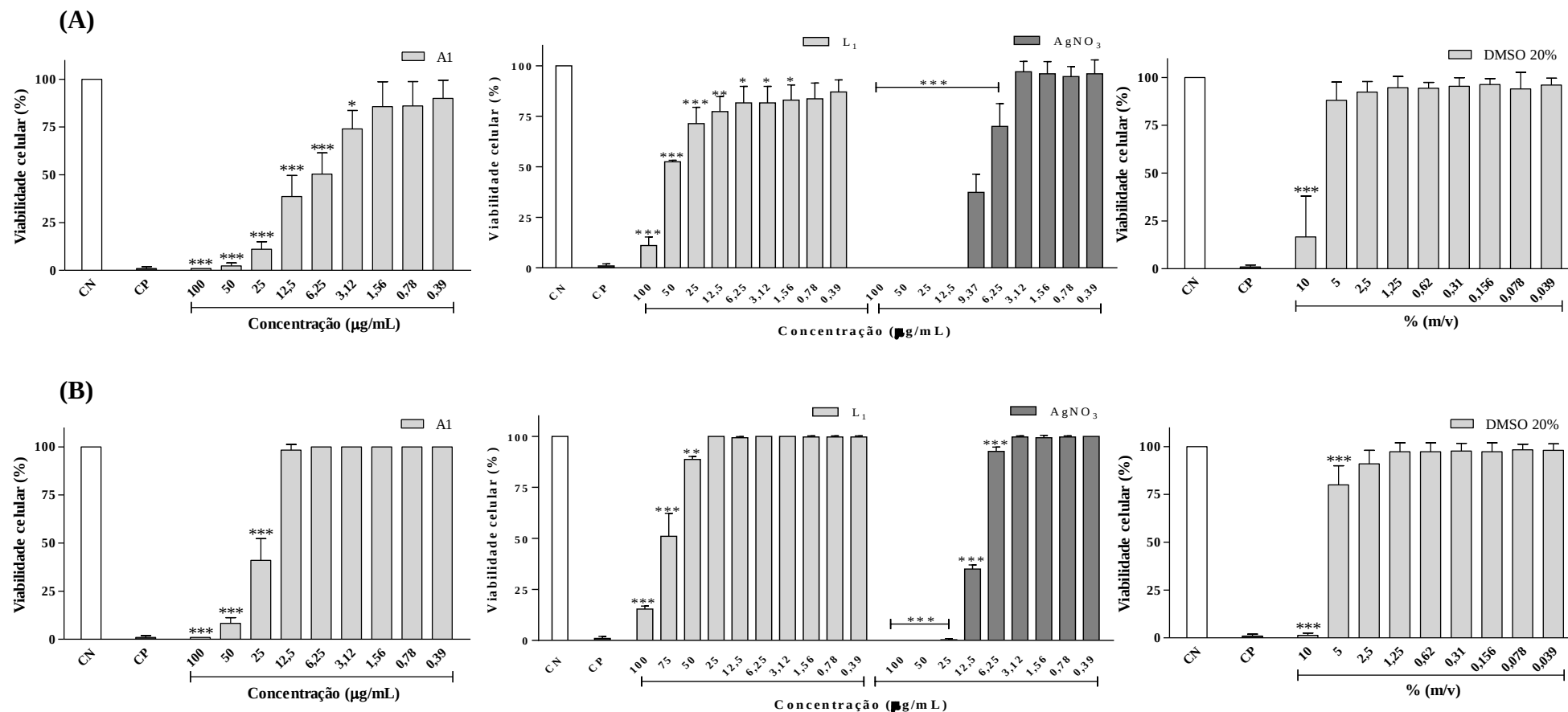
Os resultados obtidos de citotoxicidade frente à linhagem MRC-5, demonstram que o composto 1 apresenta maior citotoxicidade ($IC_{50} = 7,90 \mu\text{g/mL}$) quando comparado com seus precursores (L_1 e AgNO_3 , $68,72 \mu\text{g/mL}$ e $8,10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Contudo, após a incorporação no sistema (NP1), observou-se uma redução da toxicidade ($IC_{50} = 12,02 \mu\text{g/mL}$), sendo que o sistema (NPB) não apresentou toxicidade frente a esta linhagem celular ($IC_{50} = >50\%$).

Para a linhagem J774A.1 pode-se observar menor toxicidade comparada à linhagem MRC-5, destacando, contudo, que a NPB apresentou relativa toxicidade ($IC_{50} = 37,80\%$) o qual sugere-se que seja pela presença do tensoativo (PLX) que também apresentou $IC_{50} = 38,56 \mu\text{g/mL}$ frente esta linhagem celular.

A partir da CIM_{90} e do IC_{50} calculou-se o IS ($IS = IC_{50}/CIM_{90}$) o qual, quando apresentam valores ≥ 10 são considerados não citotóxicos, sendo mais seletivo para o microrganismo conforme maior for o valor de IS obtido (ORME et al., 2001; CAMPOS et al., 2019). Percebe-se que L_1 apresentou maior seletividade, em ambas as linhagens, apresentando proximidade de IS à linhagem J774A.1 quando comparado o IS da AMOX, fármaco padrão utilizado na terapia do *H. pylori* ($IC_{50} = 321,62 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50} = 398,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e maior seletividade frente a TETRA, em ambas linhagens. Contudo, devido a insolubilidade que L_1 apresenta, realizou-se a complexação com AgNO_3 , obtendo o composto 1, mais solúvel. Contudo, o composto 1 não apresentou IS frente as linhagens analisadas. Entretanto, quando incorporada na nanopartícula polimérica (NP1) obteve-se um IS de 15,41 (MRC-5), cerca de 7 vezes maior e 22,58 (J774A.1), 3 vezes maior após a incorporação.

As Figuras 23 e 24, apresentam os resultados do potencial citotóxico das amostras analisadas frente as linhagens MRC-5 (A) e J774A.1 (B) através do perfil metabólico celular, indicado pela porcentagem de viabilidade celular.

Figura 23. Viabilidade das linhagens MRC-5 (A) e J774A.1 (B) tratadas com o composto 1, L₁ e AgNO₃ e DMSO como controle de solvente.

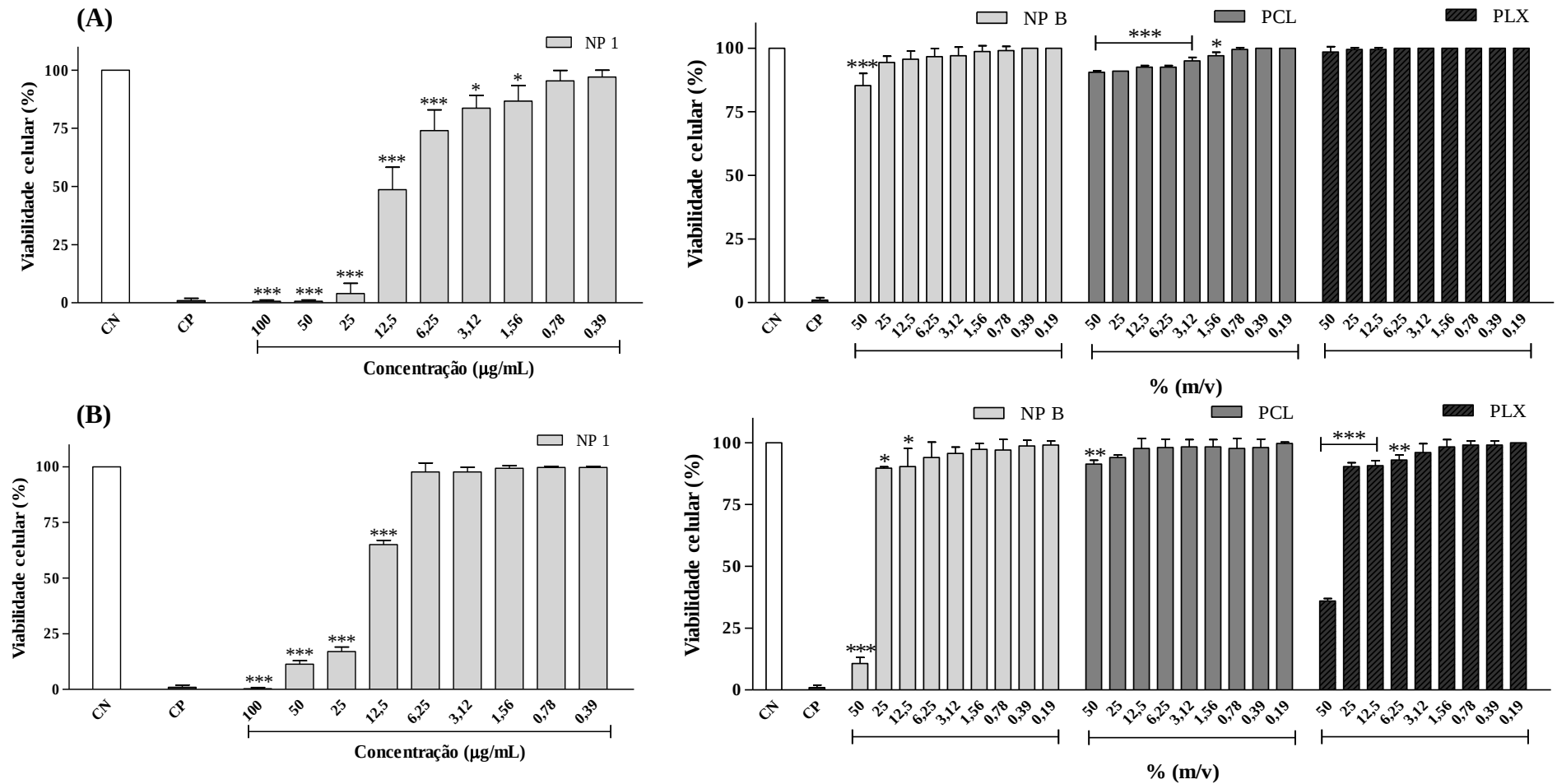


Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: Controle negativo (A: meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino; B: meio de cultura RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino); CP: controle positivo (DMSO 50%).

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Dunnett, sendo (*) fracamente, (**) moderadamente e (***) fortemente significativo.

Fonte: Autora

Figura 24. Viabilidade das linhagens MRC-5 (A) e J774A.1 (B) tratadas com NP1 e NPB, PCL e PLX.



Os valores são apresentados como média e desvio-padrão. CN: Controle negativo (A: meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino; B: meio de cultura RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino); CP: controle positivo (DMSO 50%)

(*) $p < 0,05$ avaliado pela análise de variância ANOVA one-way seguida por pós teste Dunnett, sendo (*) fracamente, (**) moderadamente e (***) fortemente significativo. **Fonte:** Autora

Conforme mostrado na Figura 23, a amostra AgNO_3 apresentou citotoxicidade em quase todas as concentrações, sendo que, quando analisado frente a J774A.1, a porcentagem de viabilidade celular é aumentada, não apresentando toxicidade nas últimas quatro concentrações. Para L_1 , sugere-se que a atividade apresentada na sua maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) frente as duas linhagens, seja pela presença ou influência do solvente, DMSO, pois o mesmo possui atividade citotóxica quando analisado separadamente na mesma concentração (10%). Quando L_1 e AgNO_3 são complexados formando o composto 1, o perfil de citotoxicidade é mantido, sendo que frente a MRC-5, não apresenta citotoxicidades nas últimas três concentrações, e quando analisado frente a J774A.1, a taxa de viabilidade celular é aumentada, apresentando citotoxicidade apenas nas três primeiras concentrações.

A Figura 24 apresenta a porcentagem de viabilidade celular do sistema de liberação. Observa-se que a base, quando analisada frente a linhagem MRC-5, apresenta citotoxicidade em sua maior concentração, a qual sugere-se que seja pela presença ou influência do polímero, visto que o tensoativo não apresentou citotoxicidade. Contudo, essa atividade citotóxica da base pode não influenciar, pois após a incorporação, o sistema apresenta altas taxas de citotoxicidade, apresentando diminuição na taxa de viabilidade celular em sete das concentrações analisadas. Sendo assim, sugere-se que a atividade apresentada por NP1 seja do composto 1, o qual apresenta perfil de viabilidade semelhante para essa linhagem celular. Em relação a J774A.1, a base também apresentou citotoxicidade, sendo que tanto o polímero quando o tensoativo apresentaram toxicidade. O perfil da NP1 apresenta-se semelhante ao apresentado frente a MRC-5, sugerindo que a atividade citotóxica apresentada seja da presença do composto 1.

Contudo, quando analisado a concentração de NP1 referente a CIM frente ao *H. pylori* (0,78 $\mu\text{g/mL}$) a amostra não apresenta citotoxicidade frente as duas linhagens celulares analisadas.

5.6. Avaliação do potencial mutagênico

A Tabela 5 mostra a média de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) obtidos após as análises com diferentes concentrações do composto 1 e NP1 nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+ S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica.

A amostra é considerada mutagênica quando há uma relação de resposta à dose entre as concentrações testadas e o número de reversores induzidos e/ou quando o IM é maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas.

O composto 1 induziu mutagenicidade com índice de mutagenicidade maior que 2 na cepa TA97a em experimentos com ativação metabólica e evidência de mutagenicidade na cepa TA98 também em experimentos com S9. Contudo, o mesmo reverteu a toxicidade apresentada pelo seu precursor, AgNO_3 , o qual apresentou-se tóxico em todas as linhagens testadas sem ativação metabólica.

Quando incorporado, inibiu a mutagenicidade previamente induzida e não foi mutagênico nas condições testadas nos experimentos com e sem ativação metabólica, não induzindo aumento no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo. Assim, NP1 obteve taxas de mutagenicidade menores que 2 em todas as concentrações e cepas utilizadas, apresentando perfil não mutagênico perante o ensaio de Ames.

Tabela 5. Mutagenicidade apresentada através do número revertentes/placa, desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) do composto 1 e NP1 contra *S. typhimurium* com (+ S9) e sem (- S9) atividade metabólica sobre as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a.

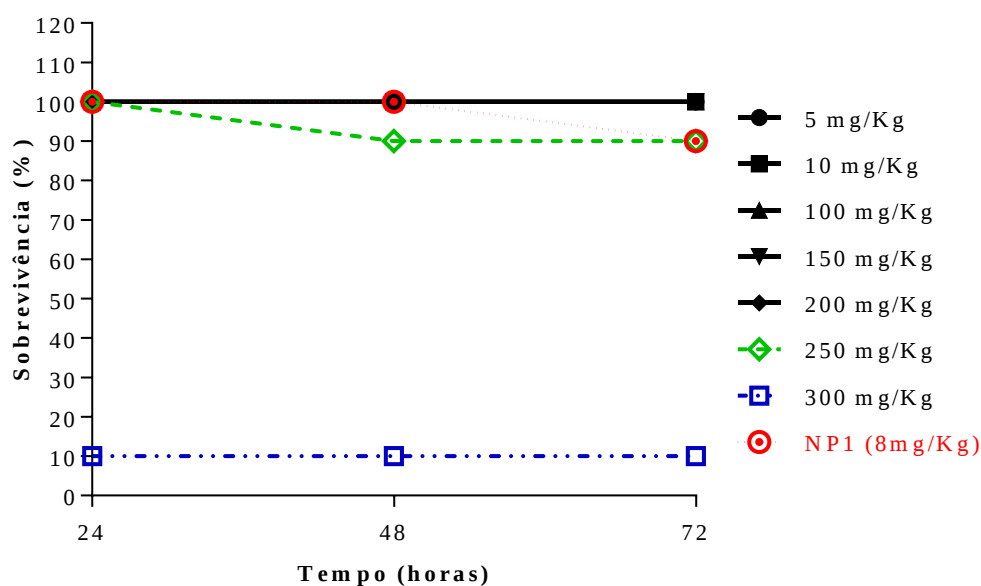
µg/placa	Número de revertentes (M ± DP)/placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
Composto 1								
DMSO	18 ± 2	18 ± 4	90 ± 14	84 ± 12	304 ± 38	416 ± 38	190 ± 22	81 ± 14
L ₁ (5 µg/placa)	19 ± 8 (1,09)	29 ± 5 (1,61)*	93 ± 11 (1,03)	98 ± 8 (1,17)	320 ± 24 (1,05)	417 ± 25 (1,00)	137 ± 16 (0,72)	130 ± 10 (1,61)*
AgNO ₃ (5 µg/placa)	Tóxico	22 ± 1 (1,19)	Tóxico	98 ± 4 (1,17)	Tóxico	381 ± 17 (0,92)	Tóxico	116 ± 8 (1,44)
0,62	22 ± 2 (1,26)	30 ± 8 (1,67)*	111 ± 20 (1,24)	99 ± 11 (1,18)	379 ± 30 (1,25)	430 ± 26 (1,03)	202 ± 27 (1,06)	131 ± 11 (1,62)*
1,25	20 ± 3 (1,14)	32 ± 10 (1,78)*	97 ± 15 (1,08)	101 ± 18 (1,20)	347 ± 34 (1,14)	398 ± 13 (0,96)	194 ± 23 (1,02)	124 ± 34 (1,54)*
2,50	19 ± 2 (1,09)	31 ± 3 (1,72)*	110 ± 13 (1,23)	93 ± 8 (1,10)	427 ± 18 (1,40)	386 ± 31 (0,93)	183 ± 19 (0,96)	150 ± 19 (1,86)*
3,75	17 ± 1 (0,97)	33 ± 2 (1,83)*	90 ± 5 (1,00)	108 ± 15 (1,29)	401 ± 25 (1,32)	378 ± 36 (0,91)	207 ± 14 (1,09)	161 ± 14 (1,99)**
5,00	18 ± 2 (1,03)	33 ± 5 (1,81)*	90 ± 12 (1,01)	86 ± 6 (1,02)	369 ± 13 (1,21)	385 ± 28 (0,93)	150 ± 13 (0,79)	206 ± 21 (2,55)**
C+	603 ± 73 ^a	998 ± 64 ^d	1344 ± 162 ^b	1860 ± 124 ^d	1547 ± 81 ^c	1455 ± 62 ^e	1263 ± 74 ^a	1040 ± 94 ^d
NP1								
Cesp	33 ± 5	23 ± 3	96 ± 11	119 ± 14	351 ± 15	293 ± 20	134 ± 8	153 ± 12
NPB	32 ± 3 (0,98)	23 ± 1 (1,00)	112 ± 9 (1,17)	139 ± 5 (1,16)	345 ± 23 (0,98)	269 ± 11 (0,92)	156 ± 13 (1,16)	173 ± 13 (1,13)
0,62	36 ± 2 (1,09)	21 ± 3 (0,91)	107 ± 2 (1,12)	141 ± 8 (1,18)	332 ± 26 (0,95)	218 ± 19 (0,75)	147 ± 19 (1,10)	146 ± 11 (0,95)
1,25	35 ± 4 (1,06)	20 ± 1 (0,85)	99 ± 13 (1,04)	122 ± 6 (1,03)	334 ± 10 (0,95)	204 ± 37 (0,70)	163 ± 16 (1,22)	150 ± 9 (0,98)
2,50	35 ± 2 (1,06)	22 ± 5 (0,93)	98 ± 4 (1,02)	78 ± 8 (0,66)	337 ± 17 (0,96)	236 ± 16 (0,81)	152 ± 12 (1,14)	142 ± 11 (0,93)
3,75	36 ± 2 (1,09)	17 ± 1 (0,74)	97 ± 5 (1,02)	75 ± 10 (0,63)	362 ± 10 (1,03)	202 ± 29 (0,69)	137 ± 10 (1,03)	124 ± 6 (0,81)
5,00	32 ± 0 (0,98)	17 ± 2 (0,72)	109 ± 13 (1,14)	72 ± 2 (0,61)	286 ± 21 (0,81)	175 ± 21 (0,60)	145 ± 12 (1,08)	104 ± 5 (0,68)
C+	857 ± 46 ^a	925 ± 20 ^d	1250 ± 157 ^b	1262 ± 82 ^d	2288 ± 185 ^c	1117 ± 78 ^e	1526 ± 88 ^a	1015 ± 53 ^d

M ± DP: media e desvio padrão; IM: índice mutagênico; Controle Negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO—100 µL/placa); Cesp: Controle Espontâneo; Controle Positivo (C+); NP1: Nanopartícula Polimérica incorporada com o composto 1; NPB: Nanopartícula Polimérica Base; ^a 4- nitro-*O*-fenilenodiamina (10,0 µg/placa - TA98 e TA97a); ^b azida sódica (1,25 µg/placa - TA100); ^c mitomicina (0,5 µg/placa - TA102), na ausência de S9; e ^d 2-antramine (1,25 µg/placa - TA98, TA100 e TA97a); ^e 2- aminofluoreno (10,0 µg/placa - TA102), na presença de S9.

5.7. Avaliação do potencial tóxico agudo em *Galleria mellonella*

A Figura 25 apresenta a porcentagem de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* analisadas no período de 24, 48 e 72 horas, após o tratamento com o composto 1 e NP1. Inicialmente, uma dose baixa do composto 1 foi injetada, analisada por 3 dias e, com menos de 60% de mortalidade, novas concentrações foram administradas. Em concentrações de 5 a 200 mg/kg, todas as larvas sobreviveram durante os dias de análise, indicando não toxicidade do composto 1 nessas concentrações. Analisando a concentração de 250 mg/kg, mostrou um declínio na taxa de sobrevivência, caindo para 90% após 48 horas, no entanto, a concentração não foi considerada tóxica. Entretanto, na concentração de 300 mg/kg, apresentou sobrevivência de apenas 10% em 24 horas de análise, levando a uma concentração indicativa de toxicidade. A nanopartícula foi analisada em sua concentração máxima de preparo, sendo 8mg/kg (equivalente a 200 µg/mL). O sistema permitiu a sobrevivência de todas as larvas durante o tempo de análise. O solvente (DMSO a 5% diluído em água) de todas as concentrações foi analisado, juntamente com o NPB, ambos não foram tóxicos, permitindo a sobrevivência de todas as larvas.

Figura 25. Porcentagem de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* (analisadas às 24, 48 e 72 horas) após tratamento com o composto 1 (5 - 300mg/kg) e NP1 (8mg/kg).



Fonte: Autora

6. DISCUSSÃO

A principal causa de falha na eficácia do tratamento no controle do *H. pylori* é a resistência a antibióticos (FRANCESCO et al, 2012). A cura ou a prevenção de complicações da gastrite crônica e úlcera péptica, e algumas formas de linfoma de MALT, depende do sucesso do controle do *H. pylori*. Assim, com o objetivo de buscar novas alternativas para combater esse microrganismo, analisamos novos complexos metálicos, e sua associação a sistema de liberação de fármacos, verificando suas atividades contra *H. pylori*. Além disso, foi verificado o potencial citotóxico, mutagênico e tóxico dessas amostras.

Os íons metálicos exercem boas atividades nos meios biológicos, o que vem estimulando a pesquisa e o desenvolvimento de novos compostos inorgânicos com potencial atividade terapêutica. Estudos indicam que diferentes metais podem provocar uma variedade de lesões em células bacterianas, desde disfunção de proteínas, estresse oxidativo ou mesmo causando danos a membrana. Os metais não essenciais, como a prata, por exemplo, são profundamente tóxicos a maioria das bactérias, expressando ação antibacteriana em concentrações muito baixas (COHEN, 2007; LEMIRE; HARRISON; TURNER, 2013).

Dentre os mecanismos apresentados pelos íons Ag(I) frente aos microrganismos, é de conhecimento a interação com enzimas e proteínas, conduzindo à desnaturação destas biomoléculas e consequentemente à inibição de uma variedade de processos enzimáticos. Outro mecanismo descrito é a interação com o envelope celular, a membrana plasmática e a parede celular, além da interação com o DNA, na inibição da replicação. Em relação aos microrganismos, estes apresentam um único mecanismo de resistência ao íons Ag(I), através do efluxo celular (PERCIVAL; BOWLER; RUSSEL, 2005; SILVER; PHUNG; SILVER, 2006; MEDICI et al., 2015).

A utilização de compostos de prata como fármacos é de longa data e vale ressaltar que seus sais, como exemplo, o AgNO_3 , tem sido empregado durante séculos como agentes antimicrobianos (SOUZA et al., 2013).

Além das propriedades biológicas, a Ag(I) apresenta uma repleta variedade de químicas de coordenação, variando os modos de coordenação e suas geometrias. A complexação pode ser realizada através da ligação com ligantes sulfurados, nitrogenados e íons haletos doadores, obtendo assim diferentes geometrias, com destaque entre as mais comuns, a geometria linear, trigonal planar, tetraédricas e octaédricas (HUHEEY; KEITER; KEITER, 1993; ATKINS et al., 2010). Ademais, a escolha do ligante adequado é de suma importância, o qual torna sua

diversidade ainda maior. Utilizando ligantes biologicamente ativos, há mais chances da ação, eficiência e/ou a seletividade ser maior.

As propriedades biológicas das tiossemicarbazonas estão frequentemente relacionadas à sua característica de ligação com íons metálicos, pertencendo a um conjunto de substâncias que são altamente conhecidas por suas importantes aplicações na busca de novos fármacos, em função de seu amplo espectro de ação. Já foram descritas várias atividades farmacológicas da tiossemicarbazona com metais, como antineoplásica, antiviral, antifúngica, antioxidante, antiparasitária e antibacteriana (LI et al., 2010; KOVALA-DEMERTZI et al., 2001; KASUGA et al., 2001; GLISONI et al., 2012; RODRÍGUEZ-ARGUELLES et al., 2005; GLINMA et al., 2014; MOREIRA et al., 2014; YU et al., 2009).

A química de coordenação das tiossemicarbazonas tem atraído atenção, contudo, quando a complexação é realizada com a prata, não há muitos estudos. Isso se deve, provavelmente, à instabilidade e à formação de espécies altamente insolúveis (CASTIÑEIRAS; PEDRIDO, 2008). Os compostos de coordenação analisados, insolúveis em água, foram solubilizados em 100% de DMSO, devido as propriedades de solubilização apresentadas das tiossemicarbazonas obtidas segundo reação de condensação entre aldéido ou cetona (BISCEGLIE et al., 2018). Diante disso, pensando em superar esse obstáculo, foi desenvolvido um sistema de liberação de fármacos com a intenção de melhorar suas características de solubilidades.

Sistemas de liberação de fármacos vêm sendo bastante estudados devido as suas vantagens em relação a terapias convencionais, como melhor biodisponibilidade e solubilidade de substâncias tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, além de liberação controlada e melhor direcionamento dentro do corpo. As nanopartículas poliméricas representam uma proporção crescente desta classe, por apresentarem propriedades altamente ajustáveis, além de proteger substâncias sensíveis à oxidação em presença de água, prolongar e aperfeiçoar o controle da administração de fármacos (MULLER et.al., 2004; MARKWALTER et al., 2019).

Para a composição das NPs utiliza-se, basicamente, um polímero, tensoativo, fármaco ou outra substância ativa e um solvente orgânico, o qual é utilizado no preparo e depois é descartado ou eliminado (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Para a NP desenvolvida nesse trabalho, escolheu-se a utilização do polímero PCL um poliéster sintético e biodegradável, com registro na literatura de seu emprego como matriz em sistemas de liberação de fármacos, em razão da alta biocompatibilidade e facilidade de eliminação do organismo. A escolha do poloxamer 407 como tensoativo se deve ao seu potencial estabilizador, o qual é capaz de proporcionar uma boa estabilidade no tamanho das partículas. E como solvente orgânico utilizou-se a acetona, a qual possui alta tendência de agregação além de ser facilmente

removido por evaporação (GAUCHER et al., 2005; LASSALLE; FERREIRA, 2007; REUL; CARVALHO; CANEDO, 2017; COLOMBO et al., 2018; ZELENKOVÁ et al., 2018).

Dentre os métodos para a síntese de NPs, a escolha do método adequado deve-se aos requisitos necessários para sua aplicação, bem como das características do princípio ativo incorporado (moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas), para assim, obter-se NPs com propriedades desejadas (CRUCHO; BARROS, 2017; URREJOLA et al., 2018).

As NPs foram preparadas conforme o método de nanoprecipitação, na qual a fase orgânica que contém o polímero é transferida para a fase aquosa, que contém tensoativo, ocorrendo uma turbulência interfacial, a qual é gerada através da diminuição da tensão interfacial que ocorre entre as fases. Assim, o solvente orgânico atua difundindo pela fase aquosa, carregando consigo cadeias poliméricas, formando gotículas que se agregam em NP espontaneamente, em virtude da contínua disseminação do solvente na presença de água (GALINDO-RODRIGUEZ et al., 2004).

A caracterização físico-química do sistema consistiu-se em determinar as propriedades da partícula como tamanho e distribuição de tamanho, carga superficial, estrutura, dentre outras, sendo essencial para confirmar a formação da NP (CHEN et al., 2013). Existe várias técnicas utilizadas para a caracterização de NPs, sendo utilizada nesse estudo a análise por DLS, Zeta e MET.

O DLS fornece o tamanho das partículas e sua distribuição, sendo preconizado para NPs uma faixa de 10 a 1000 nm (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008). Conforme mostrado na Tabela 1, pode-se observar que todas as formulações estão dentro do valor preconizado, variando entre $155,10 \pm 3,60$ a $180,00 \pm 1,13$. O pequeno aumento apresentado para as NPs incorporadas com as amostras, sugere-se que os compostos tenham sido incorporados, conforme mostrado no estudo de da Silva et al. (2015), no qual foi desenvolvido um sistema lipídico nanoestruturado para incorporação de complexos de Cobre (III), onde o sistema mostrou um aumento no tamanhos das partículas após a incorporação. Os tamanhos de partículas obtidos encontram-se adequados para administração oral, pois, segundo Marcano et al. (2018) partículas <500 nm possuem mais facilidade em atravessar a barreira gastrointestinal e difundem-se com mais facilidade nas camadas de muco. Em relação ao IPD, os valores obtidos foram satisfatórios, todos inferiores a 0,3, evidenciando a existência de uma homogeneidade entre as partículas (MARCANO et al., 2018).

A mobilidade eletroforética, ou seja, potencial zeta, avalia a estabilidade física das suspensões, determinando a eficácia do revestimento da superfície ou a adsorção do princípio ativo nas NPs, o qual pode ser instigado pelos grupos funcionais presentes nos polímeros e por

modificações na interface. As NPs apresentaram potencial zeta negativo, sendo esta carga negativa devido a presença dos grupos carboxilas terminais ionizáveis do polímero (PCL). Além disso, o sistema é composto por um tensoativo não iônico, que segundo a literatura, provoca um impedimento estérico na superfície da nanopartícula ocorrendo uma interação entre as cadeias hidrocarbônica do tensoativo com as regiões hidrofóbicas da superfície polimérica, induzindo assim cargas negativas e diminuindo o PZ. (DA ROSA et al., 2015; ELOY et al., 2015; SCHAFFAZICK et al., 2003; KIRBY; HASSELBRICK, 2004; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

Miladi et al. (2015) prepararam nanopartículas para encapsulamento do alendronato de sódio, através da técnica de nanoprecipitação. Utilizaram PCL como polímero e acetona como solvente orgânico. O tamanho de partículas foi determinado na faixa de 195 a 447 nm e potencial zeta em torno de -0,52 a -10,4 mV, o qual relatam o valor baixo do potencial zeta sendo devido aos grupos COOH presentes do PCL.

A partir dessa caracterização foi possível analisar a estabilidade das formulações utilizando esses parâmetros para acompanhá-las ao longo de 90 dias, para então escolher uma amostra que apresentasse o melhor conjunto de resultados. O monitoramento de alterações na disposição de tamanho das partículas é considerado um fator relevante na estabilidade de nanossuspensões, pois em função do tempo as nanopartículas dispersas podem ter predisposição à agregação e sedimentação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Essa tendência à agregação pode ser sugerida como a possível causa dos resultados obtidos na análise do IPD, visto que o IPD está relacionado com a homogeneidade do sistema. Conforme mostrado na Figura 18, nota-se que a partir do dia 30, a NP3 apresentou valores acima de 0,3, enquanto a NP4, apresentou uma oxilação. Pode-se observar que, a NPB, NP1 e NP2, não tiveram seu IPD acima de 0,3 em nenhum momento, mantendo-se a uniformidade e a estabilidade. Além disso, as amostras revelaram aparência inalterada, sem mudança de cor durante os 90 dias de análises.

Um estudo semelhante pode ser observado na pesquisa de Abriata et al. (2019), onde realizaram o estudo de estabilidade de nanopartículas durante 21 dias. As NPs contendo PCL dissolvido em acetona, na fase orgânica, e poloxamer 407 em tampão fosfato na fase aquosa, foram preparadas para encapsular paclitaxel. As NPs foram mantidas a 4 °C por 21 dias e analisadas nos dias 0, 7, 14 e 21. Analisando o tamanho de partícula e IPD, ambos resultados permaneceram próximos aos valores iniciais, de $144,2 \pm 4,5$ nm a $195,2 \pm 17$ nm e de $0,065 \pm 0,03$ a $0,155 \pm 0,1$, após 21 dias, respectivamente. As formulações analisadas não

apresentaram alterações significativas durante o estudo de estabilidade, o que é importante para garantir as propriedades de nanocarreadores.

Diante dos resultados obtidos no ensaio de MIC em associação com os adquiridos na estabilidade, foi escolhida a NP1 para prosseguir com os demais ensaios. Sendo então, o composto 1 e a NP1 selecionados.

A MET permitiu a observação das partículas e confirmou o tamanho das NPs obtidas na análise de espalhamento de luz. Conforme mostrado na Figura 19, em ambos os casos foram observadas partículas bem definidas com forma esférica. Segundo sua morfologia apresentada, a faixa em volta sugere-se que seja a membrana polimérica formada, e a formação de um núcleo, sugerindo que a nanopartícula desenvolvida seja uma nanocápsula (MOINARD-CHÉCOT et al., 2008).

Oliveira et al. (2017) obtiveram imagens parecidas, partículas bem definidas e esféricas, através da técnica de nanoprecipitação. Utilizaram o poli (ácido láctico- co- glicólico) (PLGA) como polímero, dissolvido em acetona, utilizada como solvente orgânico. A fase aquosa foi constituída de poloxâmer 188. No estudo, as NPs foram preparadas e caracterizadas com intuito do uso intravenoso e analisadas quanto a estabilidade em três meios diferentes, representando o ambiente biológico.

Em relação aos ensaios de concentração inibitória mínima, os compostos apresentaram uma melhor atividade antibacteriana contra *H. pylori*, comparado com as outras cepas, o que confirma a potencialidade destes compostos em inibir o crescimento dessa espécie de bactéria.

Na literatura não há relatos da atividade de complexos de prata(I) frente a *H. pylori*, sendo os complexos de bismuto (III) os estudados para essa atividade, assim, o uso de compostos de coordenação de prata, com tiossemicarbazona como ligante, torna o ineditismo desse estudo (BUSSE et al., 2013; PATHAK et al., 2017; WOZNICZKA et al., 2018). Há estudos na literatura de atividade antimicrobiana de compostos de coordenação de prata(I), porém utilizando outros ligantes frente as outras cepas analisadas. Jakobsen et al. (2018) descreveram a síntese e o ensaio biológico dos compostos $\{[Ag_4(pmtbH)_4(NO_3)_4] \cdot 2H_2O\}$ e $[AgI(pmtbH)]_4$ obtidos a partir do ligante $\{2-[(2\text{-piridinilmetil})\text{tio}]\text{-1H-benzimidazol (pmtbH)}\}$ frente a alguns microrganismos, sendo que os compostos apresentaram uma CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* ATCC 25923 e de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* ATCC 25922, respectivamente, sendo que o ligante livre foi inativo para as cepas testadas.

Outro estudo envolvendo íons $Ag(I)$ foi o de Aslam et al. (2016), o qual avaliaram a atividade antimicrobiana de dois complexos de prata(I): $[Ag(phen)_2]NO_3$ e $[Ag(bpy)_2]NO_3$ obtidos a partir dos ligantes $\{1,10\text{-fenantrolina (phen)}; 2,2'\text{-bipiridina (bpy)}\}$ frente a alguns

microrganismos, os quais apresentaram uma CIM de 20 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente, para *E. coli*, porém, nesse caso, os complexos foram menos eficazes em comparação com os ligantes livres.

Os sistemas de liberação de fármacos como alternativa no tratamento de *H. pylori*, possibilita a defesa dos princípios ativos contra a degradação do meio ácido estomacal, além de proporcionar a entrega segura às áreas colonizadas pela bactéria (SAFAROV et al., 2019). O uso do PCL na composição de nanopartículas poliméricas, possibilita a mucoadesão via ligação de hidrôgenio, interações hidrofóbicas, emaranhados de polímeros com mucinas, ou mesmo, uma combinação deles (ENSIGN; CONE; HANES, 2012). O que pode ser um sugestivo da potencialização da atividade antibacteriana após a incorporação na nanopartícula polimérica desenvolvida nesse estudo.

Quando se compara células planctônicas com células crescidas em biofilme, esta última expressa propriedades distintas, sendo a principal diferença a capacidade de resistência microbiana na presença de agentes antibacterianos aplicados na clínica (CHUA et al., 2014).

O descobrimento de novos compostos com ação em biofilmes ainda é de extrema dificuldade devido à complexidade presente no modo de metabolização dos biofilmes. Assim, é constante a busca por novas moléculas capazes de eliminar os mesmos (FANNING; MITCHELL, 2012).

Com o intuito de determinar o tempo necessário que o *H. pylori* precisa para formar o biofilme, foi realizado um ensaio inibição de biofilme diferenciando o tempo de tratamento, ou seja, em todos os ensaios realizou-se a pré-adesão de 4 horas, e variou em 4, 24 e 36 horas, o tempo de adição dos compostos para tratamentos, visto que, o tempo de 4 horas foi o mesmo de pré-adesão, ou seja, no momento da renovação do meio nesse horário, foi adicionado os compostos. Conforme mostrado na Figura 20 e 21, há uma maior diferença estatística entre os tempos de 4 e 36 horas, e analisando adicionalmente os resultados do biofilme maduro (Figura 22), sugere-se que em 36 horas, o biofilme possa já estar maduro, diante dos valores próximos encontrados, sendo assim, propomos que 4 horas seja um tempo suficiente para o *H. pylori* formar o biofilme.

Li et al. (2019) relatam em seu estudo o uso de ramnolipídeo (RHL), um composto (biossurfactante) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* que possui a capacidade de interromper matrizes bacterianas de biofilmes por meio de ligações entre íons metálicos no interior da MEP, interrompendo a via de sinalização. Devido ao fato de não haver estudos sobre biofilmes de *H. pylori*, eles desenvolveram nanopartículas de polímeros lipídicos, empregando nanopartículas de quitosana como núcleo interno, e o RHL na camada externa, além de

fosfolipídios para encapsulamento de claritromicina. Foi inserido DSPE-PEG2000 para melhorar a hidrofiliabilidade do sistema, o qual é sugerido como um facilitador na penetração do muco, assim, atingindo mais facilmente as células epiteliais onde *H. pylori* se localiza. As nanopartículas de polímeros lipídicos foram capazes de eliminar o biofilme maduro de *H. pylori*, através da destruição da matriz do biofilme, pela ação do RHL, e da atividade antibacteriana exercida pela nanopartícula encapsulada de claritromicina.

Segundo Kostenko et al. (2010) a liberação constante de Ag no meio, causa maiores lesões à membrana celular e ao DNA bacterianos, provovendo a destruição das células no interior do biofilme, assim, acredita-se que ação potencializada apresentada, tanto em células planctônicas, quanto no biofilme, da NP1, deve-se ao sistema propriamente dito, que possibilita essa liberação mais lenta do composto.

O sistema possibilitou ainda melhores resultados na análise de citotoxicidade, o qual proporcionou um aumento de seletividade ao *H. pylori* de cerca de 7 vezes maior para MRC-5 e 3 vezes maior quando comparado a J774A.1. Ademais, a NP1 analisada na mesma concentração referente ao CIM, não apresenta citotoxicidade frente as linhagens celulares analisadas.

Um estudo de citotoxicidade com NPs contendo PCL, realizado por Budama-Kilinc et al. (2018) em células HEK-293 (células renais embrionárias humanas) apresentou resultados parecidos, uma pequena toxicidade do polímero na maior concentração, visto que o polímero é conhecido como não tóxico. A taxa de viabilidade celular apresentada no estudo foi superior a 80%, coincidindo com os resultados obtidos nesse estudo.

Estudos toxicológicos são importante quando se busca novos fármacos, com o intuito de prever a toxicidade e possíveis efeitos tóxicos.

O teste de Ames é amplamente aceito para a identificação de substâncias capazes de causar dano genético e causar mutação genética. O ensaio é realizado com linhagens de *S. typhimurium*, dependente de histidina, ou seja, não são capazes de produzir o aminoácido, portanto, não cresce em sua ausência. As cepas utilizadas diferem em referência às diferentes mutações que elas apresentam em vários genes no operon histina, cada mutação sendo projetada para responder a mutagênicos que atuam em diferentes mecanismos. Para as cepas TA97a e TA98, ambas detectam mutações frameshift, apresentando mutações no gene *hisD6610* e *hisD3052*, respectivamente, causando deslocamento do quadro de leitura de DNA. O *hisG46* mutação na cepa TA100 conduz uma mutação do tipo substituição de pares de bases, substituindo uma leucina por uma prolina. Enquanto a cepa TA102 apresenta uma mutação do tipo transições/tranversões no gene *hisG428*. A amostra analisada é considerada mutagênica

quando, em contato com a bactéria, possibilita que a mesma produza histina, e assim, cresça. O crescimento bacteriano é analisado permitindo indicar o potencial mutagênico do produto testado (TEJS, 2008; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; TOWNSEND; GRAYSON, 2019).

Assim, uma amostra é considerada positiva quando apresenta IM igual ou superior a 2 em pelo menos um das doses analisadas. Um resultado positivo indica que o composto é mutagênico, podendo atuar como agente cancerígeno (MEDINA et al., 2019).

Conforme apresentado na tabela 6, o composto 1 apresentou mutagenicidade e evidência de mutagenicidade em linhagens com ativação metabólica, ou seja, indica que são mutagênicos através da conversão pelo metabolismo de mamíferos, mediante citocromo P450 (CHUNG; CHEN; CLAXTON, 2006; da SILVA et al., 2019).

Diante da importância de testar novos compostos com atividade biológica, vem sendo utilizados modelos alternativos, os quais, quando comparados com modelos tradicionais de mamíferos, são considerados mais baratos, mais fáceis e de resultado mais rápido (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

As larvas de *Galleria mellonella* é um exemplo que vem sendo estudado atualmente, como modelo para ensaios de eficácia antimicrobiana e para estudo de virulência (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). Possuem um sistema imunológico inato que se assemelha estruturalmente e funcionalmente aos dos mamíferos (ALLEGRA et al., 2018).

No estudo de de Jakobsen et al. (2018), o complexo de prata (I) obtido, a partir do AgNO_3 como sal, foi avaliado quanto à toxicidade em *G. mellonella*. Os resultados mostraram que a administração da maior concentração do composto (100 mg/kg) não apresentou toxicidade, correspondendo aos nossos resultados. Vale ressaltar que o sistema, na concentração máxima, não foi tóxico e foi eficaz em outros experimentos.

Assim, de uma maneira geral, pode-se observar que os dados obtidos nesse estudo são promissores, pois, além do composto ser inédito, não há na literatura estudos de compostos de coordenação utilizando a prata em associação a nanopartículas poliméricas para o tratamento de *H. pylori*, sendo esses resultados originais e de extrema importância. Em relação ao sistema de liberação de fármacos, pode-se comprovar a formação da nanopartícula polimérica, com bases nos resultados obtidos nos ensaios de caracterização com outros artigos relacionados com mesmos constituintes ou técnica de preparo. Além disso, a nanopartícula possibilitou uma potencialização dos resultados apresentados pelo composto livre nos ensaios microbiológicos, apresentou resultados de citotoxicidade referentes aos encontrados na literatura, permitiu melhores resultados no ensaio de mutagenicidade, inibindo a mutagenicidade apresentada pelo

composto livre, além de não apresentar toxicidade em sua maior concentração preparada no ensaio de toxicidade aguda em *G. Mellonella*.

7. CONCLUSÕES

- Os compostos de coordenação de prata(I) demonstraram grande potencial antibacteriano frente as bactérias testadas;
- Os constituintes utilizados na composição do sistema foram capazes de criar estruturas em ordem de nanômetros caracterizando o sistema em nanopartículas poliméricas;
- Os ensaios de caracterização mostraram que a nanopartícula polimérica base e incorporadas possuem características favoráveis e aceitáveis para um sistema de liberação de fármacos;
- Todas as amostras tiveram sua ação potencializada frente ao *H. pylori* e *S. aureus*, após a incorporação na NP.
- Para *H. pylori*, todos os compostos (não incorporados e incorporados) mostraram serem capazes de parar o crescimento, ou seja, todos foram bactericidas;
- No ensaio de inibição de biofilme, foi possível observar que 4 horas é um tempo suficiente para formação do biofilme de *H. pylori*;
- Em relação ao biofilme maduro, a NP foi eficaz, potencializando a ação do composto 1;
- Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade mostraram que o composto após incorporação apresentou-se mais seletivo frente ao composto livre;
- O composto 1 induziu mutagenicidade na cepa TA97a com S9 e após sua incorporação em NP1, a mutagenicidade foi inibida;
- O composto 1 apresentou toxicidade no modelo alternativo *in vivo* (*G. mellonella*) na concentração de 300mg/Kg, porém, em NP1, na concentração máxima preparada, não foi tóxico.

Assim sendo, o emprego da nanotecnologia permitiu um aumento da atividade antibacteriana dos compostos de coordenação de prata (I). Estes dados são promissores e incentivam a continuidade da pesquisa, pois apresentam-se como uma fonte alternativa na terapia anti-*H. pylori*.

8. REFERÊNCIAS

- ABRIATA, J. P.; TURATTI, R. C.; LUIZ, M. T.; RASPANTINI, G. L.; TOFANI, L. B.; AMARAL, R. L. F.; SWIECH, K.; MARCATO, P. D.; MARCHETTI, J. M. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science & Engineering C**, v. 96, p. 347-355, 2019.
- ADEYEMI, J. O.; ONWUDIWE, D. C. Organotin (IV) Dithiocarbamate Complexes: Chemistry and Biological Activity. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018.
- ALLEGRA, E.; TITBALL, R. W.; CARTER, J.; CHAMPION, O. L. *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, v. 198, p. 469-472, 2018.
- ALEXIS, F.; PRIDGEN, E.; MOLNAR, L. K.; FAROKHZAD, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.
- ALTAF, M.; STOECKLI-EVANS, H.; CUIN, A.; SATO, D. N.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; AHMAD, S.; BOUAKKA, M.; MIMOUNI, M.; KHARDLI, F. Z.; HADDA, T. B. Synthesis, crystal structures, antimicrobial, antifungal and antituberculosis activities of mixed ligand silver (I) complexes. **Polyhedron**, v. 62, p. 138-147, 2013.
- APOHAN, E.; YILMAZ, U.; YILMAZ, O.; SERINDAG, A.; Küçükbay, H.; YESILADA, O.; BARAN, Y. Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 828, p. 52-58, 2017.
- ARMSTRONG, D.; KIRK, S. M.; MURPHY, C.; GUERREIRO, A.; PERUZZINI, M.; GONSALVI, L.; PHILLIPS, A. D. Water-Soluble Silver(I) Complexes Featuring the Hemilabile 3,7-Dimethyl-1,3,5-triaza-7-phosphabicyclo[3.3.1]nonane Ligand: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity. **Inorganic Chemistry**, n. 57, p. 6309-6323, 2018.
- ASLAM, S.; ISAB, A. A.; ALOTAIBI, M. A.; SALEEM, M.; MONIM-UL-MEHBOOB, M.; AHMAD, S.; GEORGIEVA, I.; TRENDAFILOVA, N. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT calculations and antimicrobial properties of silver(I) complexes of 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline. **Polyhedron**, v. 115, p. 212-218, 2016.
- ATKINS, P.; OVERTON, T.; ROURKE, J.; WELLER, M.; ARMSTRONG, F.; HAGERMAN, M. **Inorganic chemistry**. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.
- BATISTA, M. R.; BORGES, M.; CARVALHO, O.; RODRIGUES, A.; SANTOS, J. Infecção bacteriana hospitalar em pacientes submetidos a transplante hepático em 2008. **Revista Pesquisa: Cuidado Fundamental Online**, v. 2, Ed. Supl., p. 9-11, 2010.
- BERALDO, H. SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS: O AMPLO PERFIL FARMACOLÓGICO E USOS CLÍNICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 31-39, 2004.

BERTOLLO, L. G.; LUTKEMEYER, D. S.; LEVIN, A. S. Are antimicrobial stewardship programs effective strategies for preventing antibiotic resistance? A systematic review. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 7, p. 824-836, 2018.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BIBI, Y.; NISA, S.; CHAUDHARY, F. M.; ZIA, M. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 11, p. 52-58, 2011.

BISCEGLIE, F.; TAVONE, M.; MUSSI, F.; AZZONI, S.; MONTALBANO, S.; FRANZONI, S.; TARASCONI, P.; BUSCHINI, A.; PELOSI, G. E f f e c t e d e substituintes polares sobre a actividade biológica de tio-semicarbazona de metal complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 179, p. 60-70, 2018.

BONIFÁCIO, B. V; RAMOS, M. A.S; SILVA, P. B; BAUAB, T. M. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, 2014.

BRAZ, D. C.; OLIVEIRA, L. R. S.; VIANA, A. F. S. C. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso da *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n.1, p. 86-90, 2013.

BUDAMA-KILINC, Y.; CAKIR-KOC, R.; KECCEL-GUNDUZ, S.; ZORLU, T.; KOKCU, Y.; BICAK, B.; KARAVELIOGLU, Z.; OZEL, A. E. Papain Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanoparticles: In-silico and In-Vitro Studies. **Journal of Fluorescence**, v. 28, p. 1127-1142, 2018.

BUSSE, M.; TRINH, I.; LIXO, P. C.; FERRERO, R. L.; ANDREWS, P. C. Synthesis and Characterisation of Bismuth(III) Aminoarenesulfonate Complexes and Their Powerful Bactericidal Activity against *Helicobacter pylori*. **Chemistry: A European Journal**, v. 19, p. 5264 – 5275, 2013.

CALVET, X. Dealing with uncertainty in the treatment of *Helicobacter pylori*. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 9, n. 4, p. 93-102, 2018.

CAMARGO, M. C.; GARCÍA, A.; RIQUELME, A.; OTERO, W.; CAMARGO, C. A.; HERNANDEZ-GARCÍA, T.; CANDIA, R.; BRUCE, M. G.; RABKIN, C. The Problem of *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics: A Systematic Review in Latin America. **The American journal of Gastroenterology**, v. 109, n. 4, p. 485-495, 2014.

CAMPOS, D. L.; MACHADO, I.; RIBEIRO, C. M.; GAMBINO, D.; PAVAN, F. R. Bactericidal effect of pyridine-2-thiol 1-oxide sodium salt and its complex with iron against resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Antibiotics**, 2019.

- CARRON, M. A.; TRAN, V. R.; SUGAWA, C.; COTICCBIA, J. M. Identification of *Helicobacter pylori* Biofilms in Human Gastric Mucosa. **In Vivo H pylori Biofilms**, v. 10, n. 5, p. 712-717, 2006.
- CASTIÑEIRAS, A.; PEDRIDO, R. Factors Involved in the Nuclearity of Silver Thiosemicarbazone Clusters: Cocrystallization of Two Different Sized Tetranuclear Silver(I) Clusters Derived from a Phosphinothiosemicarbazone Ligand. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 5534-5536, 2008.
- CELLINI, L.; GRANDE, R.; CAMPLI, E.; TRAINI, T.; GIULIO, M.; LANNUTTI, S. N.; LATTANZIO, R. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 43, p. 178-185, 2008.
- CHAUHAN, N.; TAY, A. C. Y.; MARSHALL, B. J.; JAIN, U. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview. **Helicobacter**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2019.
- CHEN, S.; POPOVICH, J.; ZHANG, W.; GANSER, C.; HAYDEL, S. E.; SEO, D.K. Superior ion release properties and antibacterial efficacy of nanostructured zeolites ion-exchanged with zinc, copper, and iron. **Royal Society of Chemistry**, v. 8, n. 66, p. 37949-37957, 2018.
- CHEN, C.; ZHU, S.; HUANG, T.; WANG, S.; YAN, X. Analytical techniques for single-liposome characterization. **Analytical Methods**, v.9, p. 2150-2157, 2013.
- CHUA, S. L.; LIU, Y.; YAM, J. K. H.; CHEN, Y.; VEJBORG, R. M.; TAN, B. G. C.; KJELLEBERG, S.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; YANG, L. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nature Communications**, v. 5, n. 4462, 2014.
- CHUNG, K. T.; CHEN, S. C.; CLAXTON, L. D. Review of the Salmonella typhimurium mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. **Mutation Research**, v. 612, p. 58-76, 2006.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6^a ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6^a ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- COELHO, E.; MAGALHÃES, A.; DINIS-RIBEIRO, M.; REIS, C. R. Mecanismos Moleculares de Adesão e Colonização da Mucosa Gástrica pela *Helicobacter pylori* e suas Implicações Clínicas. **Revista Científica da Ordem dos Médicos**, v. 29, n. 7-8, p. 476-483, 2016.

COELHO, L. G. V.; MARINHO, J. R.; GENTA, R.; RIBEIRO, L. T.; PASSOS, M. C. F.; ZATERKA, S.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BARBOSA, A. J.; BARBURI, R.; BRAGA, L. L.; BREYER, H.; CARVALHAES, A.; CHINZON, D.; CURY, M.; DOMINGUES, G.; JORGE, J. L.; MAGUILNIK, I.; MARINHO, F. P.; MORAES-FILHO, J. P.; PARENTE, J. M. L.; PAULA-E-SILVA, C. M.; PEDRAZZOLI-JÚNIOR, J.; RAMOS, A. F. P.; SEIDLER, H.; SPINELLI, J. N.; ZIR, J. V. IVth Brazilian Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 2, p. 97-121, 2018.

COHEN, S. M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 115-120, 2007.

COLOMBO, M.; MINUSSI, C.; ORTHMANN, S.; STAUFENBIEL, S.; BODMEIER, R. Preparation of amorphous indomethacin nanoparticles by aqueous wet bead milling and in situ measurement of their increased saturation solubility. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, p. 159-168, 2018.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

CRUHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 771-784, 2017.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DA ROSA, C. G.; MACIEL, M. V. O. B.; CARVALHO, S. M.; MELO, A. P. Z.; JUMMES, B.; SILVA, T.; MARTELLI, S. M.; VILLETI, M. A.; BERTOLDI, F. C.; BARRETO, P. L. M. 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.

DA SILVA, M. M.; de CAMARGO, M. S.; CORREA, R. S.; CASTELLI, S.; GRANDIS, R. A.; TAKARADA, J. E.; VARANDA, E. A.; CASTELLANO, E. E.; DEFLON, V. M.; COMINETTI, M. R.; DESIDERI, A.; BASTISTA, A. A. Non-mutagenic Ru(II) complexes: cytotoxicity, topoisomerase IB inhibition, DNA and HSA binding. **Dalton Transactions**, v. 48, p. 14885-14897, 2019.

DE TOLEDO, L. G.; RAMOS, M. A. S.; SPÓSITO, L.; CASTILHO, E. M.; PAVAN, F. R.; LOPES, E. O.; ZOCCOLO, G. J.; SILVA, F. A. N.; SOARES, T. H.; SANTOS, A. G.; BAUAB, T. M.; ALMEIDA, M. T. G. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida Species*. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, p. 1252, 2016.

DHANYALAYAM, D.; SCRIVANO, L.; PARISI, O. I.; SINICROPI, M. S.; FAZIO, A.; SATURNINO, C.; PLUTINO, M. R.; CRISTO, F.; PUOCI, CAPPELLO, A. R.; LONGO, P. Biopolymeric self-assembled nanoparticles for enhanced antibacterial activity of Ag-based compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 395-402, 2017.

- DHAR, S. K.; SONI, R. K.; DAS, B. K.; MUKHOPADHYAY, G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, n. 1-2, p. 207-215, 2003.
- DIAZ, P.; VALDERRAMA, M. V.; BRAVO, J.; QUEST, A. F. G. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1-10, 2018.
- DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. IMPACTOS DA NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE: PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- ELOY, J. O.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J. M. Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 101-109, 2015.
- ENSIGN, L. M.; CONE, R.; HANES, J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 557-570, 2012.
- ESPINOZA, J. L.; MATSUMOTO, A.; TANAKA, H.; MATSUMURA, I. Gastric microbiota: An emerging player in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancies. **Cancer Letters**, v. 414, p. 147-152, 2018.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, 2012.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. The perpetual challenge of infectious diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 5, p. 454-461, 2012.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, 1989.
- FIORENTINO, M.; DING, H.; BLANCHARD, T. G.; CZINN, S. J.; SZTEIN, M. B.; FASANO, A. *Helicobacter pylori*-Induced Disruption of Monolayer Permeability and Proinflammatory Cytokine Secretion in Polarized Human Gastric Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 3, p. 876-883, 2013.
- FOEGEDING, N. J.; RAGHUNATHAN, K.; CAMPBELL, A. M.; KIM, S. W.; LAU, K. S.; KENWORTHY, A. K.; COVER, T. L.; OHI, M. D. Intracellular degradation of *Helicobacter pylori* VacA toxin as a determinant of gastric epithelial cell viability. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 4, 2019.

- FRANCESCO, V.; IERARDI, E.; HASSAN, C.; ZULLO, A. *Helicobacter pylori* therapy: Present and future. **Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v.3, n. 4, p. 68-73, 2012.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428- 1439, 2004.
- GAUCHER, G.; DUFRESNE, M. H.; SANT, V. P.; KANG, N.; MAYSINGER, D.; LEROUX, J. C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 169-188, 2005.
- GLINMA, C.; KPOVIESSI, S. D.; GBAGUIDI, F. A.; KAPANDA, C. N.; BERO, J.; QUETIN-MANSOUROU, J.; MOUDACHIROU, M.; POUPAERT, J.; ACCROMBESSI, G. C.; CACHORRO, E. W.; BABA-MOUSA, L.; KOTCHONI, S. O. Trypanocidal and cytotoxic evaluation of synthesized thiosemicarbazones as potential drug leads against sleeping sickness. **Molecular Biology Reports**, v.41, p. 1617-1622, 2014.
- GLISONI, R. J.; CUESTAS, M. L.; MATHET, V. L.; OUTIÑA, J. R.; MOGLIONI, A., G.; SOSNIK, A. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 596-603, 2012.
- GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A.; CHILVERS, T.; PETERS, M.; COLLINS, M. D.; SLY, L.; McCONNELL, W.; HARPER, W. E. S. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. Respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 4, p. 397-405, 1989.
- GRABCHEV, I.; YORDANOVA, S.; BOSH, P.; VASILEVA-TONKOVA, E.; KUKEVA, R.; STOYANOV, S.; STOYANOVA, R. Structural characterization of 1,8-naphthalimides and in vitro microbiological activity of their Cu(II) and Zn(II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, 2016.
- GRILL, A. E.; JOHNSTON, N. W.; SADHUKHA, T.; PANYAM, J. A review of select recent patents on novel nanocarriers. **Recent Patents on Drug Delivery Formulation**, v. 3, n. 2, p. 137-142, 2009.
- GUIMARÃES, J.; CORVELO, T. C.; BARILE, K. A. *Helicobacter pylori*: FATORES RELACIONADOS À SUA PATOGÊNESE . **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 33-38, 2008.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.
- HATAKEYAMA, M. Malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases: Gastric Cancer and MALT Lymphoma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, n. 1149, p. 135-149, 2019.

- HATHROUBI, S.; SERVETAS, S. L.; WINDHAM, I.; MERRELL, D. S.; OTTEMANN, K. M. *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 2, 2018.
- HUANG, H. T.; WANG, H. M.; YANG, S. C.; TAI, W. C.; LIANG, C. M.; WU, K. L.; LEE, C. H.; CHUAH, S. K. Efficacy of a 14-day quadruple-therapy regimen for third-line *Helicobacter pylori* eradication. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2073-2080, 2018.
- HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. **Inorganic chemistry**: principles of structure and reactivity. 4th ed. New York: HarperCollins College Publishers, 1993.
- IGNASIAK, K.; MAXUELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 428, 2017.
- ISAB, A. A.; NAWAZ, S.; SALEEM, M.; ALTAF, M.; MONIM-UL-MEHBOOB, M.; AHMAD, S.; EVANS, H. S. Synthesis, characterization and antimicrobial studies of mixed ligand silver (I) complexes of thioureas and triphenylphosphine; crystal structure of $\{[Ag(PPh_3)(thiourea)(NO_3)]_2[Ag(PPh_3)(thiourea)]_2(NO_3)_2\}$. **Polyhedron**, v. 29, n. 4, p. 1251-1256, 2010.
- JACKOBSEN, V.; VIGANOR, L.; BLANCO-FERNÁNDEZ, A.; HOWE, O.; DEVEREUX, M.; MCKENZIE, C. J.; MCKEE, V. Tetrameric and polymeric silver complexes of the omeprazole scaffold; synthesis, structure, in vitro and in vivo antimicrobial activities and DNA Interaction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 186, p. 317-328, 2018.
- Jl, H.; SUN, H.; QU, X. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 176-189, 2016.
- JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 21, p. 990-993, 2008
- KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, ano VIII, n. 15, 2010.
- KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; KOUMO, C.; SHIMADA, N.; ISHIKAWA, M.; NOMIYA, K. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 4- and 6-coordinate nickel (II) complexes with three thiosemicarbazones and semicarbazone ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 84, p. 55-65, 2001.
- KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 598-613, 2018.
- KIRBY, B. J.; Jr HASSERBRINK, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, p. 187-202, 2004.
- KOSTENKO, V.; LYCZAK, J.; TURNER, K.; MARTINUZZI, R. J. Impact of Silver-Containing Wound Dressings on Bacterial Biofilm Viability and Susceptibility to Antibiotics

during Prolonged Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5120-5131, 2010.

KOVALA-DEMERTZI, D.; DEMERTZIZ, M. A.; MILLER, J. R.; PAPADOPOULOU, C.; DODOROU, C.; FILOUSIS, G. Platinum(II) complexes with 2-acetyl pyridine thiosemicarbazone Synthesis, crystal structure, spectral properties, antimicrobial and antitumour activity, **Journal of Inorganic Biochemistr**, v. 86, p. 555-563, 2001.

KRZYZEK, P.; BIERNAT, M. M.; GOŚCINIAK, G. Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 3, p. 273-281, 2018.

KUMAR, S.; DHIMAN, M. Inflammasome activation and regulation during *Helicobacter pylori* pathogenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 468-474, 2018.

LADEIRA, M. S. P.; SALVADORI, D. M. F.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratoria**, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LANGER, L. T. A.; STAUDT, K. J.; CARMO, R. L.; ALVES, I. A. Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2018.

LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, p. 767-783, 2007.

LEHOURS, P.; FERRERO, R. Review: *Helicobacter*: Inflammation, immunology, and vaccines. **Helicobacter**, v. 24, S.1, 2019.

LEITÃO, J. H.; SOUSA, S. A.; LEITE, S. A.; CARVALHO, M. F. N. N. Silver Camphor Imine Complexes: Novel Antibacterial Compounds from Old Medicines. **Antibiotics**, v. 7, n. 65, 2018.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. L. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371-384, 2013.

LI, M. X.; CHEN, C. L.; ZHANG, D.; NIU, J. Y.; JI, B. S. Mn(II), Co(II) and Zn(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: Synthesis, characterization, X-ray crystal structures and antitumor comparison. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3169-3177, 2010.

LI, P.; CHEN, X.; SHEN, Y.; LI, H.; ZOU, Y.; YUAN, G.; HU, P.; HU, H. Mucus penetration enhanced lipid polymer nanoparticles improve the eradication rate of *Helicobacter pylori* biofilm. **Journal of Controlled Release**, v. 300, p. 52-63, 2019.

LI, Y.; THAMBI, T.; LEE, D. S. Co-Delivery of Drugs and Genes Using Polymeric Nanoparticles for Synergistic Cancer Therapeutic Effects. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 1, 2018.

- LIANG, X.; LUAN, S.; YIN, Z.; HE, M.; HE, C.; YIN, L.; ZOU, Y.; YUAN, Z.; LI, L.; SONG, X.; LV, C.; ZHANG, W. Recent advances in the medical use of silver complex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 62-80, 2018.
- LOBANA, T. S.; SHARMA, R.; BAWA, G.; KHANNA, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 977-1055, 2009.
- MAINARDES, R. M.; URBAN, M. C. C.; CINTO, P. O.; CHAUD, M. V.; EVANGELISTA, R. C.; GREMIÃO, M. P. D. Liposomes and Micro/Nanoparticles as Colloidal Carriers for Nasal Drug Delivery. **Current Drug Delivery**, v. 3, n. 3, p. 275-285, 2006.
- MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L.; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. **Lancet**, v. 374, p. 1449-1461, 2009.
- MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; MORAIN, C. A.; GISBERT, J. P.; KUIPERS, E. J.; AXON, A. T.; BAZZOLI, F.; GASBARRINI, A.; ATHERTON, J.; GRAHAM, D. Y.; HUNT, R.; MOAYYEDI, P.; ROKKAS, T.; RUGGE, M.; SELGRAD, M.; SUERBAUM, S.; SUGANO, K.; EL-OMAR, E. M. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Intestino**, v. 66, n. 1, p. 6-30, 2017.
- MARCANO, R. G.J. V.; TOMINAGA, T. T.; KHALIL, N. M.; PEDROSO, L. S.; MAINARDES, R. M. Chitosan functionalized poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for amphotericin B delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 345-354, 2018.
- MARKWALTER, C. E.; PAGELS, R. F.; WILSON, B. K.; RISTROPH, K. D.; PRUD'HOMME, R. K. Flash NanoPrecipitation for the Encapsulation of Hydrophobic and Hydrophilic Compounds in Polymeric Nanoparticles. **Journal of Visualized Experiments**, v. 143, 2019.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.
- MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M.; LACHOWICZ, J. I.; CRISPONI, G.; ZORODDU, M. A. Noble Metals in Medicine: Latest Advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 284, p. 329–350, 2015.
- MEDINA, J. J. M.; NASO, L. G.; PÉREZ, A. L.; RIZZI, A.; OKULIK, N. B.; VALCARCEL, M. V.; SALADO, C.; FERRER, E. G.; WILLIAMS, P. A. M. Synthesis, characterization, theoretical studies and biological (antioxidant, anticancer, toxicity and neuroprotective) determinations of a copper(II) complex with 5-hydroxytryptophan. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 414-426, 2019.
- MIESSLER, G. L.; TARR, D. A. **Inorganic Chemister**. 4 Th. ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education, 2011.

- MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to *in vitro* studies. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 24-33, 2015.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.
- MOINARD-CHÉCOT, D.; CHEVALIER, Y.; BRIANÇON, S.; BENEY, L.; FESSI, H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, n. 2, p. 458-468, 2008.
- MONTEMAYOR, J. C. G.; BOFARULL, A. M.; MOCHALES, F. B. Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. **Revista Española de Salud Pública**, v. 88, p. 829-837, 2014.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.
- MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA, A. D. T.; GOMES, P. A. T.; SIMONE, C. A.; VILLELA, F. S.; CASTRO, M. C. A.; PEREIRA, V. R. A.; LEITE, A. C. L. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.
- MOUBRI, M.; KALACH, N.; LARRAS, R.; BERRAH, H.; MOUFFOK, F.; GUECHI, Z.; CADRANEL, S. Adapted first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection in Algerian children. **Annals of Gastroenterology**, v. 32, p. 60-66, 2019.
- MOVAHEDI, E.; REZVANI, A. R.; RAZMAZMA, H. Binding interaction of a heteroleptic silver(I) complex with DNA: A joint experimental and computational study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 1244-1254, 2019.
- MULLER, Claudia Regina et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.
- NAGAVARMA, B. V. N.; HEMANT, K. S. Y.; AYAZ, A.; VASUDHA, L. S.; SHIVAKUMAR, H. G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, n. 3, p. 16-23, 2012.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- OLEKHNOVICH, E. I.; MANOLOV, A. I.; SAMOILOW, A. E.; PRINICHNIKOV, N. A.; MALAKHOVA, M. V.; TYAKHT, A. V.; PAVLENKO, A. V.; BABENKO, O. E.; SAFINA,

- D. D.; BOULYKHAKOV, S. R.; ABDULKHAKOV, R. A.; GRIGORTEVA, T. V.; KOSTRYUKOVA, E. S.; GOVORUN, V. M.; LLINA, E. N. Shifts in the Human Gut Microbiota Structure Caused by Quadruple *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v.10, 2019.
- OLIVEIRA, C. L.; VEIGA, F.; VARELA, C.; ROLEIRA, F.; TAVARES, E.; SILVEIRA, I.; RIBEIRO, A. J. Caracterização de nanopartículas poliméricas para administração intravenosa: Foco na estabilidade. **Colóides e superfícies B: biointerfaces**, v. 150, p. 326-333, 2017.
- OLIVEIRA, J. S.; SOUSA, E. H. S.; SOUZA, O. N.; MOREIRA, I. S.; SANTOS, D. S.; BASSO, L. A. Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 19, p. 2409-2424, 2006.
- OPAS – **Organização Pan-Americana da Saúde**. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. 2017.
- ORME, I. et al. Search for new drugs for treatment of tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001.
- PARISI, O. I.; SCRIVANO, L.; SINICROPI, M. S.; PUOCI, F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 36, p. 72-77, 2017.
- PATHAK, A.; BLAIR, V. L.; FERREO, R. L.; KEDZIERSKI, L.; ANDREWS, P. C. Structural influences on the activity of bismuth (III) indole-carboxylato complexes towards *Helicobacter pylori* and Leishmania. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 177, p. 266-275, 2017.
- PAVAN, F. R.; MAIA, P. I. S.; LEITE, S. R. A.; DEFLON, V. M.; BATISTA, A. A.; SATO, D. N.; FRANZBLAU, S. G.; LEITE, C. Q. F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti- *Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1898-1905, 2010.
- PEEK, R. M.; FISKE, C.; WILSON, K. T. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 831-858, 2010.
- PENNER, J. L. The Genus *Campylobacter*: a Decade of Progress. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n. 2, p. 157-172, 1988.
- PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial Resistance to Silver in Wound Care. **Journal of Hospital Infection**, v. 60, n. 1, p. 1–7, 2005.
- PÉRICO, L. L.; HEREDIA-VIEIRA, S. C.; BESERRA, F. P.; SANTOS, R. C.; WEISS, M. B.; RESENDE, F. A.; RAMOS, M. A. S.; BONIFÁCIO, B. V.; BAUAB, T. M.; VARANDA, E. A.; DE GOBBI, J. I. F.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? Na integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 312-324, 2015.

- PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY Jr, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.
- PROCTOR, M. J.; DEANS, C. Complications of peptic ulcers. **Oesophagus and stomach**, v. 32, n. 11, p. 599-607, 2014.
- RAMOS, M. A. S.; SILVA, P. B.; SPÓSITO, L.; TOLEDO, L. G.; BONIFÁCIO, B. V.; RODERO, C. F.; SANTOS, K. C.; CHORILLI, M.; BAUAB, T. M. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1179-1213, 2018.
- REN, Y.; WANG, C.; CHEN, Z.; ALLAN, E.; van der MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, p. 259-272, 2018.
- REUL, L. T. A.; CARVALHO, L. H.; CANEDO, E. L. Características Reológicas e Térmicas de Compósitos Policaprolactona/Babaçu. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, n. 3, p. 174-182, 2017.
- ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; PEREIRA-MAIA, E. C. COORDENAÇÃO DE METAIS A ANTIBIÓTICOS COMO UMA ESTRATÉGIA DE COMBATE À RESISTÊNCIA BACTERIANA. **Química Nova**, v 34, n. 1, p. 111-118, 2011.
- RODRIGUEZ- ARGUELLES, M. C.; LÓPEZ-SILVA, E. C.; SANMARTÍN, J.; PELAGATTI, P.; ZANI, F. Copper complexes of imidazole-2-, pyrrole-2- and indol-3-carbaldehyde thiosemicarbazones: Inhibitory activity against fungi and bacteria. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 11, p. 2231-2239, 2005.
- ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.
- SAFAROV, T.; KIRAN, B.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. M.; ABAMOR, E. S. An overview of nanotechnology-based treatment approaches against *Helicobacter pylori*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, p. 1-12, 2019.
- SALAR, A. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. **Medicina Clinica, (Barc)**, v. 152, n. 2, p. 65-71, 2019.
- SALINA, E. G.; EKINS, S.; MAKAROV, V. A. A rapid method for estimation of the efficacy of potential antimicrobials in humans and animals by agar diffusion assay. **Chemical Biology & Drug Design**, 2018.
- SANTOS, A. F.; FERREIRA, I. P.; PINHEIRO, C. B.; SANTOS, V. G.; LOPES, M. T. P.; TEIXEIRA, L. R.; ROCHA, W. R.; RODRIGUES, G. L. S.; BERALDO, H. [Ag(L)NO 3] Complexes with 2-Benzoylpyridine-Derived Hydrazones:Cytotoxic Activity and Interaction with Biomolecules. **ACS Omega**, v. 3, p. 7027-7035, 2018.

- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.” **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DE LUCCA FREITAS, L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacutica Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.
- SHAHBAZI, S.; SHARIATPANAH, Z. V. Comparison between daily single-dose triple therapy and conventional triple therapy on patient compliance and *Helicobacter pylori* eradication: A randomized controlled trial. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 37, n. 6, p. 550-554, 2019.
- SHEN, J.; JIN, B.; QI, Y. C.; JIANG, Q. Y.; GAO, X. F. Carboxylated chitosan/silver-hydroxyapatite hybrid microspheres with improved antibacterial activity and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 589-597, 2017.
- SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.
- SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 341-353, 2003.
- SILVER, S.; PHUNG, L. T.; SILVER, G. Silver as Biocides in Burn and Wound Dressings and Bacterial Resistance to Silver Compounds. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 627-634, 2006.
- SIM, W.; BARNARD, R. T.; BLASKOVICH, M. A. T.; ZIORA, Z. M. Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017). **Antibiotics**, v. 7, n. 4, 2018.
- SING, R. B.; GARG, B. S.; SINGH, R. P. Analytical applications of thiosemicarbazones and semicarbazones: A review. **Talanta**, v. 25, p. 619-632, 1978.
- SOLIMAN, S. M.; ELSILK, S. E. Synthesis, X-ray structure, DFT and antimicrobial studies of Ag(I) complexes with nicotinic acid derivatives. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 187, p. 48-53, 2018.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros – Parte I. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 96-100, 2012.
- SOUZA, G. D.; RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 14-16, 2013.
- SPÓSITO, L.; ODA, F. B.; VIEIRA, J. H.; CARVALHO, F. A.; RAMOS, M. A. S.; CASTRO, R. C.; CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; SANTOS, A. G.; SILVA, P. B.; CHORILLI, M.;

- BAUAB, T. M. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of Casearia sylvestris leaf Derivatives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, 2019.
- SRIKANTA, B. M.; SATHISHA, U. V.; DHARMESH, S. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E 2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie**, v. 92, p. 194-203, 2010.
- SUGIYAMA, N.; MIYAKE, S.; LIN, M. H.; WAKABAYASHI, M.; MARUSAWA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, M.; ISHIHAMA, Y. Comparative proteomics of *Helicobacter pylori* strains reveals geographical features rather than genomic variations. **Genes Cells**, v. 24, p. 139-150, 2019.
- SULLIVAN, M.; KIA, A. F. A.; LONG, M.; WALSH, M.; KAVANAGH, K.; MCCLEAN, S.; CREAVEN, B. S. Isolation and characterisation of silver (I) complexes of substituted coumarin-4-carboxylates which are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Polyhedron**, v. 67, p. 549-559, 2014.
- SUZUKI, H.; MOAYYEDI, P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 168-174, 2013.
- TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. **Environmental Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2008.
- TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.
- THORSEN, K.; SØREIDE, J. A.; KVALØY, J. T.; GLOMSAKER, T.; SØREIDE, K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender adjusted analysis of incidence and mortality. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 347-354, 2013.
- TOWNSEND, P. A.; GRAYSON, M. N. Density Functional Theory Transition-State Modeling for the Prediction of Ames Mutagenicity in 1,4 Michael Acceptors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, p. 5099-5103, 2019.
- TROIANO, G.; NOLAN, J.; PARSONS, D.; HOVEN, C. V. G.; ZALE, S. A Quality by Design Approach to Developing and Manufacturing Polymeric Nanoparticle Drug Products. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 18, n. 6, p. 1354-1365, 2016.
- TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.
- URREJOLA, M. C.; SOTO, L. V.; ZUMARÁN, C. C.; PEÑALOZA, J. P.; ÁLVAREZ, B.; FUETEVILLA, I.; HAIDAR, Z. S. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). **International Journal of Morphology**, v. 36, n. 4, p. 1471-1471, 2018.
- van der MEE-MARQUET, N. L.; BÉNÉJAT, L.; DIENE, S. M.; LEMAIGNEN, A.; GAIA, N.; SMET, A.; HAESEBROUCK, F.; CHERKAoui, A.; DUCOURNAU, A.; LACOMME,

S.; GONTIER, E.; BERNARD, L.; MÉGRAUD, F.; GOUDEAU, A.; LEHOURS, P.; FRANÇOIS, P. A Potential New Human Pathogen Belonging to *Helicobacter* Genus, **Identified in a Bloodstream Infection**, v. 8, 2017.

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, 2015.

VENUGOPAL, J. R.; PRABHAKARAN, M. P.; LOW, S.; CHOON, A. T.; DEEPIKA, G.; DEV, V. R.; RAMAKRISHNA, S. Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. **Current Pharmaceutical Design, Bentham Science**, v. 15, n. 15, p. 1799-1808, 2009.

VIMBELA, G. V.; NGO, S. M.; FRAZE, C.; YANG, L.; STOUT, D. A. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3941-3965, 2017.

WARREN, J. R.; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **The Lancet**, v. 321, p. 1273-1275, 1983.

WESSLER, S.; KRISCH, L. M.; ELMER, D. P. ABERGER, F. From inflammation to gastric cancer – the importance of Hedgehog/GLI signaling in *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases. **Cell Communication and Signaling**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infectious diseases**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesso em: 06 out. 2013.

WOZNICZKA, M.; ŚWIĄTEK, M.; PAJAK, M.; SOBCZYŃSKA, J. G.; CHMIELA, M.; GONCIARZ, W.; LISIECKI, P.; PASTERNAK, B.; KUFELNICK, A. Complexes in aqueous cobalto (II)-2-picolinehydroxamic acid system: Formation equilibria, DNA-binding ability, antimicrobial and cytotoxic properties. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 187, p. 62-72, 2018.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B.; LI, L.; DENG, Y. Crystal Violet and XTT Assays on Staphylococcus aureus Biofilm Quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016.

YU, Y.; KALINOWSKI, D. S.; KOVACEVIC, Z.; SIAFAKAS, A. R.; JASSON, P. J.; STEFANI, C.; LOVEJOY, D. B.; SHARPE, P. C.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators That Are More Than Just Ribonucleotide Reductase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5271-5294, 2009.

ZAGARI, R. M.; RABITTI, S.; EUSEBI, L. H.; BAZZOLI, F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: A clinical practice update. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 1, 2018.

ZELENKOVÁ, T.; ONNAINTY, R.; GRANERO, G. E.; BARRESI, A. A.; FISSORE, D. Use of microreactors and freeze-drying in the manufacturing process of chitosan coated PCL nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 119, p. 135-146, 2018.

ZHOU, Y. J.; LIU, M. S.; OSAMAH, A. R.; KONG, X. L.; ALSAM, S.; BATTAH, S.; XIE, Y. Y.; HIDER, R. C.; ZHOU, T. Hexadentate 3-hydroxypyridin-4-ones with high iron(III) affinity: Design, synthesis and inhibition on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 94, p. 8-21, 2015.