



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SINVASTATINA
COMBINADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Londrina
2016

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SINVASTATINA
COMBINADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Defesa da dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pelegrin Figueiredo, Erica.

Atividade antibacteriana de sinvastatina combinada com nanopartículas de prata / Erica Pelegrin Figueiredo. - Londrina, 2016.

48 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

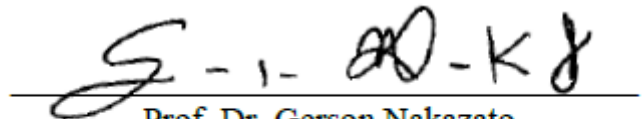
1. Antibacteriano - Teses. 2. Nanopartículas metálicas - Teses. 3. Estatinas - Teses. 4. Sinergismo - Teses. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE SINVASTATINA COMBINADA
COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Defesa da dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gerson Nakazato
Orientador
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Audrey Stinghen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pelo dom da vida e por colocar pessoas e oportunidades tão maravilhosas em minha vida.

Aos meus pais, por não só apoiarem minhas decisões, trilharem o caminho comigo.

Aos meus irmãos, por todo companheirismo.

Aos meus avós, por toda torcida, cuidado e preocupação de sempre.

Às minhas amigas, por toda descontração e todos os momentos de divertimento que foram muito importantes nessa caminhada.

Ao meu namorado, por estar sempre ao meu lado, me ouvindo, dando forças e cuidado de mim.

Ao meu orientador Gerson Nakazato, pai do laboratório, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório e por toda confiança depositada. Seu pensamento ativo e sua disposição em ajudar me incentivaram a pensar sempre à frente e a buscar o meu objetivo, não só na área acadêmica, como também na área pessoal. Todo o ensinamento foi fundamental para a obtenção desse título!

À professora Renata Katsuko Takayama Kobayashi, mãe do NIP3. Sempre preocupada com tudo e com todos, sempre ajudando e aconselhando no que fosse necessário. Sua calma e persistência, muitas vezes, me acalmou e me fez persistir também!

Aos professores Admilton Gonçalves Oliveira Junior, Luciano Aparecido Panagio e Audrey Stingham Garcia Lonni, por tantos ensinamentos e contribuições ao longo das bancas e do mestrado.

Ao meu amigo Jhonatan Macedo Ribeiro, por toda ajuda, ensinamento e parceria. Você foi peça chave para a execução da minha dissertação. Sua curiosidade e seu pensamento crítico me incentivaram a buscar cada vez mais. Muito obrigada!

Ao meu amigo Erick Kenji Nishio por toda paciência e tantos ensinamentos e ajudas...não teria conseguido sem isso!

À minha amiga Sara Scandorieiro por tantas conversas e trocas de informações...foram muito valiosas e fundamentais. Muitas vezes ver suas conquistas me incentivava a continuar e vencer. Obrigada pela parceria!

Aos meus amigos do NIP3 por me acolherem tão bem, por todo companheirismo, alegria e por me ensinarem tudo o que sei. Em especial Viviane Ferreira Cardozo e Giovana Carolina Bodnar, por toda troca de experiência e ajuda quando precisei. O NIP3, sem dúvida, é o melhor laboratório do mundo!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa. Esse apoio me proporcionou dedicação exclusiva ao mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio ao projeto e por proporcionar incentivo ao desenvolvimento a pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em microbiologia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de conhecer incríveis profissionais que muito contribuíram para minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina por me acolher, fornece espaço e a oportunidade de crescer profissionalmente e como pessoa.

Se estou defendendo meu mestrado, foi porque tive pessoas maravilhosas trilhando esse caminho junto a mim. A todos, meu muito obrigada!!

“Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

FIGUEIREDO, Érica Pelegrin. **Atividade antibacteriana de sinvastatina combinada com nanopartículas de prata.** 2016. 48 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

RESUMO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na agricultura, na veterinária e clínica médica e, devido a essa intensa e indevida utilização, tem ocorrido o aumento do número de bactérias resistentes a esses medicamentos. Dessa forma, novos fármacos são necessários. As estatinas são conhecidas por seu efeito antihiperlipidêmico, e alguns estudos têm demonstrado que esse grupo de fármacos também possui atividade antibacteriana. Neste estudo, avaliou-se a atividade antibacteriana da combinação de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por *Fusarium oxysporum*, com a sinvastatina, contra a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A sinvastatina mostrou um efeito antibacteriano contra cepas de *S. aureus*, incluindo cepa meticilina resistente (MRSA), com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 62,5 a 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O ensaio do Checkerboard e curvas de crescimento e morte mostraram um efeito sinérgico da combinação, com a eliminação total de MRSA N315 após 10 h de incubação, e redução de 75% nas CIM de ambos compostos. As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram uma formação de protruções na superfície da MRSA N315 após o tratamento com AgNPs e formação de uma grande massa amorfa após o tratamento com sinvastatina, bem como ambas as características com a combinação dos dois compostos. Nossos resultados indicam que a combinação de sinvastatina e AgNPs é uma alternativa no controle de infecções, incluindo MRSA. Além disso, esta associação apresenta potencial para aplicação em produtos farmacêuticos e hospitalares.

Palavras-chave: Antibacteriano. Nanopartículas metálicas. Estatina. Cepas multirresistentes. Sinergismo.

FIGUEIREDO, Érica Pelegrin. **Antibacterial activity of simvastatin combined with silver nanoparticles.** 2016. 48 p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

ABSTRACT

Antimicrobials are widely used in agricultural, medical and veterinary field and due to this intense and misuse has occurred to increase the number of bacteria resistant to these drugs. Thus, new drugs are needed. Statins are known for their antihyperlipidêmico effect, and some studies have shown that this group of drugs also has antibacterial activity. In this study, we evaluated the antibacterial activity of the combination of silver nanoparticles (AgNPs) produced by *Fusarium oxysporum*, with simvastatin, against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Simvastatin showed an antibacterial effect against strains of *S. aureus*, including strains methicillin resistant (MRSA), as Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranging from 62.5 to 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The Checkerboard assay and growth, and death curves showed a synergistic effect in combination with the total elimination of MRSA N315 after 10 h incubation and a 75% reduction in the MIC of both compounds. The images from scanning electron microscopy showed protrusions formation on the surface of MRSA N315 after treatment with AgNPs and formation of a large amorphous mass after treatment with simvastatin and both characteristics with the combination of the two compounds. Our results indicate that the combination of simvastatin and AgNPs is an alternative in the control of infections, including MRSA. Furthermore, this combination has the potential for application in pharmaceutical and medical products.

Keywords: Antibacterial. Metallic nanoparticles. Statin. Multidrug-resistant strains. Synergism.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da atividade antibacteriana dos compostos	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da molécula da sinvastatina.....	13
Figura 2: Resultado da curva de crescimento e morte para <i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente (MRSA) N315.....	35
Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de MRSA N315.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartícula de prata
ATCC	do inglês “American Type Culture Colecction”
CIFI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LytA	Enzima autolítica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHA	Ágar Muller-Hinton
MHC	Caldo Muller-Hinton
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MSSA	<i>S. aureus</i> meticilina sensível
NCCLS	do inglês “National Committee Clinical Laboratory Standards”
NP	Nanopartícula
OsO ₄	Tetróxido de Ósmio
PBS	do inglês “Phosphate buffered saline”
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
SP	São Paulo
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRE	<i>Enterococcus vancomicina</i> resistente
VSE	<i>Enterococcus vancomicina</i> sensível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 Infecções e resistência bacteriana.....	9
2.2 Estatinas.....	12
2.3 Sinvastatina.....	13
2.4 Nanotecnologia.....	14
2.5 Nanopartícula de prata (AgNPs).....	14
2.6 Interação de AgNPs e estatinas com outros compostos.....	14
3. OBJETIVO.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
7. CONCLUSÃO.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos estão entre os compostos mais frequentemente prescritos, e a intensa e frequente utilização favorece a pressão seletiva aumentando o número de cepas resistentes e, conseqüentemente, infecções mais graves (BEOVIĆ, 2006; OLIVEIRA; MUNARETTO, 2010). O uso inadequado de antimicrobianos pode comprometer a resposta clínica do paciente, aumentar custos com internação e contribuir para o aumento da resistência bacteriana (MOTA *et al.*, 2010). A efetividade e disponibilidade de antimicrobianos estão ameaçadas pelo aumento dos microrganismos multirresistentes. Tal problema afeta a comunidade e o governo, com maiores custos de tratamento, e maior tempo de internação dos pacientes (HOEFLER *et al.*, 2006).

Esse fato tem gerado grandes preocupações, pois além de diversas espécies bacterianas se tornarem resistentes, mecanismos de resistência e transferência de genes de resistência agravam o problema (MARTINS, 2006).

Por esses motivos, há a necessidade da busca por novos antimicrobianos. Além da descoberta de novas drogas, a combinação de drogas antimicrobianas pode ser superior ao efeito de ambas substâncias isoladas, sendo uma nova opção para o controle de infecções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecções e resistência bacteriana

Em um ambiente hospitalar, os medicamentos são as principais intervenções terapêuticas para o tratamento dos pacientes. Dentre os grupos mais prescritos estão os antimicrobianos (GURGEL; CARVALHO, 2008). Desde as primeiras utilizações dos antimicrobianos, houve relatos de resistência bacteriana frente a eles e, atualmente, essa resistência bacteriana é complexa, e ocorre em diversas bactérias de importância médica (GURGEL; CARVALHO, 2008; MEVIUS; SPRENGER; WEGENER, 1999). A disseminação da resistência microbiana, afeta não somente a área médica, como também a área veterinária e a agrônômica (SFACIOTTE; VIGNOTO; WOSIACKI, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é conhecida mundialmente, e este problema gera conseqüências como: aumento do custo e do tempo de tratamento, utilização de medicamentos de alto custo, aumento do tempo de hospitalização, isolamento do paciente em tratamento, aumento da gravidade e da frequência das infecções, maior mortalidade causada por infecções. Quatro fatores contribuem para isso: prescrição arbitrária de antimicrobianos; uso abusivo e inadequado desses fármacos; transmissão de microrganismos resistentes de um ambiente ao outro, através de viajantes infectados (globalização) e a falta de sistemas de vigilância epidemiológica para os microrganismos multirresistentes (GURGEL; CARVALHO, 2008).

Os países da América Latina em geral, quando comparados aos Estados Unidos e Europa, apresentam mais casos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, principalmente por bacilos Gram-negativos não fermentadores, enterobactérias produtoras de ESBL e bactérias Gram-positivas, incluindo MRSA (REINERT *et al.*, 2007; ROSSI, 2011).

Os beta-lactâmicos foram os primeiros antibacterianos a serem inseridos na prática clínica. A penicilina foi a primeira droga inserida no mercado e, após casos de resistência em *S. aureus*, iniciou-se o uso da meticilina e oxacilina, penicilinas semissintética, específicas para o tratamento de infecções por estafilococos

produtores de beta-lactamases. Com a introdução dessas drogas, várias epidemias causadas por diferentes clones de MRSA ocorreram em diferentes regiões geográficas, sendo esse, um importante patógeno em todo mundo (LOWY, 1998). Com o aumento dos casos de MRSA, a prescrição da vancomicina foi e tem sido frequente. A primeira resistência à vancomicina foi descoberta em *Enterococcus faecium*, na França (LECLERG *et al.*, 1987). Posteriormente, foi encontrada essa resistência em *Enterococcus faecalis* e também em *S. aureus* (CHANG *et al.*, 2003; SOMERVILLE *et al.*, 2002). Outro importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos é a produção de ESBL por enterobactérias. As infecções causadas por bactérias produtoras dessa enzima oferecem um grande desafio à terapia antibacteriana, pois as ESBL inativam as penicilinas, cefalosporinas (de todas as gerações) e monobactâmicos, restringindo as opções de tratamento (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010).

Outra fator envolvido na resistência é a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, a KPC. Essa enzima confere resistência aos carbapenêmicos, além de inativar as penicilinas, cefalosporinas e os monobactâmicos. A enzima KPC é um importante mecanismo de resistência no ambiente hospitalar, e seu diagnóstico é importante no controle de sua disseminação, e redução da mortalidade relacionada às infecções por essas bactérias (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

2.2 Estatinas

Em meados de 1971, foi descoberto que culturas do fungo *Penicillium citrinum* produziam um potente inibidor da síntese de colesterol. Tal substância é utilizada por certos microrganismos como defesa contra outros que necessitam de esteróis e isoprenoides para seu metabolismo, já que promove uma enorme disfunção metabólica, levando o microrganismo à morte (CONCEI *et al.*, 2008).

O fungo *P. citrinum* produz um potente composto inibidor da enzima HMG-CoA redutase e após vários estudos, a estrutura da primeira estatina, a mevastatina (ou compactina), foi descrita (ENDO, 1992). Em 1987 foi descoberta a lovastatina, isolada de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* (GINTER; SIMKO, 2009; LEIRIA; CARVALHO, 2007). Além da mevastatina e da lovastatina, foram desenvolvidas a fluvastatina, a pravastatina e a sinvastatina (GINTER; SIMKO, 2009). Houve introdução de novos derivados sintéticos na indústria farmacêutica, em 1996 e 1997, sendo elas a atorvastatina e a cerivastatina. Essa última foi retirada do mercado em 2001 após incidência de casos de rabdomiólise (LEIRIA; CARVALHO, 2007) e em 2003, a rosuvastatina foi introduzida no mercado (GINTER; SIMKO, 2009).

As estatinas são conhecidas por sua ação na diminuição da síntese dos lipídeos, através da inibição da enzima HMG-CoA redutase, enzima essa que é limitante na síntese do colesterol pela via do mevalonato, via responsável pela conversão do HMG-CoA em mevalonato (ENDO; KURODA; TANZAWA, 1976). Além disso, as estatinas apresentam também efeitos pleiotrópicos, atuando benéficamente para outros tratamentos: apresentam melhora na função endotelial, modulação nas respostas inflamatórias (JAIN; RIDKER, 2005; BERESWILL *et al.*, 2010; LEUNG *et al.*, 2003), efeito antioxidantes, prevenção da formação de trombos e propriedades anticarcinogênicas (KARP *et al.*, 2008; KOCHUPARAMBIL *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2008).

Além desses efeitos descritos, em 2007, foi descrita a atividade antibacteriana da classe das estatinas. Antibióticos tradicionais, como a penicilina, são produtos fúngicos, e por esse fato Jerwood e Cohen resolveram investigar a ação das estatinas, também produto fúngico (JERWOOD; COHEN, 2008).

2.3 Sinvastatina

A sinvastatina (Figura 1) é conhecida tanto por sua atividade antihiperlipidêmica, como também, por seus efeitos pleiotrópicos. Tais efeitos estão relacionados à ação anticâncer (KOCHUPARAMBIL *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2008), anti-inflamatória (BERESWILL *et al.*, 2010; LEUNG *et al.*, 2003), antibacteriana (BERGMAN *et al.*, 2011; JERWOOD; COHEN, 2008; MASADEH *et al.*, 2012), entre outras.

A atividade antibacteriana de sinvastatina foi descrita pela primeira vez frente a MRSA, MSSA, VRE e VSE (JERWOOD; COHEN, 2008). Posteriormente, também apresentou efeito contra bactérias que causam infecção no trato respiratório, tais como: *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis*, porém não apresentou ação contra *Haemophilus influenzae* (BERGMAN *et al.*, 2011). Essa estatina também apresentou atividade frente a diversas cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (MASADEH *et al.*, 2012) e também reduziu significativamente a formação de biofilme em *S. aureus* (GRAZIANO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação da sinvastatina ainda está sob estudo. Sabe-se que o efeito antibacteriano é independente da enzima HMG-CoA redutase já que essa enzima possui uma classe estrutural diferente nos procaríotos e eucariotos. Por esse fato, a afinidade desta enzima bacteriana com as estatinas é 10.000 vezes menor do que com estas enzimas dos eucariotos (FRIESEN; RODWELL, 2004). O mecanismo de ação sugerido está relacionado a propriedade hidrofóbica da sinvastatina, que leva a desestabilização da membrana bacteriana, semelhante a um sabão, levando a morte celular. Outro possível mecanismo de ação é que essa característica hidrofóbica é responsável pelo aumento da LytA, levando a degradação do peptídeo glicano e indução da autólise em pneumococos (BERGMAN *et al.*, 2011).

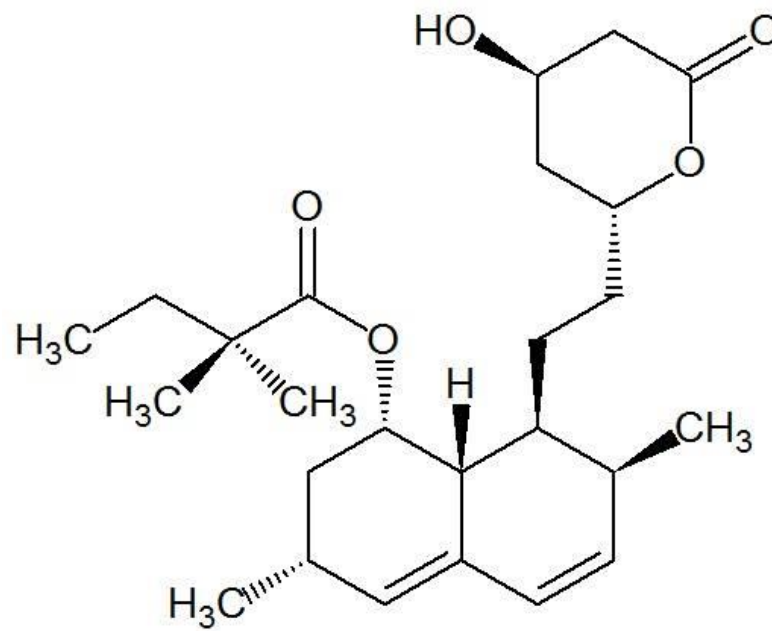


Figura 1: Estrutura química da sinvastatina.

2.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais cresce e se desenvolve nos últimos anos. Essa ciência envolve processos materiais e produtos na escala nanométrica (CHEN; SCHLUESENER, 2008) oferecendo oportunidade para alterar o tamanho dos compostos, e reexplorar a atividade biológica das substâncias já conhecidas (LARA *et al.*, 2010).

A transição de micropartícula para NP envolve o aumento da área de superfície e mudanças nas propriedades. A ação antibacteriana dos metais depende da sua superfície de contato: uma área de superfície maior das NP permite uma gama de interações com moléculas orgânicas e inorgânicas (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008).

As NPs são usadas na medicina para diversos fins, como na terapia e diagnóstico para o tratamento de câncer, diabetes, asma e alergia (ALKALADI; ABDELAZIM; AFIFI, 2014; HALEY; FRENKEL, 2008; KENYON *et al.*, 2013). Também possuem atividade antimicrobiana contra várias cepas de bactérias, fungos

e vírus, mesmo aqueles resistentes a antibióticos (ELECHIGUERRA *et al.*, 2005; JAIN; RIDKER, 2005; KIM *et al.*, 2008; MIRZAJANI *et al.*, 2011).

As NPs podem ser sintetizadas utilizando inúmeros métodos físicos e químicos, bem como extratos de plantas e microrganismos, que possuem capacidade de reduzir íons metálicos para formar as NPs. A síntese utilizando materiais ecologicamente corretos, como extratos de folhas de planta, bactérias e fungos, ganhou enorme popularidade. Esse método de síntese avança sobre os métodos físicos e químicos, pois não utiliza produtos químicos tóxicos, e a síntese é em larga escala (SALAM *et al.*, 2012).

NP tem sido aplicada em determinados materiais e com diferentes aplicações. Esses nanomateriais têm sido incorporados em diversos produtos comerciais na área médica, por possuírem atividade antibacteriana (CHEN; SCHLUESENER, 2008).

2.5 Nanopartícula de prata (AgNPs)

Os metais têm sido utilizados durante séculos como agente bactericida ou bacteriostático. Metais como prata, ouro, cobre e zinco apresentam diferentes propriedades e espectro de ação (GRUMEZESCU *et al.*, 2010; KOWSHIK *et al.*, 2002).

A prata é conhecida há tempos por sua propriedade antimicrobiana, mas as aplicações médicas decresceram com o desenvolvimento dos antimicrobianos tradicionais (LARA *et al.*, 2010). Esse metal é utilizado há milhares de anos em diversas aplicações, como joias, utensílios, moedas, fotografia, explosivos, entre outras. Dentre os usos da prata, são bastante explorados aqueles que utilizam sua ação desinfetante, para fins de higiene e medicinais. É utilizada, também, em diferentes campos da medicina, como na cicatrização de feridas ou impregnada em materiais (CHEN; SCHLUESENER, 2008).

O efeito antimicrobiano das AgNPs está ligado a soma de diversos mecanismos. Vários estudos sugerem que íons de prata interagem com grupos sulfidrilas das proteínas (LIAU *et al.*, 1997; FENG *et al.*, 2000), sendo essencial para

inativação bacteriana. Além disso, os íons de prata têm sido descrito por desacoplar a cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, inibindo enzimas da cadeia respiratória ou interferindo com a permeabilidade da membrana (FENG *et al.*, 2000).

Um estudo mostrou que o mecanismo de ação das AgNPs está relacionada a geração de radicais livres (HUSSAIN *et al.*, 2006). Os íons de prata possuem efeito antimicrobiano conhecido e outras formas de prata também tem se mostrado efetiva, contra infecções em recém nascidos, osteomielite severa crônica, infecção do trato urinário e infecção relacionada a cateter venoso central (WHITE; COOPER; KINGSLEY, 2001). Por esse fato muitos materiais antimicrobianos a base de prata, estão sendo desenvolvidos e alguns já estão disponíveis (KIM *et al.*, 2007).

A ação antimicrobiana das NPs depende da nanopartícula, método de preparação, tamanho e formato das NPs e capacidade de inibir o crescimento de várias cepas microbianas, ainda que sejam antibiótico-resistentes (HERMAN; HERMAN, 2014).

As AgNPs são vantajosas quando comparadas a íons de prata devido ao seu tamanho, o que, por sua vez, melhora a capacidade de reagir com várias moléculas, onde uma grande proporção de átomos estão em contato imediato com a ambientação e prontamente disponíveis para a reação (MORONES *et al.*, 2005; LOK *et al.*, 2006).

Essas nanopartículas podem ser sintetizadas por diversos microrganismos e a variação desse microrganismo pode modificar o tamanho e o formato das NPs, alterando conseqüentemente a atividade (HERMAN; HERMAN, 2014). As AgNPs sintetizadas por *Aspergillus niger* inibem eficientemente vários patógenos, incluindo bactérias e fungos. Essas nanopartículas apresentaram ação contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (SAGAR; ASHOK, 2012). O fungo *Fusarium oxysporum* apresenta capacidade de biossintetizar AgNPs (DURÁN *et al.*, 2005). Estudos utilizando AgNPs sintetizada por esse fungo mostraram atividade antibacteriana frente a *Streptococcus agalactiae* (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015) e frente a MRSA (CARDOZO *et al.*, 2013).

A interação tamanho-dependente das AgNPs frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi relatada (MORONES *et al.*, 2005). As AgNPs com o diâmetro pequeno possuem uma melhor propriedade antimicrobiana do que as AgNPs com diâmetros maiores (PANACEK *et al.*, 2006).

Foi descrito também a atividade formato-dependente. Um estudo comparou a atividade antimicrobiana de diversos formatos de AgNPs contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os nanocubos e as nanoesferas foram efetivas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enquanto os nanoprismas mostraram baixa atividade frente a bactérias Gram-positivas (LI *et al.*, 2010). A nanopartícula triangular apresentou retardo no crescimento de *E. coli* (PAL *et al.*, 2015).

Estudos mostraram efeito antibacteriano das AgNPs contra diversas cepas de bactérias multirresistentes como *E. coli* resistente à ampicilina, *P. aeruginosa* multirresistente, *Streptococcus pyogenes* resistente à eritromicina e MRSA N315 (LARA *et al.*, 2010; CARDOZO *et al.*, 2013). As AgNPs também mostraram atividade antibacteriana contra *S. mutans* (HERNÁNDEZ-SIERRA *et al.*, 2008) e *S. agalactiae* (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015)

As AgNPs também apresentaram atividade antifúngica. Em um estudo a atividade frente a isolados clínicos e cepas ATCC de *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida sp* foi descrita. (KIM *et al.*, 2008). E as AgNPs também apresentaram atividade antiviral frente ao vírus HIV-I (ELECHIGUERRA *et al.*, 2005).

2.6 Interação de AgNPs e estatinas com outros compostos

A combinação de determinados compostos com outros antimicrobianos é uma opção promissora para o controle de microrganismo multirresistentes. Tal combinação resulta em um efeito antimicrobiano mais potente quando utilizados isoladamente (HERMAN; HERMAN, 2014).

A combinação de diferentes antimicrobianos convencionais com AgNPs foi investigada contra algumas bactérias, como *S. aureus* e *E. coli*. Antimicrobianos como amoxicilina, penicilina G, eritromicina, clindamicina e vancomicina tiveram sua atividade antibacteriana aumentada na presença de AgNPs (LI *et al.*, 2005; SHAHVERDI *et al.*, 2007).

As AgNPs mostraram efeito sinérgico quando combinadas a ceftazidime, efeito aditivo com estreptomicina, canamicina e polimixina B, e efeito antagônico com cloranfenicol, frente a diversas cepas de microrganismos testados (JAIN *et al.*, 2009). A combinação de amoxicilina com AgNPs resultou em um efeito sinérgico contra *E. coli* (LI *et al.*, 2005) e, além disso, outro estudo relatou o aumento da atividade antibacteriana de ampicilina, canamicina, eritromicina e cloranfenicol na presença das AgNPs contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas (FAYAZ *et al.*, 2010). Esses dados indicam que a associação de AgNPs com outros antimicrobianos é uma promissora estratégia para o controle de infecções por bactérias resistentes.

Alguns estudos realizados mostraram resultados interessantes da combinação de AgNPs e outros na atividade antimicrobiana. A combinação de eugenol com AgNPs mostrou efeito sinérgico frente a diversas cepas de *S. agalactiae* (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015). A interação entre phenazina-1-carboxamida e AgNPs apresentou efeito sinérgico contra MRSA N315 (CARDOZO *et al.*, 2013). Quando combinada a AgNPs com cinamaldeído apresentam efeito sinérgico contra bactérias não formadora de esporos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter sakazakii*, *S. enterica*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* e *Vibrio fluvialis* multirresistente), e efeito aditivo frente à bactérias formadoras de esporos (*Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*) (GHOSH *et al.*, 2013).

As estatinas também apresentam interação quando combinadas a outros antimicrobianos. Um estudo mostrou interação aditiva e sinérgica entre estatinas e azóis (antimicótico). A fluvastatina, apesar de seu efeito inibitório contra os fungos investigados, interagiu sinergicamente com os azóis contra a maioria das cepas testadas (NYILASI *et al.*, 2010). Chamilos e colaboradores mostraram que a lovastatina combinada com triazóis apresenta efeito sinérgico, sugerindo esta associação para uma possível aplicação clínica contra fungos Zigomicetos (CHAMILOS *et al.*, 2006).

Diante disso, a combinação de diferentes compostos constitui uma promissora área de pesquisa, já que representa um potencial terapêutico contra infecções por microrganismos multirresistentes.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano da sinvastatina em interação com as nanopartículas de prata biológica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antibacteriano da sinvastatina e das nanopartículas de prata, bem como a interação dos compostos.
- Analisar a cinética de inibição dos compostos individualmente e a interação entre ambos.
- Verificar as alterações morfológicas na célula bacteriana na presença dos compostos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKALADI, A.; ABDELAZIM, A.; AFIFI, M. Antidiabetic Activity of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2015–2023, 2014.
- BEOVIĆ, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 280–287, 2006.
- BERESWILL, S. et al. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15099, 2010.
- BERGMAN, P. et al. Studies on the antibacterial effects of statins - in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–7, 2011.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Effect of Eugenol against Streptococcus agalactiae Silver Nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a Pseudomonas strain against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 12, 2013.
- CHAMILOS, G. et al. Lovastatin Has Significant Activity against Zygomycetes and Interacts Synergistically with Voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2006.
- CHANG, S. et al. Infection with Vancomycin-Resistant. **The New England Journal of Medicine**, p. 1342–1347, 2003.
- CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.
- CHO, S.-J. et al. Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 4, p. 951–957, 2008.
- CONCEI, M. et al. Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Revista Ciências Médicas**, v. 17, n. 1, p. 43–52, 2008.

- DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.
- DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 7, p. 1–7, 2005.
- ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 6, 2005.
- ENDO, A.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. **FEBS letters**, v. 72, n. 2, p. 323–326, 1976.
- ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 2, p. 1569–1582, 1992.
- FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.
- FENG, Q. L. et al. A mechanist study of the antibacterial effects of silver.pdf. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 664–668, 2000.
- FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome biology**, v. 5, n. 11, p. 248, 2004.
- GHOSH, I. N. et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4721–4731, 2013.
- GINTER, E.; SIMKO, V. Statins : The Drugs for the 21st Century ? **Bratisl Lek Listy**, v. 110, n. 10, 2009.
- GRAZIANO, T. S. et al. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0128098, 2015.
- GRUMEZESCU, A. et al. In vitro assay of the antimicrobial activity of Fe₃O₄ and

CoFe₂O₄ / oleic acid – core / shell on clinical isolates of bacterial and fungal strains. **Optoelectronics and Advance Materials - rapid communication**, v. 4, n. 11, p. 1798–1801, 2010.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 118–123, 2008.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57–64, 2008.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Their Toxicity and Mechanisms of Action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946–957, 2014.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 237–240, 2008.

HOEFLER, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoterapêutica**, 2006.

HUSSAIN, S. M. et al. The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 2, p. 456–463, 2006.

JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 2009.

JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 12, p. 977–987, 2005.

JERWOOD, S.; COHEN, J. Unexpected antimicrobial effect of statins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 362–364, 2008.

KARP, I. et al. Statins and Cancer Risk. **American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, p. 302–309, 2008.

KENYON, N. J. et al. Self-Assembling Nanoparticles Containing Dexamethasone as a Novel Therapy in Allergic Airways Inflammation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77730,

2013.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 3, p. 95–101, 2007.

KIM, K. J. et al. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1482–1484, 2008.

KOCHUPARAMBIL, S. T. et al. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 336, n. 2, p. 496–505, 2011.

KOWSHIK, M. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 95–100, 2002.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.

LARA, H. H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 615–621, 2010.

LECLERG, R. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, p. 2015, 1987.

LEIRIA, V.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–430, 2007.

LEUNG, B. P. et al. A Novel Anti-Inflammatory Role for Simvastatin in Inflammatory Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1524–1530, 2003.

LI, P. et al. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1912–1917, 2005.

LI, V. et al. Shape-controlled Synthesis and Antimicrobial Applications of Ag Nanoparticles. **Research Gate**, n. January, 2010.

LIAU, S. Y. et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 279–283, 1997.

LOK, C. et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver

- research articles. **Journal of proteome research**, v. 5, p. 916–924, 2006.
- LOWY, F. D. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Where Is It Come From and Where Is It Going ? **National Burden of Invasive MRSA infections**, v. 16, n. 7, 1998.
- MARTINS, P. Epidemiologia das infecções hospitalares em centro de terapia intensiva de adulto. **Dissertação Mestrado**, p. 1–97, 2006.
- MASADEH, M. et al. Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin , Simvastatin , and Rosuvastatin. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 1–5, 2012.
- MEVIUS, D. J.; SPRENGER, M. J.; WEGENER, H. C. EU conference “The Microbial Threat”. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 2, p. 101–5, 1999.
- MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 5, p. 542–549, 2011.
- MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.
- MOTA, L. M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 164–172, 2010.
- NYILASI, I. et al. In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, n. 2, p. 175–184, 2010.
- OLIVEIRA, K. R. DE; MUNARETTO, P. USO RACIONAL DE ANTIBIÓTICOS: Responsabilidade de Prescritores, Usuários e Dispensadores. **Revista Contexto & Saúde**, v. 9, p. 43–51, 2010.
- PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 42, p. 1712–1720, 2015.
- PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 33, p. 16248–16253, 2006.
- REINERT, R. R. et al. Antimicrobial susceptibility among organisms from the

Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1018–1029, 2007.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

SAGAR, G.; ASHOK, B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 5, p. 1654–1658, 2012.

SALAM, H. A. et al. Plants : Green Route for Nanoparticle Synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 85–90, 2012.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, p. 29–38, 2014.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168–171, 2007.

SOMERVILLE, G. A. et al. In Vitro Serial Passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in Physiology , Virulence Factor Production , and agr Nucleotide Sequence. **Journal of Bacteriology**, 2002.

WANG, C.-C. et al. Topical simvastatin promotes healing of *Staphylococcus aureus* -contaminated cutaneous wounds. **International Wound Journal**, p. n/a–n/a, 2015.

WHITE, R. J.; COOPER, R.; KINGSLEY, A. Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. **The British journal of nursing**, v. 10, n. 9, p. 563–578, 2001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo

EFEITO ANTIBACTERIANO SINÉRGICO E ADITIVO DE SINVASTATINA COMBINADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICA

Érica P Figueiredo¹, Jhonatan M Ribeiro¹, Erick K Nishio¹, Viviane F Cardozo¹, Admilton G Oliveira¹, Celia GTJ Andrade², Nelson Durán^{3,4,5}, Luciano A Panagio¹, Renata KT Kobayashi¹ e Gerson Nakazato¹.

¹Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

³Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

⁴NanoBioss, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

⁵LNNano (Laboratório Nacional de Nanotecnologia), CNPEM, Campinas, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados na agricultura, na veterinária e clínica médica e, devido a essa intensa e indevida utilização, tem ocorrido o aumento do número de bactérias resistentes a esses medicamentos. Dessa forma, novos fármacos são necessários. As estatinas são conhecidas por seu efeito antihiperlipidêmico, e alguns estudos têm demonstrado que esse grupo de fármacos também possui atividade antibacteriana. Neste estudo, avaliou-se a atividade antibacteriana da combinação de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por *Fusarium oxysporum*, com a sinvastatina, contra a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A sinvastatina mostrou um efeito antibacteriano contra cepas de *S. aureus*, incluindo cepa resistente à meticilina (MRSA), com a Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 62,5 a 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$. O ensaio do Checkerboard e curvas de crescimento e morte mostraram um efeito sinérgico da combinação, com a eliminação total de MRSA N315 após 10 h de incubação, e redução de 75% nas CIM de ambos compostos. As imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram uma formação de protrusões na superfície da MRSA N315 após o tratamento com AgNPs e formação de uma grande massa amorfa após o tratamento com sinvastatina, bem como ambas as características com a combinação dos dois compostos. Nossos resultados indicam que a combinação de sinvastatina e AgNPs é uma alternativa no controle de infecções, incluindo MRSA. Além disso, esta associação apresenta potencial para aplicação em produtos farmacêuticos e hospitalares.

PALAVRAS-CHAVE: Antibacteriano/ nanopartículas metálicas/ estatina/ cepas multirresistentes/ sinergismo.

1. INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são compostos amplamente utilizados em hospitais, e o uso indevido dessas drogas favorece a resistência microbiana, agravando a infecção e aumentando os custos de assistência à saúde (BEOVIĆ, 2006). Conseqüentemente, existe uma grande necessidade da pesquisa de novas opções de tratamento.

As estatinas são conhecidas por seu efeito antihiperlipidêmico, bem como efeitos pleiotrópicos, tais como ação anti-inflamatória e antitrombótica, entre outras (FRIESEN; RODWELL, 2004; JAIN; RIDKER, 2005). O primeiro estudo que descreve o efeito antibacteriano das estatinas relatou que a sinvastatina (Fig. 1) e fluvastatina apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* metilina sensível (MSSA), *S. aureus* metilina resistente (MRSA), *Enterococcus* vancomicina sensível (VSE) e *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) (JERWOOD; COHEN, 2008).

A prata tem sido usada amplamente há milhares de anos, em diversas aplicações, e materiais antimicrobianos a base de prata estão sendo desenvolvidos. Alguns já estão disponíveis em joias, utensílios e até mesmo impregnados em materiais (CHEN; SCHLUESENER, 2008).

As AgNPs são vantajosas quando comparadas a íons de prata devido ao seu tamanho, o que, por sua vez, melhora a capacidade interagir com várias moléculas (LI *et al.*, 2005), já que uma grande proporção de átomos estão em contato imediato com o ambiente, e prontamente disponíveis para a reação (MORONES *et al.*, 2005; LOK *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, os resultados da combinação de AgNPs com outros compostos antimicrobianos é uma estratégia promissora para controlar infecções, causadas por bactérias resistentes (FAYAZ *et al.*, 2010; CARDOZO *et al.*, 2013). Essa combinação resulta em um efeito bactericida melhor quando comparada com os mesmos fármacos utilizados separadamente (HERMAN; HERMAN, 2014). As AgNPs mostraram diferentes interações com outros antimicrobianos, dependendo da cepa de microrganismo e o composto testado (JAIN *et al.*, 2009). A ampicilina, a

canamicina, o cloranfenicol e a eritromicina mostraram maior atividade antibacteriana quando combinadas com AgNPs (FAYAZ *et al.*, 2010). A amoxicilina combinada com AgNPs resultou em um efeito sinérgico contra *E. coli* (LI *et al.*, 2005). A fenazina-1-carboxamida quando combinada a AgNPs também resultou em um efeito sinérgico contra MRSA (CARDOZO *et al.*, 2013), e o eugenol combinado com AgNPs mostrou o mesmo efeito sinérgico contra *Streptococcus agalactiae* (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015). A combinação de AgNPs com cinamaldeído mostrou efeito sinérgico contra cepas bacterianas formadoras de esporos (GHOSH *et al.*, 2013).

Neste estudo, avaliou-se a atividade antibacteriana de sinvastatina combinada com AgNPs contra algumas cepas bacterianas, incluindo os multirresistentes.

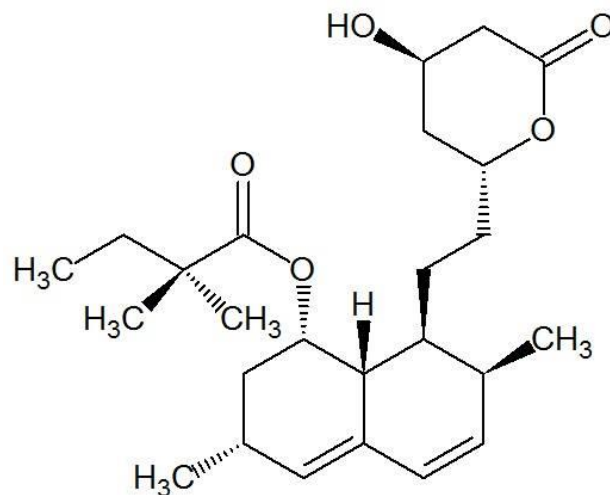


Figura 1: Estrutura química da molécula de sinvastatina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Compostos

A sinvastatina foi obtida comercialmente (Henan Topfond Pharmaceutical Co. Ltda.), e dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®) (BERGMAN *et al.*, 2011), a uma concentração estoque de 5 mg ml⁻¹.

As AgNPs foram obtidas biologicamente, como descrito anteriormente (DURÁN; MARCATO; ALVES; ESPOSITO, 2005). O fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado em ágar malte (Difco®) contendo 0,5% de extrato de levedura, por 6 dias a 28 °C. Em seguida, 10 g de biomassa fúngica foi transferida em 100 ml de água destilada estéril, e incubada com agitação constante (150 rpm), durante 72 h a 28 °C. Subsequentemente, a biomassa foi recuperada por filtração sob vácuo e adicionamos o AgNO₃ ao sobrenadante, para uma concentração final de 10⁻³ M. O sistema foi incubado em ambiente escuro durante 72 h a 28 °C. As AgNPs foram purificadas e caracterizadas usando o Zeta Sizer (Malvern).

2.2 Cepas bacterianas

Neste estudo foram usadas duas cepas padrões de MSSA (ATCC 25923 e ATCC 29213), duas cepas de MRSA (BEC 9393 e N315), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *E. coli* 176 produtora de ESBL. A cepa de MRSA N315 (KURODA *et al.*, 2001) foi cedida pela Profa. Dr. Elsa Masae Mamizuka (Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil) e a cepa de MRSA BEC 9393 (CURY *et al.*, 2009) foi cedida pela Profa. Dr. Agnes Marie Sá Figueiredo (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). A cepa de *E. coli* ESBL 176 foi cedida pela Profa. Dra. Elaine Carolina Vespero (Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil). As cepas bacterianas foram armazenadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Difco®) contendo glicerol a 20% (2,5 M) (Sigma-Aldrich®), a -80 ° C.

2.3 Determinação da CIM e tipo de interação entre os compostos na atividade antibacteriana

Determinou-se a CIM por ensaios de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços (Corning®) (CLSI, 2012). Diferentes concentrações de sinvastatina (15,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e AgNPs (7,8 μM a 125 μM) foram testadas. Colônias bacterianas, crescidas durante 18-24 horas em MHA (Difco®), foram diluídas em salina, e a quantidade de bactérias ajustada na escala 0,5 de McFarland (correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC ml^{-1}). As suspensões bacterianas foram, então, diluídas em caldo MHC (Difco®), colocadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $5,0 \times 10^5$ UFC ml^{-1} , e como controle negativo, foi adicionado DMSO (Sigma-Aldrich®) em MHB nas concentrações iguais às usadas para diluir a sinvastatina. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e, em seguida, a leitura foi realizada através da turbidez.

Depois de determinar a CIM, o tipo de interação entre os compostos na atividade antibacteriana foi avaliado pela técnica de Checkerboard, em que dois gradientes de concentração foram realizados (um para sinvastatina e um para AgNPs) na mesma microplaca. Diferentes concentrações dos compostos combinados foram adicionadas com 50 μl de MHC. Após a diluição, o inóculo bacteriano, previamente diluído, foi adicionado em salina estéril na concentração de $5,0 \times 10^5$ UFC ml^{-1} . A microplaca foi incubada a 37 °C durante 24 h e, em seguida, analisada (KELLY; MATSEN, 1976).

Para definir e qualificar a interação entre os dois compostos obtida pelo Checkerboard, o Índice de Concentração Inibidora Fracionada (CIFI) foi calculado, utilizando a seguinte equação: $\text{CIFI} = A/\text{CIMA} + B/\text{CIMb}$ (CHIN; WEITZMAN, 1997). Sendo que A e B são a concentração da combinação dos compostos e CIMA e CIMb são as CIM dos compostos separados. Interpretamos a CIFI de acordo com o seguinte índice: $\leq 0,5$, interação sinérgica; $>0,5-1,0$, interação de aditismo; >1 e <4 , indiferente ≥ 4 , interação de antagonismo.

2.4 Curva de crescimento e morte

A curva de crescimento e morte foi determinada de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999). Para quantificar o efeito dos compostos no crescimento bacteriano, foi construída uma curva de crescimento e morte na presença de sinvastatina e AgNPs. Os dois compostos foram testados isoladamente e em combinação, e comparados com o controle positivo (sem antimicrobianos). Em diferentes tempos de incubação (0, 2, 4, 7, 10 e 24 h), alíquotas foram diluídas e semeadas em MHA para posterior contagem de UFC. As curvas foram construídas a partir do número de UFC ml⁻¹ em função do tempo de incubação (h).

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A cepa MRSA N315 foi incubada a 37 °C durante 3 h em diferentes condições (tratada com 500 µg ml⁻¹ de sinvastatina; tratada com 125 µM de AgNPs, tratada com a combinação de 125 µg ml⁻¹ de sinvastatina e 62,5 µM de AgNPs, e sem tratamento). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5310 x g, e lavadas com 0,1 M de tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4. Um volume de 20 µl da suspensão de células de MRSA N315 (10⁶ UFC ml⁻¹) foi adicionado em lamínulas de vidro previamente revestidas com uma camada fina de poli-L-lisina (10%) (Sigma-Aldrich®). Depois, foi fixado o material em cada lamínula com 1 ml de glutaraldeído a 2% (Sigma-Aldrich®), paraformaldeído a 2% (Sigma-Aldrich®), e solução de tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) (Sigma-Aldrich®) durante 12 h, seguido por pós-fixação em OsO₄ (Sigma-Aldrich®) a 1% durante 2 h.

Subsequentemente, as amostras foram desidratadas gradualmente em etanol (70, 80, 90 e 100%) e secas ao ponto crítico com CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). As lamínulas foram colocadas em “stubs” revestindo-as com ouro, (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e finalmente examinadas usando um Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 200 (GONÇALVES *et al.*, 2011).

2.6 A análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância e desvio padrão, usando o BioEstat 5.0. Consideramos $p < 0,05$ significativo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização de nanopartículas de prata

As AgNPs foram caracterizadas usando um Zeta Sizer (Malvern) e mostraram um tamanho variando entre 95,52 e 211,5 nm.

3.2 Determinação da CIM e testes de atividade sinérgica

Cepas de *S. aureus* foram inibidas por sinvastatina e AgNPs, enquanto que as cepas de *E. coli* não foram sensíveis a sinvastatina (Tabela 1) mas foram para AgNPs. Contra a MRSA N315, a sinvastatina e as AgNPs mostraram uma CIM de $62,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $125 \mu\text{M}$, respectivamente. Contra *E. coli* 176 produtora de ESBL, a sinvastatina não apresentou atividade, enquanto as AgNPs apresentaram uma CIM de $62,5 \mu\text{M}$.

Os resultados do Checkerboard (Tabela 1) mostraram que houve efeito sinérgico ou aditivo entre os compostos, dependendo da cepa testada. Para MRSA N315 e MSSA ATCC 25923, o efeito foi sinérgico. Quando utilizados em combinação, a CIM foi reduzida em 75%.

Tabela 1: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Checkerboard e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIFI) para cepas bacterianas.

Cepas bacterianas	CIM		Checkerboard	CIFI	Efeito
	Sinvastatina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	AgNPs (μM)	Sinvastatina e AgNPs ($\mu\text{g ml}^{-1}$; μM)		
MSSA ATCC 25923	62,5	125	15,62; 31,25	0,5	Sinergismo
MRSA N315	62,5	125	15,62; 31,25	0,5	Sinergismo
MSSA ATCC 29213	62,5	125	31,25; 31,25	0,75	Aditismo
MRSA BEC 9393	250	125	31,25; 62,5	0,62	Aditismo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>250	62,5	62,5; 62,5	1,25*	Indiferente*
<i>E. coli</i> 176 produtora de ESBL	>250	62,5	15,62; 31,25	0,75*	Aditismo*

CIM: concentração inibitória mínima; CIFI: índice de concentração inibitória fracionada, calculado como anteriormente descrito (CHIN; WEITZMAN, 1997) e interpretado da seguinte forma: $\text{CIFI} \leq 0,5$, interação sinérgica; $>0,5$ e $1,0$, interação de aditismo; >1 e <4 , indiferente; ≥ 4 , interação de antagonismo. AgNPs: nanopartículas de prata. MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente; MSSA: *Staphylococcus aureus* meticilina sensível; ATCC: do inglês "American Type Culture Collection"; ESBL 176: cepa de *E. Coli* produtora de beta-lactamases de espectro estendido *CIFI foi calculado com base no CIM sinvastatina de $250 \mu\text{g ml}^{-1}$.

3.3 Ensaio curva de crescimento e morte

Os resultados mostraram que a sinvastatina possui um efeito bacteriostático contra MRSA N315 (Fig. 2). As AgNPs apresentaram um efeito bactericida em 24 h. A combinação dos dois compostos resultou em diminuição do número de UFC de 4-log ($p < 0,05$) e 6-log ($p < 0,05$) em comparação com o controle, depois de 4 h e 6 h de incubação, respectivamente. Em 10 h, todas as células da população bacteriana foram inibidas por sinvastatina e AgNPs combinados ($p < 0,05$).

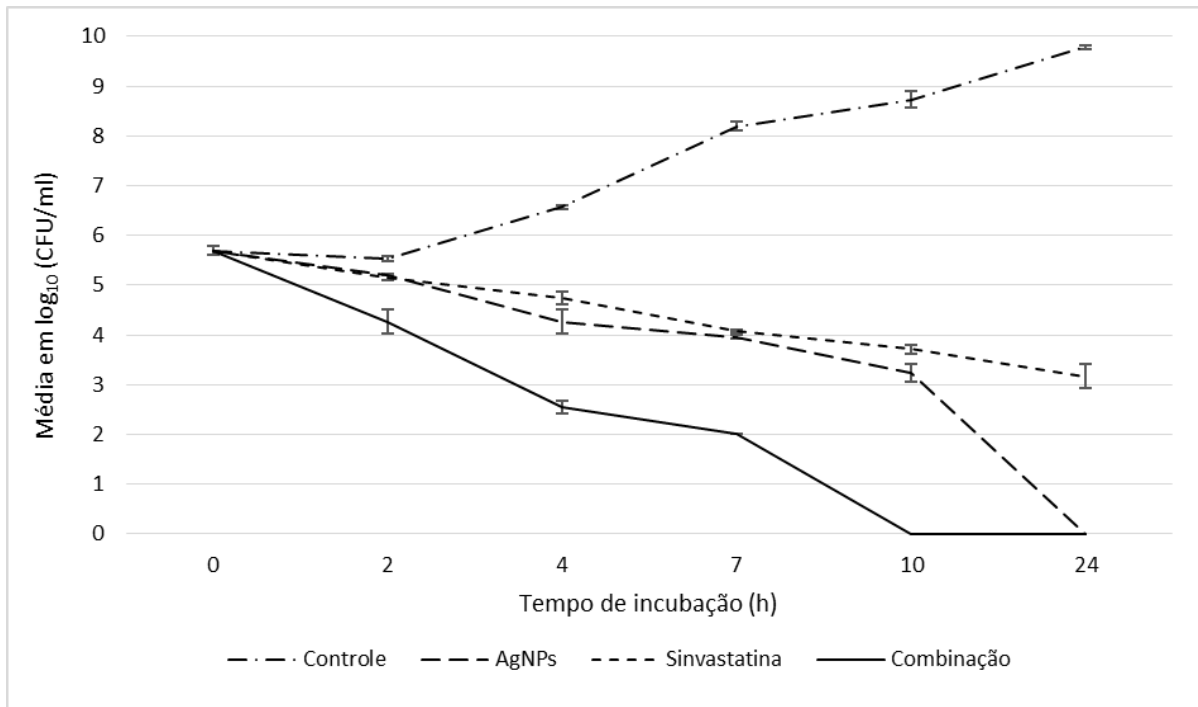


Figura 2: Curva de crescimento e morte para *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) N315. Tratamento de nanopartículas de prata (AgNPs) na concentração de 125 μM ; tratamento com 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sinvastatina; AgNPs e sinvastatina em combinação, na concentração de 31,25 μM e 15,62 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV mostraram alterações na morfologia da superfície celular de MRSA N315 tratada com 3 h de incubação (Figuras 3C, 3D, 3E, 3F, 3G e 3H). Imagens do controle (bactéria sem antimicrobianos) não apresentaram alterações morfológicas e possuía um grande número de células (Figura 3A e 3B). O tratamento com sinvastatina e AgNPs separadas, e em combinação, mostraram diminuição na densidade celular (Figuras 3C, 3D, 3E, 3F, 3G e 3H). O tratamento com AgNPs causou alterações na morfologia das células, com a formação de protruções na superfície celular na maioria delas, tornando-as deformadas (Figura 3E e 3F). Com o tratamento da sinvastatina, algumas células mantiveram inalteradas, enquanto outras mostraram deformações na superfície celular; as imagens mostraram a formação de uma grande massa amorfa, causada pela destruição das células bacterianas (Figura 3C e 3D). As células tratadas com sinvastatina e AgNPs combinadas apresentaram os dois tipos de alterações, sendo possível identificar as protruções na superfície das células, características do tratamento com AgNPs, e formação de uma massa amorfa, característico do

tratamento com sinvastatina, mostrando a interação entre os dois compostos (Figura 3G e 3H).

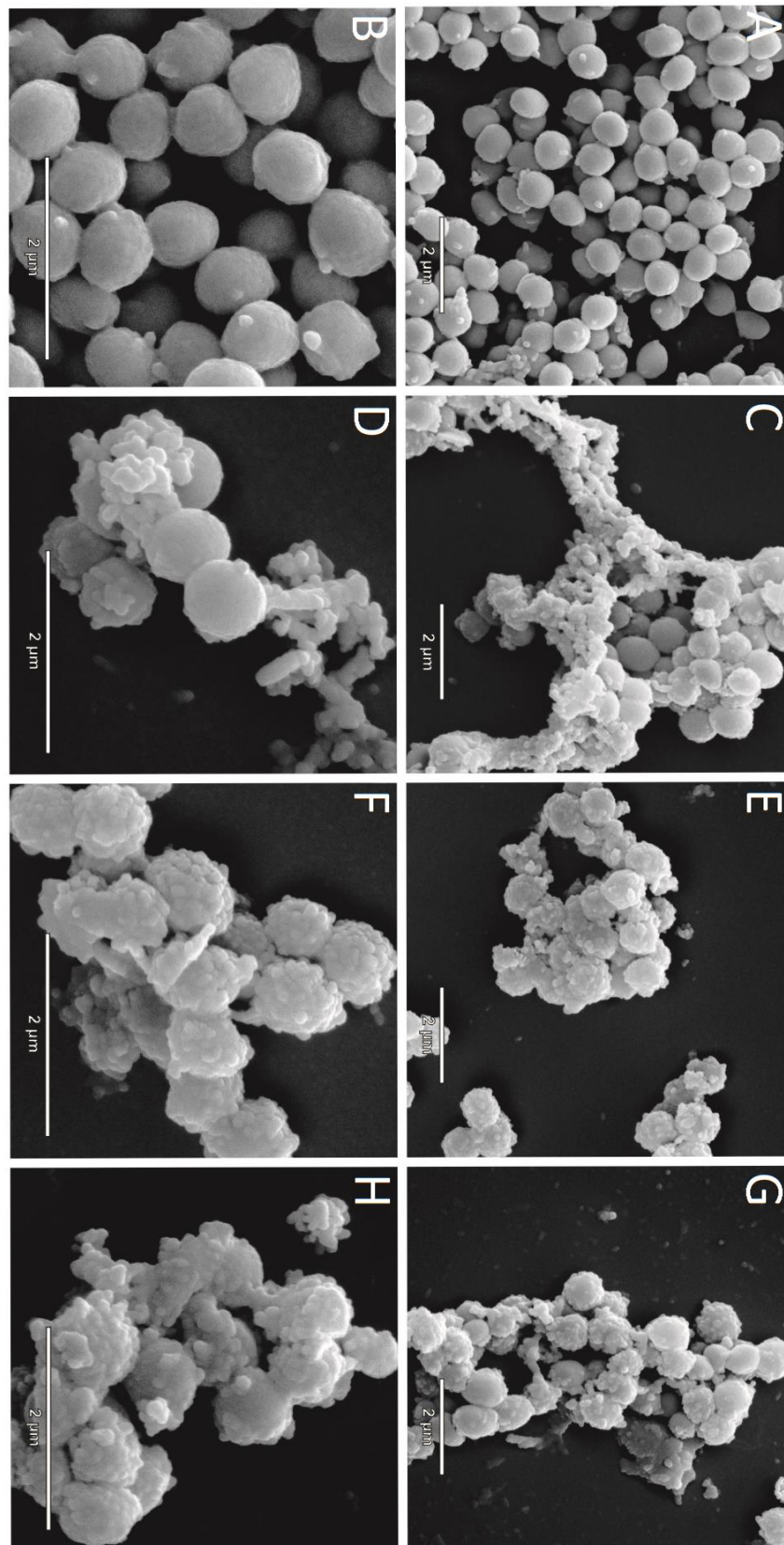


Figura 3: Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Staphylococcus aureus* resistente metilina (MRSA) N315 depois de 3h de incubação. A: Controle positivo 25.000x. B: Controle positivo 50.000x. C: Tratamento com $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ de sinvastatina em 25.000x. D: Tratamento com $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ de sinvastatina em 50.000x E: Tratamento com $125 \mu\text{M}$ de AgNP em 25.000x. F: Tratamento com $125 \mu\text{M}$ de

AgNP em 50.000x. G: Tratamento com 125 µg ml⁻¹ de sinvastatina e 62,5 µM de AgNP combinadas em 25.000x. H: Tratamento com 125 µg ml⁻¹ de sinvastatina e 62,5 µM de AgNP combinadas em 50.000x.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo ensaio de microdiluição em caldo mostraram um efeito inibidor da sinvastatina contra cepas de MSSA e MRSA. Vários estudos têm mostrado que a sinvastatina possui um efeito antibacteriano contra cepas de *S. aureus*, com CIM variável (JERWOOD; COHEN, 2008; ÇOBAN *et al.*, 2010; MASADEH *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015). Em geral, os valores de CIM são mais elevados em MRSA do que em MSSA, porém não foi observado no presente estudo esse comportamento. *E. coli* (ESBL 176 e ATCC 25922) não mostrou sensibilidade a sinvastatina. Os mesmos dados foram obtidos em um estudo anterior (ÇOBAN *et al.*, 2010).

Os resultados para AgNPs mostraram um efeito inibitório contra *S. aureus* e *E. coli*. A CIM obtida no nosso estudo mostrou um efeito antibacteriano contra esses micorganismos. As AgNPs mostraram atividade contra todas as amostras de *S. aureus* e *E. coli* testadas. O mesmo efeito inibitório contra *S. aureus* e *E. coli* foram reportados em estudos anteriores (KIM *et al.*, 2007; MIRZAJANI *et al.*, 2011).

As AgNPs combinadas com outros compostos, mostraram uma interação sinérgica. A combinação de AgNPs com fenazina-1-carboxamida resultou na diminuição de 32 vezes na CIM (CARDOZO *et al.*, 2013). As mesmas AgNPs em combinação com o eugenol mostraram um efeito sinérgico contra *Streptococcus agalactiae* (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a sinvastatina quando combinada com estas AgNPs mostrou um efeito sinérgico contra algumas cepas de *S. aureus*.

De acordo com estudos anteriores (WELSH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2015) as estatinas têm um efeito bacteriostático contra cepas de *S. aureus*, e resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, onde a sinvastatina mostrou inibição do crescimento de MRSA. No entanto, quando a sinvastatina e AgNPs foram usadas em combinação, eliminaram todas as bactérias em apenas 10 h de incubação. O estudo da combinação de estatinas e outros compostos contra bactérias não foi

relatada na literatura. Os nossos resultados mostraram que a sinvastatina usada em combinação com AgNPs causou uma diminuição de 2-log na população bacteriana em 4 h, além dos valores de CIM diminuírem 4 vezes para ambos, indicando um efeito sinérgico entre os dois compostos.

Um estudo relatou que o efeito antibacteriano das estatinas é independente da enzima HMG-CoA redutase, enzima limitante na via do mevalonato humana, cujo produto dessa via, é o colesterol (FRIESEN; RODWELL, 2004). O mecanismo de inibição da HMG-CoA redutase não está envolvido nesse efeito, porque a classe estrutural dessa enzima difere em procariotos e eucariotos (FRIESEN; RODWELL, 2004). Outro possível mecanismo de ação é o aumento da LytA, resultando na degradação de peptidoglicano e na indução de autólise como descrito em pneumococos (BERGMAN *et al.*, 2011).

O efeito inibitório de AgNPs é, provavelmente, a soma de vários mecanismos de ação. Os estudos sugerem que os íons de prata reagem com os grupos sulfidrilas das proteínas (LIAU *et al.*, 1997; FENG *et al.*, 2000). Foi relatado que os íons de prata em concentrações micromolares interferem na cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa pela inibição das enzimas da cadeia respiratória, ou interferem com permeabilidade da membrana (FENG *et al.*, 2000).

Estudos envolvendo sinergismo têm sido especialmente importantes para contribuir com o controle de infecções por bactérias multirresistentes (LOK *et al.*, 2006; BIASI-GARBIN *et al.*, 2015). Existe uma grande necessidade para o desenvolvimento de antimicrobianos e para buscar novos tratamentos, além da pesquisa de novos compostos, combinações com os antibióticos convencionais foram testados. A sinvastatina quando combinada com AgNPs apresentou uma eficiente atividade antibacteriana, podendo ser uma boa alternativa no controle de infecções causadas principalmente por *S. aureus*. Essa combinação tem um efeito maior do que ambas substâncias separadas, estabelecendo uma nova perspectiva no tratamento de infecções.

Em conclusão, nosso estudo mostrou diferentes interações entre sinvastatina e AgNPs contra isolados bacterianos padrão e clínicos. Esses dados sugerem que a

combinação desses compostos é uma nova opção para controle para infecções bacterianas.

5. CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado pelo CNPq BIOTEC 402728 / 2013-0 e CAPES. É reconhecido, também, o apoio do INOMAT (MCTI/CNPq), NanoBioss (MCTI) e Rede Brasileira de Nanotoxicologia (MCTI/CNPq). Agradecemos às Profas. Dra. Elsa Masae Mamizuka e Dra. Agnes Marie Sá Figueiredo que gentilmente cederam as cepas de MRSA N315 e MRSA BEC9393. Ao Dr. Albert Leyva que ajudou com a edição de inglês do manuscrito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGMAN, P. *et al.* Studies on the antibacterial effects of statins - in vitro and in vivo. **PLoS One** 6, 1–7 (2011).
- ALKALADI, A.; ABDELAZIM, A.; AFIFI, M. Antidiabetic Activity of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2015–2023, 2014.
- BEOVIĆ, B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 280–287, 2006.
- BERESWILL, S. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15099, 2010.
- BERGMAN, P. *et al.* Studies on the antibacterial effects of statins - in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–7, 2011.
- BIASI-GARBIN, R. P. *et al.* Effect of Eugenol against Streptococcus agalactiae Silver Nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- CARDOZO, V. F. *et al.* Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a Pseudomonas strain against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 12, 2013.
- CHAMILOS, G. *et al.* Lovastatin Has Significant Activity against Zygomycetes and Interacts Synergistically with Voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2006.
- CHANG, S. *et al.* Infection with Vancomycin-Resistant. **The New England Journal of Medicine**, p. 1342–1347, 2003.
- CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.
- CHO, S.-J. *et al.* Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 4, p. 951–957, 2008.
- CONCEI, M. *et al.* Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Revista Ciências Médicas**, v. 17, n. 1, p. 43–52, 2008.
- DIENSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal**

Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 7, p. 1–7, 2005.

ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 6, 2005.

ENDO, A.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. **FEBS letters**, v. 72, n. 2, p. 323–326, 1976.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 2, p. 1569–1582, 1992.

FAYAZ, A. M. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 103–109, 2010.

FENG, Q. L. et al. A mechanist study of the antibacterial effects of silver.pdf. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 664–668, 2000.

FRIESEN, J. A.; RODWELL, V. W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. **Genome biology**, v. 5, n. 11, p. 248, 2004.

GHOSH, I. N. et al. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4721–4731, 2013.

GINTER, E.; SIMKO, V. Statins : The Drugs for the 21st Century ? **Bratisl Lek Listy**, v. 110, n. 10, 2009.

GRAZIANO, T. S. et al. Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0128098, 2015.

GRUMEZESCU, A. et al. In vitro assay of the antimicrobial activity of Fe₃O₄ and CoFe₂O₄ / oleic acid – core / shell on clinical isolates of bacterial and fungal strains. **Optoelectronics and Advance Materials - rapid communication**, v. 4, n. 11, p. 1798–1801, 2010.

GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 118–123, 2008.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57–64, 2008.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Their Toxicity and Mechanisms of Action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946–957, 2014.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 237–240, 2008.

HOEFLER, R. et al. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoterapêutica**, 2006.

HUSSAIN, S. M. et al. The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 2, p. 456–463, 2006.

JAIN, J. et al. Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1388–1401, 2009.

JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 12, p. 977–987, 2005.

JERWOOD, S.; COHEN, J. Unexpected antimicrobial effect of statins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 362–364, 2008.

KARP, I. et al. Statins and Cancer Risk. **American Journal of Medicine**, v. 121, n. 4, p. 302–309, 2008.

KENYON, N. J. et al. Self-Assembling Nanoparticles Containing Dexamethasone as a Novel Therapy in Allergic Airways Inflammation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77730, 2013.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 3, p. 95–101, 2007.

KIM, K. J. et al. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1482–1484, 2008.

KOCHUPARAMBIL, S. T. et al. Anticancer efficacy of simvastatin on prostate cancer cells and tumor xenografts is associated with inhibition of Akt and reduced prostate-specific antigen expression. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 336, n. 2, p. 496–505, 2011.

- KOWSHIK, M. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 95–100, 2002.
- LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.
- LARA, H. H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 615–621, 2010.
- LECLERG, R. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, p. 2015, 1987.
- LEIRIA, V.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–430, 2007.
- LEUNG, B. P. et al. A Novel Anti-Inflammatory Role for Simvastatin in Inflammatory Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1524–1530, 2003.
- LI, P. et al. Synergistic antibacterial effects of β -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1912–1917, 2005.
- LI, V. et al. Shape-controlled Synthesis and Antimicrobial Applications of Ag Nanoparticles. **Research Gate**, n. January, 2010.
- LIAU, S. Y. et al. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 279–283, 1997.
- LOK, C. et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver research articles. **Journal of proteome research**, v. 5, p. 916–924, 2006.
- LOWY, F. D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Where Is It Come From and Where Is It Going ? **National Burden of Invasive MRSA infections**, v. 16, n. 7, 1998.
- MARTINS, P. Epidemiologia das infecções hospitalares em centro de terapia intensiva de adulto. **Dissertação Mestrado**, p. 1–97, 2006.
- MASADEH, M. et al. Antibacterial activity of statins: a comparative study of Atorvastatin, Simvastatin, and Rosuvastatin. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 1–5, 2012.
- MEVIUS, D. J.; SPRENGER, M. J.; WEGENER, H. C. EU conference “The Microbial Threat”. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 2, p. 101–5, 1999.

MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 5, p. 542–549, 2011.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

MOTA, L. M. et al. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 164–172, 2010.

NYILASI, I. et al. In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, n. 2, p. 175–184, 2010.

OLIVEIRA, K. R. DE; MUNARETTO, P. USO RACIONAL DE ANTIBIÓTICOS: Responsabilidade de Prescritores, Usuários e Dispensadores. **Revista Contexto & Saúde**, v. 9, p. 43–51, 2010.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 42, p. 1712–1720, 2015.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 33, p. 16248–16253, 2006.

REINERT, R. R. et al. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 1018–1029, 2007.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

SAGAR, G.; ASHOK, B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. **European Journal of Experimental Biology**, v. 2, n. 5, p. 1654–1658, 2012.

SALAM, H. A. et al. Plants: Green Route for Nanoparticle Synthesis. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 85–90, 2012.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, p. 29–38, 2014.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the

antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168–171, 2007.

SOMERVILLE, G. A. et al. In Vitro Serial Passage of *Staphylococcus aureus*: Changes in Physiology, Virulence Factor Production, and agr Nucleotide Sequence. **Journal of Bacteriology**, 2002.

WANG, C.-C. et al. Topical simvastatin promotes healing of *Staphylococcus aureus* -contaminated cutaneous wounds. **International Wound Journal**, p. n/a–n/a, 2015.

WHITE, R. J.; COOPER, R.; KINGSLEY, A. Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. **The British journal of nursing**, v. 10, n. 9, p. 563–578, 2001.

Wang, C.-C. et al. Topical simvastatin promotes healing of *Staphylococcus aureus* -contaminated cutaneous wounds. **International Wound Journal**. (2015). doi:10.1111/iwj.12431

7. CONCLUSÃO

A sinvastatina e as nanopartículas de prata constituem eficientes antimicrobianos. A combinação da sinvastatina com nanopartículas de prata apresentou atividade antibacteriana, mostrando um grande potencial para o controle de infecções bacterianas.