

RESUMO EXPANDIDO ESTRUTURADO - ESTUDOS EXPERIMENTAIS E DE
REVISÃO- METODOLOGIAS DE REVISÕES SISTEMÁTICAS,
INTEGRATIVAS, METAANÁLISE E MODELOS EXPERIMENTAIS EM
PESQUISA BIOMÉDICA.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NANOTUBOS DE TITANATO DE SÓDIO,
GÁLIO E ESTRÔNCIO (TINT-NA, TINT-GA E TINT-SR) NA
PERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANAS MICROBIANAS POR
FLUORESCÊNCIA**

Raimundo Luiz Silva Pereira (raimundoluizbio@gmail.com)

Marina Micaelle Rodrigues Siqueira (marinamikaelle.19@gmail.com)

Darcio Luiz De Sousa Junior (darciojsjr@gmail.com)

Thaís Melo Sales (370101106@prof.unijuazeiro.edu.br)

Isabelle Holanda Bezerra (isabellebezerra15@hotmail.com)

Italo Mayke Alves De Souza Pinheiro (mayke_jk@hotmail.com)

INTRODUÇÃO: As doenças infecciosas causadas por microrganismos continuam representando um desafio global à saúde pública, agravado pelo aumento da resistência bacteriana decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos (Kumar et al., 2017; Dalmolin et al., 2022). As bactérias compõem a microbiota humana, podendo atuar como patógenos oportunistas, a exemplo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Taddei et al., 2015). De modo semelhante, o gênero *Candida* inclui espécies como *C. albicans* e *C. tropicalis*, associadas a infecções superficiais e

sistêmicas, cuja virulência está relacionada à formação de biofilmes e à morfogênese celular (Campos et al., 2020; Sharma et al., 2019). Diante da crescente multirresistência microbiana, os nanomateriais têm despertado grande interesse devido às suas propriedades físico-químicas e ao seu potencial antimicrobiano. Entre eles, destacam-se os nanotubos de titânio, notáveis pela versatilidade e pela capacidade de incorporação de íons metálicos, como Na, Sr e Ga, que potencializam sua ação biocida (Wang et al., 2022; Kusior et al., 2015). Esses nanomateriais podem interagir com a parede celular microbiana e liberar íons com atividade antimicrobiana, configurando uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias contra microrganismos resistentes. OBJETIVO: Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade dos nanotubos de titanatos de Na, Ga e Sr em aumentar a permeabilidade de membranas bacterianas e fúngicas em cepas de interesse clínico patogênico. METODOLOGIA: Foram selecionadas as cepas de *Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 e *Staphylococcus aureus* 10 como representantes de espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas. Cepas fúngicas de *Candida albicans* INCQS 40006 e *Candida tropicalis* INCQS 40042 também foram preparadas. O dano à membrana foi avaliado pela medição da fluorescência verde emitida pelo agente intercalante de DNA, Sytox Green, associado a microrganismos tratados com nanotubos em placas pretas de 96 poços. As leituras foram realizadas utilizando o leitor de placas Cytation 1, BioTek®, com o software Gen5™ 3.11. Um filtro com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm foi aplicado para a leitura. RESULTADOS E DISCUSSÕES: Resultados significativos foram observados no aumento da permeabilidade das membranas bacterianas. Foi notado que os nanotubos de Na-TinTN, Sr-TinTN e Ga-TinTN (50 µg/ml) aumentaram a permeabilidade da membrana de *S. aureus* 10 em 42%, 98% e 58%, respectivamente, em comparação ao controle apenas com Sytox-green, no que mostra melhor efetividade quando se comparada à concentração de (100 µg/ml). Contra *E. coli* 06, os nanotubos de Na-TinTN, Sr-TinTN e Ga-TinTN, na concentração de 50 µg/ml, permeabilizaram a membrana bacteriana em 47%, 36% e 169%, respectivamente, em comparação ao controle. Frente a *P. aeruginosa* 24, os nanotubos de Na-TinTN, Sr-TinTN e Ga-TinTN, todos na concentração de 50 µg/ml, aumentaram a permeabilidade da membrana em 81%, 123% e 284%, respectivamente, em comparação ao controle negativo. Esse aumento na permeabilidade foi medido pelo aumento na intensidade de fluorescência do Sytox-green em relação ao controle negativo SYTOX Green. O controle positivo, polimixina B, também aumentou significativamente a

permeabilidade das membranas bacterianas, indicando a reprodutibilidade do experimento. O Sytox-green é um corante fluorescente usado para avaliar a permeabilidade da membrana celular. Ele é impermeável a membranas celulares intactas, mas pode penetrar em células com membranas danificadas, onde se liga ao DNA e emite fluorescência verde. Esse mecanismo de permeabilização da membrana bacteriana ocorre com antibióticos como a polimixina B, resultando em altos picos de fluorescência em comparação com células não tratadas com antibióticos (Johnson e Criss, 2013; McKenzie et al., 2016). Os nanotubos de titanato podem atuar na membrana celular ao entrarem diretamente na célula ou ao causarem interferência nas propriedades físico-químicas da bicamada lipídica por meio de interação externa. Após aderirem à superfície celular, os nanotubos podem penetrar na parede e agir internamente na bactéria. Estudos indicam que a estrutura única dos nanomateriais cria uma atração entre os nanomateriais e os lipídios da membrana, facilitando interações entre as moléculas lipídicas e os nanomateriais. Em relação à via de ação externa, a força de interação entre o nanotubo e os fosfolipídios excede a autoatração entre as moléculas lipídicas dentro da membrana, causando interferência na organização da membrana (Tu et al., 2013). Além disso, os íons de Na, Sr ou Ga distribuídos nos nanotubos podem estar reagindo com a membrana bacteriana por meio de uma reação de reticulação, causando modificações na estrutura e nas propriedades da membrana. Portanto, os nanotubos podem atuar aumentando a permeabilidade, reduzindo a espessura da membrana, alterando o grau de organização dos fosfolipídios e induzindo a formação de poros na membrana (Vácha et al., 2011; Shi et al., 2011; Yang e Ma, 2010). Estudos demonstraram a ação de nanotubos de carbono e nanopartículas no aumento da permeabilidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os nanotubos de carbono aumentaram a permeabilidade da parede celular de *E. coli* (Mosleh et al., 2017). Em pesquisas envolvendo nanopartículas de ZnO, o mecanismo por trás de sua atividade antibacteriana é atribuído à sua excelente capacidade de penetrar totalmente e atuar nas membranas celulares bacterianas, causando danos e induzindo alterações na permeabilidade da membrana. A ação significativa dos nanotubos pode ser atribuída ao aumento de sua área de superfície, conferindo-lhes potencial atividade antibacteriana. Pesquisas destacaram um potencial semelhante em relação a outras nanopartículas metálicas, como nanopartículas de ouro ou óxido de titânio, a partir dos quais os nanotubos no presente estudo são compostos (Li et al., 2014; Mohammed Sadiq et al., 2010; Kumar et al., 2017).

Em estudos realizados por Hancock e Sahl (2006), que utilizaram nanotubos de carbono (CNTs), foi demonstrado que os numerosos grupos químicos presentes na superfície dos nanotubos mimetizam uma estrutura anfifílica facial. Esse mimetismo permite a interação com as membranas microbianas, resultando na formação de uma estrutura secundária na superfície microbiana. Posteriormente, através dessa estrutura secundária resultante, os nanotubos de carbono se inserem e desintegram a membrana celular. Este estudo indica que os nanotubos podem atuar por mecanismos adicionais. Os resultados do presente estudo indicam que nanotubos, como nanopartículas, têm efeitos prejudiciais sobre células bacterianas, corroborando com pesquisas previamente reportadas. Contra cepas fúngicas, também foi observado um resultado significativo no aumento da permeabilidade da membrana. As substâncias Na-TiNT, Sr-TiNT e Ga-TiNT (100 µg/ml) aumentaram a permeabilidade da membrana de *C. albicans* em comparação com o controle apenas com Sytox-green, no que na concentração de (50 µg/ml). Frente a *C. tropicalis*, as substâncias Na-TiNT, Sr-TiNT e Ga-TiNT, na concentração de 100 µg/ml, permeabilizaram a membrana fúngica em 101%, 68% e 210%, respectivamente, em relação ao controle negativo. Assim, resultados significativos foram expressos para todas as substâncias, com o Ga-TiNT destacando-se pelo impacto notável no aumento da permeabilidade da membrana fúngica. O fluconazol é um antifúngico amplamente reconhecido por sua significativa eficácia clínica e baixa toxicidade. Sua ação principal é direcionada à biossíntese de ergosterol, alcançada por meio da inibição da lanosterol 14-alfa-desmetilase (Escribano e Guinea, 2022). Dados da literatura sugerem uma correlação direta entre a redução na síntese de ergosterol e o aumento da permeabilidade da membrana (Mukhopadhyay et al., 2004). A coadministração de Sytox-green e fluconazol resultou em um aumento no influxo de Sytox Green, sugerindo uma redução na síntese de ergosterol na membrana, considerando o mecanismo de ação do fluconazol. Esses resultados sustentam a hipótese de que os nanotubos de titânio podem atuar por meio desse mecanismo e outra possibilidade seria atuarem como os polímeros se ligando diretamente ao ergosterol da membrana formando poros e dando passagem ao Sytox-green (De Lima et al., 2023). Em um estudo envolvendo nanopartículas de prata (Ag), foi observada ação antifúngica, possivelmente atribuída ao esgotamento de ergosterol, resultando em comprometimento da integridade da membrana e alterações no microambiente celular (Radhakrishnan et al., 2018). Assim, os resultados apresentados neste estudo indicam que os nanotubos testados podem inibir enzimas cruciais para

a sobrevivência fúngica, causando inibição da síntese de ergosterol ou através de desorganização na membrana ou criação de poros que aumentam a permeabilidade de membrana, corroborando com os dados observados nas cepas bacterianas e aumento da permeabilidade da membrana. CONCLUSÃO: Os resultados obtidos demonstram que os nanotubos Na-TiNT, Sr-TiNT e Ga-TiNT apresentaram potencial antimicrobiano expressivo contra cepas bacterianas e fúngicas. O aumento da permeabilidade da membrana celular observado nas análises indica que esses materiais podem atuar diretamente sobre as membranas microbianas, alterando sua estrutura e funcionalidade. Essa propriedade é particularmente promissora, uma vez que a resistência microbiana a antibióticos convencionais tem se tornado um desafio crescente na prática clínica. Acredita-se que os efeitos observados possam estar associados tanto à interação física dos nanotubos com a bicamada lipídica quanto à liberação de íons metálicos capazes de modificar a integridade da membrana. O destaque para o Ga-TiNT, que apresentou as maiores taxas de permeabilização, sugere que o gálio desempenha um papel relevante no aumento da atividade antimicrobiana. Dessa forma, o estudo evidencia que a modificação estrutural dos nanotubos de titanato pode ser uma estratégia eficiente para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Pesquisas futuras devem buscar compreender de forma mais aprofundada os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação, bem como avaliar a citotoxicidade desses materiais em modelos celulares e in vivo.

Palavras-chave: nanotubos de titanato; permeabilidade de membrana; atividade antimicrobiana.