



NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA (Bio-AgNP) COMBINADA COM POLIMIXINA B FRENTE À *Acinetobacter baumannii* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS

SUZANE OLACHEA ALLEND¹; RODRIGO YUDI ISHIKAME²; DÉBORAH TROTA FARIA ALBERNAZ²; MIRIAM ELERT DA SILVA²; LUCIANO APARECIDO PANAGIO²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG³

¹Universidade Federal de Pelotas – suzane.olachea@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – rodrigo_y_i@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – trotadeborah@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – mirian.elert@gmail.com

² Universidade Estadual de Londrina – lapanagio@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é considerado um patógeno oportunista, que afeta principalmente pacientes imunocomprometidos, internados em unidades de terapia intensiva (UTIs), e associados a equipamentos invasivos (NEETHU et al., 2018). O tratamento de infecções causadas por este patógeno são com antibióticos da classe dos carbapenêmicos (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). Porém, o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, aliado a falta de novos antimicrobianos no mercado, tem limitado as opções terapêuticas e levado ao uso de drogas pouco utilizadas, como as polimixinas (MENEGUCCI et al., 2016).

As polimixinas foram descobertas no final dos anos 40, e utilizadas amplamente até meados da década de 80, quando foram abandonadas devido a efeitos adversos (nefrotoxicidade). Estas drogas foram reintroduzidas no arsenal terapêutico como último recurso para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes, como *A. baumannii* (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIOS, 2010).

Nesse contexto, a nanotecnologia surge como uma alternativa para o desenvolvimento de novos antimicrobianos ou estratégias de tratamento (LEE; KO; HSUEH, 2019). As nanopartículas de prata biogênicas (Bio-AgNPs) são promissoras devido às suas propriedades antimicrobianas e ação sinérgica com outros medicamentos (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). Além disso, são ativas contra muitas bactérias e podem ter grande potencial para tratar infecções causadas por *A. baumannii* multirresistente (CAVASSIN et al., 2015).

Desta forma, este trabalho avaliou a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata biogênicas (Bio-AgNPs), isoladamente e em combinação com polimicina B contra *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e uma cepa padrão ATCC® 19606™ pertencentes ao Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio) da Universidade Federal de Pelotas. A Bio-AgNP usada neste estudo foi obtida pelo método biológico de síntese mediada por *Fusarium oxysporum* (DURÁN et al., 2005). Os ensaios de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) seguiram o CLSI (CLSI, 2017). As suspensões bacterianas foram homogeneizadas e a densidade óptica medida (OD_{630} entre 0,08 e 0,1) correspondente à escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8 CFU/mL$). O inóculo foi preparado com suspensão



bacteriana 1:20 em caldo Muller Hinton (MH-Kasvi®). A polimixina B foi obtida comercialmente (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA). Em uma placa de microdiluição de 96 poços foram adicionados 50 µL de caldo MH, 30 µg/mL de Bio-AgNPs e 1 µg/mL de polimixina B e realizada a microdiluição, onde as concentrações variaram de 0,03 a 30 µg/mL para Bio-AgNPs e de 0,0005 a 1 µg/mL para polimixina B. Após a microdiluição, foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação, 20 µL de rezazurina 0,02%, que atua como um indicador de viabilidade celular, foram adicionados e observados por 1 h (LESCAT et al., 2019). A CMI foi definida como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano. A CMB foi determinada a partir dos resultados da CMI onde alíquotas foram retiradas dos poços em que houve inibição do crescimento bacteriano, e semeadas em placa de MH e incubadas a 37°C por 24h. A ausência de crescimento bacteriano nas placas MH indicou que os compostos testados foram bactericidas. Após a determinação da CMI, a Bio-AgNP foi combinada com a polimixina B pelo método de *checkerboard* (WEI; YANG, 2017). As concentrações iniciais de Bio-AgNPs e polimixina B foram 30 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Usando uma placa de 96 poços com caldo MH, foram realizadas diluições seriadas da polimixina B e posteriormente foram realizadas diluições da Bio-AgNP. O inóculo usado foi de 3×10^4 UFC/mL. A placa foi incubada a 37°C por 24 h, e 20 µL de rezazurina 0,02% foram adicionados. A concentração fracionária inibitória (FIC) foi definida como a menor concentração na qual a Bio-AgNP e a polimixina B combinadas podem inibir o crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados do *checkerboard* foi realizada usando o índice de concentração fracionária inibitória (FICI) obtido pela seguinte fórmula: $FICI = (CMI\ da\ Bio-AgNP\ combinada/CMI\ da\ Bio-AgNP\ sozinha) + (CMI\ da\ polimixina\ B\ combinada/CMI\ da\ polimixina\ B\ sozinha)$. Os resultados do FICI foram interpretados da seguinte forma: $FICI \leq 0,50 = SINERGISMO$; $0,50 < FICI \leq 1,0 = ADITIVIDADE$; $1,0 < FICI \leq 4,0 = INDIFERENÇA$ e $FICI > 4,0 = ANTAGONISMO$. Além disso, o Fator Modulatório (FM) foi calculado: $CMI\ da\ polimixina\ B\ sozinha / CMI\ da\ polimixina\ B\ em\ combinação\ com\ a\ Bio-AgNP$. O resultado foi interpretado como o número de vezes em que a Bio-AgNP reduziu a CMI da polimixina B. Foi feito o controle de esterilidade dos compostos e meio de cultivo, bem como, o controle de crescimento dos isolados e cepa padrão. Os testes foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antibacteriana da polimixina B e da Bio-AgNP contra os isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* são demonstrados na Tabela 1. A CMI e a CMB da polimixina B variaram entre 0,007 e 0,030 µg/mL, enquanto que para Bio-AgNP variaram entre 0,460 e 1,870 µg/mL. Estudos avaliaram a atividade antibacteriana da polimixina B em isolados de bactérias Gram-negativas e observaram uma CMI de 0,06 a 128 µg/mL (DOYMAZ; KARAASLAN, 2019; WILHELM et al., 2018). Outros estudos avaliaram a atividade antibacteriana de AgNP e Bio-AgNP contra bactérias Gram-negativas multirresistentes e observaram uma CMI variando de 0,125 a 780 µg/mL. Alguns fatores podem influenciar os resultados da atividade antibacteriana da Bio-AgNP, como o método de produção e a metodologia de determinação da CMI (HOSSAIN et al., 2019; NEETHU et al., 2018).

No teste *checkerboard* a polimixina B e a Bio-AgNP apresentaram efeito antibacteriano sinérgico e aditivo (Tabela 1). A combinação demonstrou atividade antibacteriana potencializada contra ATCC® 19606™ e isolados de Ab2, Ab13,

Ab15 e Ab47 de *A. baumannii*, diminuindo a concentração necessária, com valores de CMI de 0,002 e 0,120 µg/mL para polimixina B e Bio-AgNP, respectivamente. Os valores de FICI foram calculados e variaram de 0,31 a 0,76 para ATCC® 19606™ e os isolados de *A. baumannii* indicando efeito sinérgico ($FICI \leq 0,50$) e aditivo ($0,50 < FICI \leq 1,0$). Para todas as cepas bacterianas testadas, a combinação de polimixina B e de Bio-AgNP apresentou sinergismo com exceção de Ab13, para o qual a combinação foi de aditividade. O mecanismo do efeito sinérgico obtido pela combinação de AgNPs com um agente antibacteriano contra *A. baumannii* se deve provavelmente ao papel da polimixina B na sinergia dos fármacos, em que há rápida permeabilização da membrana celular permitindo maior penetração pela AgNP e retardamento do desenvolvimento de resistência das nanopartículas (WAN et al., 2016). Além disso, foi observado que a Bio-AgNP foi capaz de reduzir de 2 a 16 vezes (FM) a CMI da polimixina B frente as cepas testadas (Tabela 1). Da mesma forma, SALMAN et al., (2019) avaliaram o efeito combinado de AgNP e de polimixina B e encontraram uma redução de 4 vezes a CMI da polimixina B em comparação com a CMI da polimixina B sozinha. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a avaliar a combinação de Bio-AgNP com polimixina B contra isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos.

TABELA 1. Concentração Inibitória Mínima (CMI), Concentração Bactericida Mínima (MBC), Índice da Concentração Fracionária Inibitória (FICI), Fator Modulatório (MF) da Bio-AgNP em combinação com polimixina B.

| <i>A. baumannii</i> | Polimixina B | | Bio-AgNP | | Polimixina B/ Bio-AgNP | | |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|----------|----|
| | CMI (µg/mL) | CMB (µg/mL) | CMI (µg/mL) | CMB (µg/mL) | CMI (µg/mL) | FICI | FM |
| ATCC® 19606™ | 0.030 | 0.300 | 1.870 | 1.870 | 0.003; 0.230 | 0.38 (S) | 6 |
| Ab 2 | 0.030 | 0.030 | 0.930 | 0.930 | 0.015; 0.230 | 0.44 (S) | 4 |
| Ab 13 | 0.015 | 0.015 | 0.460 | 0.460 | 0.003; 0.230 | 0.76 (A) | 2 |
| Ab 15 | 0.015 | 0.015 | 0.460 | 0.460 | 0.002; 0.120 | 0.47 (S) | 7 |
| Ab 47 | 0.007 | 0.007 | 0.930 | 0.930 | 0.002; 0.230 | 0.31 (S) | 16 |

(S) sinergismo; (A) aditividade.

4. CONCLUSÕES

A Bio-AgNP possuem atividade antibacteriana frente a *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos, com CMI e CMB variando de 0,460 a 1,870 µg/mL. Além disso, quando combinada a polimixina B com a Bio-AgNP houve efeitos sinérgicos e aditivo e decréscimo de até 16 vezes a CMI da polimixina B.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVASSIN, E.D.; FIGUEIREDO, L. F. P.; OTOCH, J. P.; SECKLER, M. M.; OLIVEIRA, R. A.; FRANCO, F. F.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V.; LEVIN, A. S. S.; COSTA, S. F. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2015.
- CLSI. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 2017.
- DOYMAZ, M. Z.; KARAASLAN, E. Comparison of antibacterial activities of polymyxin B and colistin against multidrug resistant Gram negative bacteria.



- Infectious Diseases**, v. 51, n. 9, p. 676–682, 2019.
- DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 1–7, 2005.
- FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIOS, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, 2010.
- HOSSAIN, M.; POLASH, S. A.; TAKIKAWA, M.; SHUBHRA, R. D.; SAHA, T; ISLAM, Z.; HOSSAIN, S.; HASAN, A.; TAKEOKA, S.; SARKER, S. R. Investigation of the Antibacterial Activity and in vivo Cytotoxicity of Biogenic Silver Nanoparticles as Potent Therapeutics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. October, p. 1–14, 2019.
- LEE, N. Y.; KO, W. C.; HSUEH, P. R. Nanoparticles in the treatment of infections caused by multidrug-resistant organisms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. October, p. 1–10, 2019.
- LESCAT, M.; POIREL, L.; TINGUELY, C.; NORDMANN, P. A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 1–6, 2019.
- MENEGUCCIA, T. C.; ALBIEROA, J.; MIGLIORINIA, L. B.; ALVESA, J. L. B.; VIANAA, G. F.; MAZUCHELIA, J.; MARRONIB, F. E.C.; CARDOSOA, C. L.; TOGNIMA, M. C. B. Strategies for the treatment of polymyxin B-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 5, p. 380–385, 2016.
- NEETHU, S.; MIDHUN, S. J.; RADHAKRISHNAN, E. K.; JYOTHIS, M. Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumanii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 263–272, 2018.
- RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 3, p. 327–333, 2018.
- SALMAN, M.; RIZWANA, R.; KHAN, H.; MUNIR, I.; HAMAYUN, M.; IQBAL, A.; REHMAN, A.; AMIN, K.; AHMED, G.; KHAN, M.; KHAN, A.; AMIN, F. Synergistic effect of silver nanoparticles and polymyxin B against biofilm produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates of pus samples in vitro. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 2465–2472, 2019.
- SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, 2018.
- WAN, G.; RUAN, L.; YIN, Y.; YANG, T.; GE, M.; CHENG, X. Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3789–3800, 2016.
- WEI, W. J.; YANG, H. F. Synergy against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 3, p. 321–326, 2017.
- WILHELM, C. M.; NUNES, L. S.; MARTINS, A. F.; BARTH, A. L. In vitro antimicrobial activity of imipenem plus amikacin or polymyxin B against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 2, p. 152–154, 2018.