

## NANOTECNOLOGIA: UMA ABORDAGEM ANTIBACTERIANA COMBINADA NO COMBATE A *Acinetobacter baumannii* MULTIRRESISTENTE

SUZANE OLACHEA ALLEND<sup>1</sup>; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA<sup>2</sup>; KAMILA FURTADO DA CUNHA<sup>2</sup>; HELENA SILVEIRA VIANNA<sup>2</sup>; LUCIANO APARECIDO PANAGIO<sup>2</sup>; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO<sup>2</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas 1 – [suzane\\_olachea@yahoo.com.br](mailto:suzane_olachea@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas 2 – [marcelle\\_garcia@hotmail.com](mailto:marcelle_garcia@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas 2 – [kamilafurtado@gmail.com](mailto:kamilafurtado@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas 2 – [hsilveiravianna@gmail.com](mailto:hsilveiravianna@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina 2 – [lapanagio@gmail.com](mailto:lapanagio@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas 2 – [amiltonseixas@gmail.com](mailto:amiltonseixas@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas 3 – [daianehartwig@gmail.com](mailto:daianehartwig@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas drogas antibacterianas que apresentem eficácia no tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, principalmente patógenos gram-negativo como *Acinetobacter baumannii* (Ab), tem sido prioritário em todo o mundo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; LEÓN-BUITIMEA *et al.*, 2020). A resistência aos antibacterianos é um grave problema em saúde pública, o rápido aumento da resistência exige a implementação de diferentes estratégias de controle das infecções (HOWARD *et al.*, 2012; LEÓN-BUITIMEA *et al.*, 2020). Neste sentido, uma terapia de combinação de drogas adequada é de extrema importância no combate a infecções por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (SINGH; THANGARAJ; CHAKRABARTI, 2013). As combinações medicamentosas consistem na associação de dois ou mais medicamentos para aumentar a eficácia da estratégia terapêutica, e também as chances de aplicações clínicas (PEYCLIT; BARON; ROLAIN, 2019). Tratamentos combinatórios são indicados como uma excelente forma de desenvolver e lançar novos medicamentos. Por diferentes razões, a combinação terapêutica proporciona benefícios como: reduzida dosagem dos medicamentos, menores efeitos adversos, reduzido risco de desenvolvimento de resistência aos medicamentos, melhor resposta combinada (efeitos sinérgicos), amplo espectro de ação antibacteriana e, em alguns casos, aumento do efeito antibacteriano (LEÓN-BUITIMEA *et al.*, 2020).

Recentemente, diversas estratégias baseadas na nanotecnologia têm sido propostas como alternativa para o problema da resistência antimicrobiana, dentre elas, nanomateriais metálicos, como as nanopartículas de prata (AgNPs) (DOAN *et al.*, 2020). As AgNPs possuem potencial bactericida contra patógenos gram positivos e gram negativos. Além disso, essas nanopartículas juntamente com os antibióticos são ativas contra muitas bactérias resistentes a medicamentos, e podem ser usados como medicamento para o tratamento de várias infecções (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). Alternativamente, as nanopartículas de prata biogênica (Bio-AgNP), chamam a atenção por tratar de uma opção econômica e ecologicamente viável para a produção de nanopartículas metálicas (DURÁN *et al.*, 2019). Sabe-se que, a Bio-AgNP pode apresentar efeito bacteriostático, bem como, bactericida, e demonstrar efeito sinérgico quando combinada com antibióticos (ALLEND *et al.*, 2022). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de uma Bio-AgNP combinada ao carbapenêmico meropenem, frente a isolados multirresistente de *A. baumannii*.

### 2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *A. baumannii* resistentes a 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 por método biológico de síntese mediada por *Fusarium oxysporum* (DURÁN et al., 2005). Os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CMI) e da concentração bactericida mínima (CMB) seguiram o CLSI (CLSI, 2017). As suspensões bacterianas foram homogeneizadas e a densidade óptica medida (OD<sub>630</sub> entre 0,08 e 0,1) correspondente à escala de 0,5 de McFarland (1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL). O inóculo foi preparado com suspensão bacteriana 1:20 em caldo Muller Hinton (MH-Kasvi®). O meropenem foi obtido comercialmente (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA). Em uma placa de microdiluição de 96 poços, foram adicionados 50 µL de caldo MH e 30 µg/mL de Bio-AgNP ou 250 µg/mL de meropenem e realizada a microdiluição, onde as concentrações variaram de 0,03 a 30 µg/mL para Bio-AgNP e de 0,0005 a 250 µg/mL para meropenem. 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 resazurina 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 eram bactericidas. Após a determinação da CMI, a Bio-AgNP foi combinada com o meropenem pelo método de *Checkerboard* (WEN et al., 2017). As concentrações iniciais de Bio-AgNP e meropenem foram 30 µg/mL e 15,6 µg/mL, respectivamente. Usando uma placa de 96 poços com caldo MH, foi realizada diluições seriadas do meropenem e posteriormente foi realizada as diluições da Bio-AgNP. O inóculo usado foi de 3 x 10<sup>4</sup> UFC/mL. A placa foi incubada a 37°C por 24 h, e 20 µL de resazurina 0,02% foram adicionados. A concentração fracionária inibitória (FIC) foi definida como a menor concentração na qual a Bio-AgNP e o meropenem combinados 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:  $FICI = (CMI \text{ da Bio-AgNP combinada} / CMI \text{ da Bio-AgNP sozinha}) + (CMI \text{ do meropenem combinado} / CMI \text{ do meropenem sozinho})$ . Os resultados do FICI foram interpretados da seguinte forma:  $FICI \leq 0,50 = \text{SINERGISMO}$ ;  $0,50 < FICI \leq 1,0 = \text{ADITIVIDADE}$ ;  $1,0 < FICI \leq 4,0 = \text{INDIFERENÇA}$  e  $FICI > 4,0 = \text{ANTAGONISMO}$ . Além disso, o Fator Modulatório (FM) foi calculado:  $CMI \text{ do meropenem sozinho} / CMI \text{ do meropenem em combinação com a Bio-AgNP}$ . O resultado foi interpretado como o número de vezes em que a Bio-AgNP reduziu a CMI do meropenem. Foi avaliado o controle de esterilidade dos compostos e meio de cultura, 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 do meropenem e da Bio-AgNP contra os isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* são demonstrados na Tabela 1. A CMI e a CMB do meropenem variaram entre 0,03 e 31,2 µg/mL, enquanto que para Bio-AgNP variaram entre 0,46 e 1,87 µg/mL. ABDULMUTAKABBIR et al., 2021, analisando a atividade antibacteriana do meropenem encontraram uma variação de CMI de 8 e 128 mg/mL frente a isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenêmicos. Já, SHINOHARA et al., 2019, encontraram uma CMI do meropenem de 64 e 128 µg/mL contra isolados de *A.*

*baumannii*. Enquanto para a Bio-AgNP, NEETHU *et al.*, 2018, ao avaliar a eficácia antibacteriana da nanopartícula de prata biogênica contra *A. baumannii* encontrou uma CMI de 15,62 µg/mL e uma CMB de 31,24 µg/mL, valores bem acima do encontrado neste trabalho, o que podem ser justificado pela diferença na síntese da nanopartícula de prata biogênica, já que utilizaram um fungo endofítico marinho *Penicillium polonicum*. No teste *checkerboard* o meropenem 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 utilizada para o efeito antibacteriano com valores de CMI de 0,0015 e 0,230 µg/mL para o meropenem e a Bio-AgNP, respectivamente. Os valores de FICI foram calculados considerando as combinações mais baixas do meropenem e Bio-AgNP, com as quais não houve crescimento visível. Os valores de FICI variaram de 0,36 a 0,62 para ATCC® 19606™ e os isolados de *A. baumannii*, indicando efeito sinérgico ( $FICI \leq 0,50$ ) e aditivo ( $0,50 < FICI \leq 1,0$ ).

As nanopartículas podem entrar na membrana celular dos micro-organismos patogênicos e interferir em importantes vias moleculares, formulando mecanismos antimicrobianos exclusivos, ainda em combinação com antibióticos, as nanopartículas demonstram sinergia e podem ajudar a limitar a resistência bacteriana (LEE; KO; HSUEH, 2019). Para todas as cepas bacterianas testadas, a combinação de meropenem e de Bio-AgNP apresentou sinergismo, exceto para Ab13, para o qual a combinação apresentou aditividade. Além disso, foi observado que a Bio-AgNP foi capaz de reduzir de 4 a 8 vezes (FM) a CMI do meropenem frente as cepas testadas (Tabela 1). Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a avaliar a combinação de Bio-AgNP com meropenem 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 meropenem.

| <i>A. baumannii</i> | MEROPENEM      |                | Bio-AgNP       |                | MEROPENEM/ Bio-AgNP |          |    |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------|----------|----|
|                     | CMI<br>(µg/mL) | CMB<br>(µg/mL) | CMI<br>(µg/mL) | CMB<br>(µg/mL) | CMI<br>(µg/mL)      | FICI     | FM |
| ATCC® 19606™        | 0.03           | 0.03           | 1.870          | 1.870          | 0.015; 0.46         | 0.49 (S) | 4  |
| Ab 2                | 31.2           | 31.2           | 0.930          | 0.930          | 3.9; 0.46           | 0.49 (S) | 4  |
| Ab 13               | 15.6           | 15.6           | 0.460          | 0.460          | 0.48; 0.23          | 0.62 (A) | 8  |
| Ab 15               | 7.8            | 31.2           | 0.460          | 0.460          | 0.48; 0.46          | 0.36 (S) | 8  |
| Ab 47               | 15.6           | 31.2           | 0.930          | 0.930          | 0.97; 0.46          | 0.48 (S) | 4  |

(S) sinergismo; (A) aditividade.

#### 4. CONCLUSÕES

A nanopartícula de prata biogênica combinada com meropenem possui efeito sinérgico e aditivo, podendo servir como base para o desenvolvimento de um novo agente antibacteriano para tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter baumannii* multirresistente.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-MUTAKABBIR, J. C. *et al.* Contemporary Perspective on the Treatment of *Acinetobacter baumannii* Infections: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 4, p. 2177–2202, 2021.
- ALLEND, S. O. *et al.* Biogenic silver nanoparticle (Bio-AgNP) has an antibacterial

- effect against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with synergism and additivity when combined with polymyxin B. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 1036–1047, 2022.
- CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2017. ISSN 0887-6045.v. 8
- DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–49, 2020.
- DOAN, V. D. *et al.* Utilizing waste corn-cob in biosynthesis of noble metallic nanoparticles for antibacterial effect and catalytic degradation of contaminants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 6, p. 6148–6162, 2020.
- DOS SANTOS RAMOS, M. A. *et al.* Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 589, n. July, 2020.
- 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.
- DURÁN, N. *et al.* *Quim. Nova*, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.
- HOWARD, A. *et al.* *Acinetobacter baumannii*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 243–250, 2012.
- 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.
- LEÓN-BUITIMEA, A. *et al.* The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–10, 2020.
- LESCAT, M. *et al.* 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.
- NEETHU, S. *et al.* Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming, multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 263–272, 2018.
- PEYCLIT, L.; BARON, S. A.; ROLAIN, J. M. Drug repurposing to fight colistin and carbapenem-resistant bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–11, 2019.
- SHINOHARA, D. R. *et al.* Synergistic activity of polymyxin B combined with vancomycin against carbapenem-resistant and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: First in vitro study. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 309–315, 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.
- SINGH, H.; THANGARAJ, P.; CHAKRABARTI, A. *Acinetobacter baumannii*: A brief account of mechanisms of multidrug resistance and current and future therapeutic management. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 11, p. 2602–2605, 2013.
- WEN, H. *et al.* Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2017.