

Inibição da formação do biofilme de isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* frente à nanopartícula de prata biogênica (Bio-AgNP) combinada à polimixina B

HELENA SILVEIRA VIANNA¹; SUZANE OLACHEA ALLEND²; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA³; KAMILA FURTADO DA CUNHA⁴; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO⁵; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – hsilveiravianna@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – suzane_olachea@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é considerada a espécie mais importante do gênero *Acinetobacter*, e surgiu como um patógeno oportunista que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, internados em unidades de terapia intensiva (UTI) e utilizando equipamentos invasivos (ventilação mecânica e cateteres) (NEETHU et al., 2018). Além disso, *A. baumannii* tem capacidade de formar biofilme, que contribui para sua sobrevivência no ambiente hospitalar. As terapias antimicrobianas existentes são frequentemente incapazes de eliminar os micro-organismos presentes nos biofilmes, e uma resposta inflamatória crônica local quase sempre é produzida como resposta ao biofilme formado (TURNER et al., 2009). Com o problema da multirresistência e a baixa disponibilidade de novos antimicrobianos no mercado, foi necessário o retorno de drogas usadas anteriormente, como as polimixinas (grupo de antibiótico polipeptídico) (MENEGUCCI et al., 2016). As polimixinas, geralmente apresentam potente atividade *in vitro* contra *A. baumannii*, entretanto, apesar de sua reintegração relativamente recente na prática clínica, já existem isolados apresentando resistência a este antibacteriano (NI et al., 2015).

Desta forma, a nanotecnologia surge como alternativa no desenvolvimento de novos antibióticos ou de novas estratégias de tratamento (LEE; KO; HSUEH, 2019). As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser promissoras, em razão da sua significativa e comprovada propriedade antimicrobiana (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). As AgNPs biogênicas (Bio-AgNPs) podem agir sinergicamente com antibióticos e são ativas contra muitas bactérias resistentes, podendo apresentar um grande potencial para tratar infecções causadas por estas bactérias, incluindo *A. baumannii* (CAVASSIN et al., 2015). Em um estudo avaliando a combinação de Bio-AgNP com a polimixina B, ALLEND et al. 2021, encontrou efeitos sinérgico e aditivo, e redução significativa da concentração mínima inibitória (CMI) da Polimixina B. Houve também, a diminuição de células viáveis de *A. baumannii* nas horas iniciais de tratamento. Quando avaliadas isoladamente, tanto a BioAgNP como a polimixina B apresentaram citotoxicidade dose-dependente contra células VERO, e quando combinadas reduziram a toxicidade de forma significativa, apresentando assim, maior segurança farmacológica (ALLEND et al. 2021). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a inibição da formação do biofilme de isolados de *A. baumannii* por Bio-AgNP e polimixina B de forma isolada ou em combinação.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos obtidos de pacientes internados no Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL). Esses isolados foram previamente caracterizados, sendo multirresistentes e fortes formadores de biofilme (DE FREITAS et al., 2020). A Bio-AgNP utilizada em nosso estudo foi obtida pelo método biológico de síntese mediada por fungos (DURÁN et al., 2005). Para a avaliação da atividade antibiofilme, seguiu-se o protocolo estabelecido por HALICKI et al., 2019, com modificações. Para a inibição do biofilme, as cepas foram expostas a diferentes tratamentos (polimixina B, Bio-AgNP e a combinação de polimixina B/Bio-AgNP) antes da indução de formação do biofilme, para determinar se tratamentos foram capazes de inibir a formação do biofilme bacteriano. Para isso, o crescimento das cepas foi realizado em Ágar MacConkey, e foi preparada uma suspensão bacteriana correspondendo a escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL), em solução salina estéril (0,9% NaCl). Foram utilizados tratamentos com concentrações baseadas na CMI e 2X CMI de cada isolado e cepa, conforme Tabela 1. Os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguiram o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (CLSI 2017). Cem microlitros da suspensão foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e exposto aos tratamentos, previamente determinados no ensaio da atividade antimicrobiana. As soluções de trabalho foram preparadas com o volume de composto necessário para o ensaio em cada poço não excedesse 200 μ L (100 μ L de solução com os compostos + 80 μ L de meio + 20 μ L de inóculo bacteriano). Os controles utilizados foram: de esterilidade dos compostos (meio de cultura + compostos), controle de formação do biofilme (meio de cultura + inóculo) e controle de esterilidade do meio (apenas meio de cultura). As placas foram incubadas por 24h a 37°C. A seguir, as etapas de lavagem, fixação e coloração do biofilme foram realizadas e a quantificação da formação do biofilme foi medida baseada na densidade óptica a 540 nm (DO_{540nm}). A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA), usando um valor de probabilidade de $p < 0,05$, no software GraphPad Prism 8.2.0.

Tabela 1. Concentração mínima inibitória da polimixina B e Bio-AgNP isoladamente e em combinação contra isolados e cepa de *A. baumannii* multirresistente.

<i>Acinetobacter baumannii</i>	polimixina B CMI (μ g/mL)	Bio-AgNP CMI (μ g/mL)	polimixina B/Bio-AgNP combinadas CMI (μ g/mL)
ATCC 19606	0,030	1,87	0,003;0,23
Ab02	0,030	0,93	0,015;0,23
Ab13	0,015	0,46	0,003;0,23
Ab15	0,015	0,46	0,002;0,12
Ab47	0,007	0,93	0,002;0,23

Ab-*Acinetobacter baumannii*; ATCC-Coleção de Cultura de Tipos Americanos; CMI-Concentração mínima inibitória; Bio-AgNP-nanopartícula de prata biogênica

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se na Figura 1. Em nosso estudo, comprovou-se o sinergismo da combinação destes compostos uma vez que foram observados os seguintes resultados: a CMI da Bio-AgNP combinada à polimixina B foi capaz de inibir até 32,93% do biofilme formado pelo isolado Ab02 e 48,69% do isolado Ab15. Já a concentração de 2X CMI inibiu cerca de 31% do biofilme formado pelo isolado Ab02, 100% do isolado Ab13 e apenas 19,6% do isolado Ab47. As análises estatísticas demonstram que não houve diferença significativa quando avaliada a Bio-AgNP isoladamente nas concentrações da CMI e 2X CMI para a inibição de formação do biofilme dos isolados Ab02, Ab15 e Ab47. Já,

quando avaliada a combinação da Bio-AgNP com polimixina B nas mesmas concentrações, somente o isolado Ab47 não apresentou diferença significativa. A combinação de Bio-AgNP e polimixina B na concentração de 2x CMI frente ao isolado Ab15 apresentou melhor resultado do que a CMI. Já no isolado Ab13 é possível observar que não houve diferença significativa na CMI quando combinada a Bio-AgNP, no entanto, para a concentração de 2x CMI, a Bio-AgNP isoladamente apresentou melhor resultado. Segundo SALMAN et. al, há sinergia quando combinada a polimixina B a AgNPs enquanto isoladamente as AgNPs não são capazes de impedir a formação do biofilme. Importante salientar que as AgNPs quando administradas em altas doses conferem toxicidade celular *in vivo* (DAS et al., 2017). As leituras de absorbância dos compostos encontram-se na Figura 1, e os isolados Ab02 e Ab13 não apresentaram diferença significativa quando utilizada a Bio-AgNP combinada com polimixina B e Bio-AgNP, respectivamente, nas concentrações da CMI para a inibição do biofilme formado.

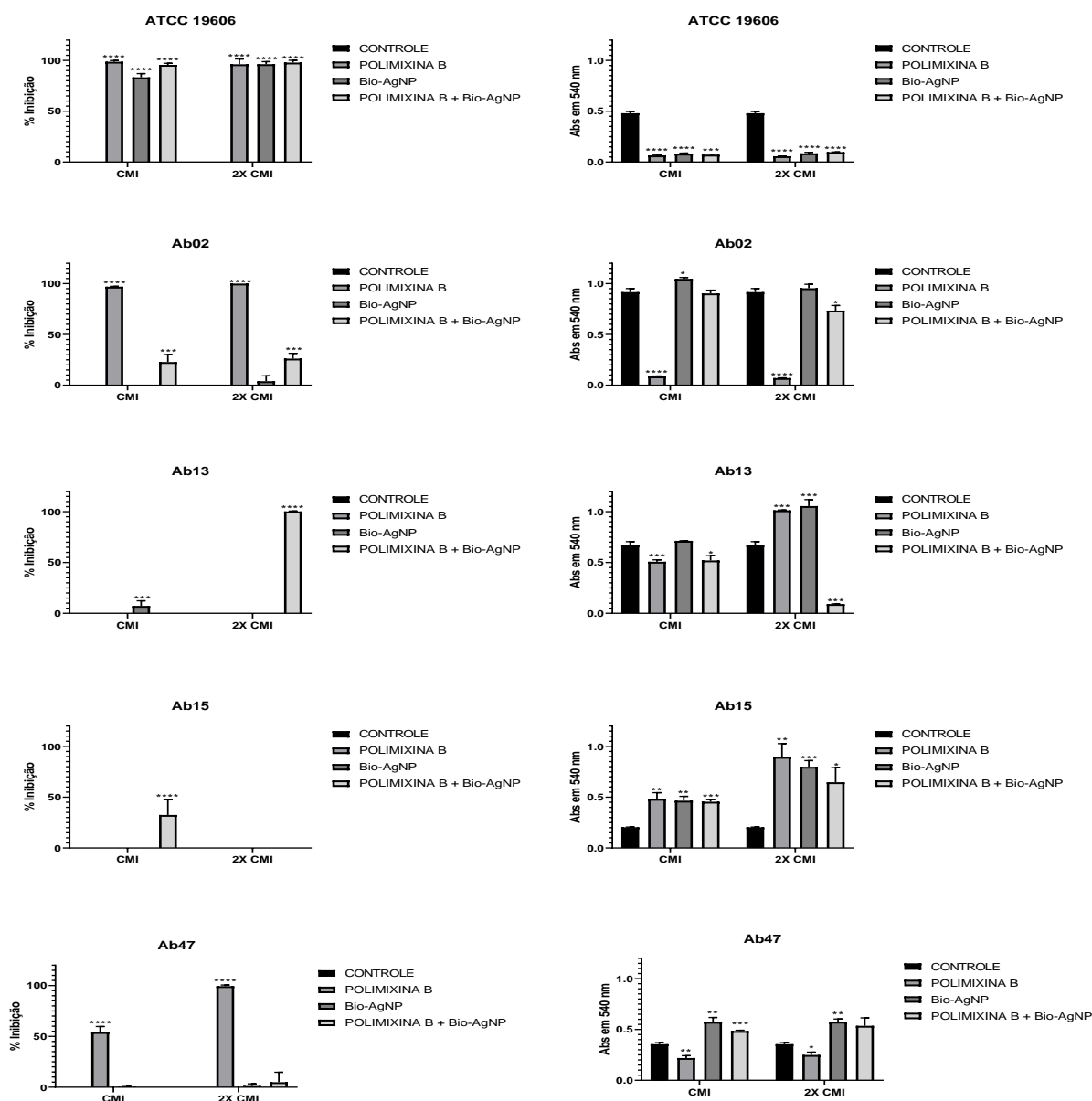


Figura 1. Atividade inibitória da formação do biofilme de Bio-AgNP, polimixina B isoladamente e em combinação nas concentrações da CMI e 2X CMI, frente a isolados de *A. baumannii* e cepa padrão ATCC® 19606™.

4. CONCLUSÕES

Com isso, pode-se concluir que a combinação de Bio-AgNP com polimixina B, bem como, os compostos isoladamente, apresentaram resultados significativos na inibição do biofilme frente aos isolados multirresistentes de *A. baumannii*, comprovando sua atividade antibiofilme. Entretanto, ainda são necessários outros estudos para melhor compreensão dos mecanismos de formação e inibição do biofilme.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, P.1036-1047, 2021.
- CAVASSIN, E. D. et al. 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.
- DE FREITAS, S. B. et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated with Nosocomial Infection in the Pelotas, RS, Brazil. **Current Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 2724–2734, 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.
- HALICKI, P. C. B. et al. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2-Pyridinylhydrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 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.
- MENEGUCCI, T. C. et al. 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. 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.
- NI, W. et al. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 1, p. 8–18, 2015.
- 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.
- TURNER, I. G. et al. Sterility and Infection. In: Narayan R, ed. **Biomedical Materials**. New York, NY: Sprin Scien, p. 239-258, 2009.