

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DA NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICA (Bio-AgNP) FRENTE ÀS BACTÉRIAS DO GRUPO ESKAPE

SAMUEL RODRIGUES CARVALHO¹; NATALI LIMA DIAS² BEATRIZ BATISTA BRITES²; BRUNO LOUZADA NASCIMENTO²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG³ MARTA GONÇALVES AMARAL³

¹Universidade Federal de Pelotas – samukrc17@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natali.dias.754@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – beatriz.batista.brites@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bruno.nascimento1227@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – martagamaral@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O persistente uso de antibióticos, especialmente no ambiente hospitalar, tem provocado o aumento de microrganismos multirresistentes. Com a emergência da multirresistência bacteriana, seis patógenos destacam-se. O termo ESKAPE trata de seis bactérias multirresistentes e frequentes no ambiente hospitalar: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (ROSA et al. 2020).

Um dos mecanismos que contribuem para o aumento da resistência são os biofilmes bacterianos, que são comunidades estruturadas de células bacterianas em uma matriz polimérica fixada a uma superfície. Os biofilmes protegem e permitem que as bactérias sobrevivam e se desenvolvam em ambientes hostis. As bactérias dentro dos biofilmes podem resistir às respostas imunes do hospedeiro e são muito menos suscetíveis a antibióticos e desinfetantes. A capacidade de formar biofilmes é hoje considerada um atributo universal dos microrganismos. As doenças associadas aos biofilmes requerem novos métodos para a sua prevenção, diagnóstico e tratamento; isso se deve em grande parte às propriedades dos biofilmes (JACQUES et al. 2010).

Dessa forma, a nanotecnologia surge para possibilitar novas estratégias de tratamento para diferentes doenças ou até mesmo no desenvolvimento de novos fármacos. Alguns estudos recentes vêm demonstrando resultados relevantes quanto a ação de nanopartículas (NP) associadas a matrizes poliméricas no processo de cicatrização de ferimentos, como NP de prata (Ag), cobre (Cu) e óxido de ferro (FeO) (LU et al., 2018; MEHRABANI et al., 2018).

Contudo, as nanopartículas de prata (AgNPs) demonstram-se como promissoras devido a suas propriedades antimicrobianas, inclusive frente a microrganismos multirresistentes (RAHIMI et al., 2020). Apesar de não ser bem elucidado, acredita-se que as AgNP apresentam a capacidade de penetrar na membrana celular, ou se fixar à superfície bacteriana, levando ao rompimento e induzindo morte da célula. Além disso, são altamente tóxicas para a célula bacteriana e sua eficiência é aumentada pela diminuição do tamanho da partícula (MENOM, et al., 2017; SIDDIQI, et al., 2018; SINGH, et al., 2015).

Diante do apresentado, esse estudo visou avaliar a concentração bactericida mínima de nanopartícula de prata (Bio-AgNP) em células livres e células em biofilme de bactérias do grupo ESKAPE.

2. METODOLOGIA

A Bio-AgNP utilizada neste estudo foi obtida por método biológico de síntese mediada pelo fungo *Lichtheimia ornata* em parceria com a Universidade Estadual de Londrina (UEL). A CIM foi determinada através da Técnica de Microdiluição em Caldo em placas de poliestireno como estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2018). Foram feitas diluições de razão 1:2 da Bio-AgNP em Caldo BHI (*Brain and Heart Infusion* – Kasvi®) variando de 1,96 a 251,1 µg/mL, em seguida foram adicionados 50 µL do inóculo bacteriano preparado a partir de suspensão em solução salina ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) diluído em caldo BHI (1:20). Como controles foram utilizados o meio de cultivo e o meio de cultivo acrescido do inóculo bacteriano. As placas foram incubadas a 36°C por 24h. Os testes foram realizados em triplicata com três repetições para cada bactéria em estudo. Após o período de incubação foi feita a adição de 10 µL do corante revelador Resazurina (Sigma-Aldrich ®) em todas as cavidades da placa e posteriormente foi incubada a 36°C por 2h. Após isso, o surgimento da coloração rosa indicou possível viabilidade celular bacteriana, sendo possível determinar a CIM. Com base nos resultados que foram obtidos na CIM, a partir dos poços em que houve inibição do crescimento bacteriano, foi coletada uma alçada para repique em ágar BHI (Kasvi®). Após o período de incubação, foi verificado em quais concentrações as moléculas tiveram ação bactericida, indicada pela ausência do crescimento bacteriano (CLSI, 2018).

Para determinar a concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) e concentração bactericida mínima do biofilme (CBMB) foi utilizada a metodologia adaptada, inicialmente proposta por Cafiso et. al (2010). Para isso foram preparados inóculos bacterianos ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de cultura recente (18-24h) dos microrganismos em estudo e a partir disso, foram adicionados 20 µL do mesmo em 180µL de Caldo BHI (Kasvi ®), sendo incubado por 24h a 36°C. Após o período de incubação, as células não aderidas foram removidas e as placas foram lavadas cuidadosamente com solução salina estéril três vezes. Posteriormente foi adicionado o meio de cultura com concentrações variando de 1,96 a 251,1 µg/mL da Bio-AgNP e incubadas nas mesmas condições. A CIMB foi considerada como a concentração da molécula em que não foi observado crescimento visível. Para determinar a CBMB foi feito o repique dos poços onde ocorreu inibição para placas com ágar BHI (Kasvi ®) sendo incubado 24h a 36°C. A CBMB foi considerada como a menor concentração em que a bactéria não cresceu após a exposição à concentração das moléculas. Os testes foram feitos em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para CIM e CBM da Bio-AgNP encontram-se expressos na tabela 1. A CIM variou de 3,9 a 62,7 µg/mL e a CBM de 31,8 a 251,1 µg/mL para as espécies que compõem o grupo ESKAPE. A Bio-AgNP mostrou atividade antibacteriana, isso pode se dar devido ao seu tamanho bem reduzido, podendo assim atravessar membranas mais facilmente. De acordo com Rahimia (2020) vários fatores afetam a capacidade antimicrobiana de uma nanopartícula, como o tamanho, forma e revestimento, esse fato corrobora com os resultados obtidos.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para as bactérias do grupo ESKAPE.

Cepas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC® 51299)	62,7	125,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25904)	15,6	125,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® 700603)	3,9	251,1
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC® 19606)	7,8	31,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	7,8	125,5
<i>Enterobacter</i> (ATCC® 13048)	15,6	125,5

Já para as concentrações inibitórias e bactericidas no biofilme produzido por essas bactérias, temos os resultados apresentados na tabela 2, onde mostra que a Bio-AgNP não foi bactericida para nenhuma das bactérias testadas, somente tivemos a concentrações bacteriostáticas que variaram de 7,8 a 125,5 µg/mL. De acordo com Chandra et al. (2001) a maior resistência das nanopartículas de prata no biofilme já consolidado à maior presença de exopolissacarídeos presentes no biofilme, pois quando este está em formação as células são jovens, com um metabolismo mais ativo, o que vai de encontro aos resultados mostrados acima, onde não houve concentrações bactericidas, somente ocorreu inibição do crescimento quando o biofilme foi exposto ao composto testado.

Tabela 2. concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do biofilme (CIMB e CBMB) para as bactérias do grupo ESKAPE.

Bactéria	CIMB (µg/mL)	CBMB (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC® 51299)	15,6	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25904)	31,8	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC® 700603)	125,5	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC® 19606)	31,8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC® 27853)	7,8	-
<i>Enterobacter</i> (ATCC 13048)	15,6	-

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostrados neste trabalho demonstram a capacidade bactericida e bacteriostática da Bio-AgNP frente a células livres e para biofilme formado, respectivamente. Mesmo com resultados promissores são necessários mais estudos para observar frente a isolados resistentes e avaliação de combinações com antimicrobianos comumente usados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAFISO, V; BERTUCCIO, T.; SPINA, D.; PURRELLO, S.; STEFANI, S. Tigecycline inhibition of a mature biofilm in clinical isolates of *Staphylococcus*

aureus comparison with other drugs. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.59, p. 466–469, 2010.

CHANDRA J., KUHN D.M., MUKHERJEE P.K., HOYER L.L., MCCORMICK T. & GHANNOUM M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance. **J. Bacteriol.** 183(18):5385-5394. PMID:11514524. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>.

CLSI, 2018. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; M07 Approved Standard — 13th Edition.

JACQUES M, ARAGON V, TREMBLAY YD. Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance. **Anim Health Res Rev.** 2010 Dec;11(2):97-121. doi: 10.1017/S1466252310000149. Epub 2010 Oct 25. PMID: 20969814.

LU, B.; YE, H.; SHANG, S.; XIONG, Q.; YU, K.; LI, Q.; ET AL. Novel wound dressing with chitosan gold nanoparticles capped with a small molecule for effective treatment of multiantibiotic-resistant bacterial infections. **Nanotechnology**, v.29, n.42, p. 425-603, 2018.

MEHRABANI, M. G.; KARIMIAN, R.; RAKHSHAEI, R.; PAKDEL, F.; ESLAMI, H.; FAKHRZADEH, V. Chitin/silkfibroin/TiO₂ bio-nanocomposite as a biocompatible wound dressing bandage with strong antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.116, p. 966–976, 2018.

MENON, S.; RAJESHKUMAR, S.; VENKAT, S. K. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. **Resource-Efficient Technologies**, v.3, p.516-527, 2017.

RAHIMIA, M.; NORUZI, E. B.; SHEYKHSARAN, E.; EBADI, B.; KARIMINEZHAD, Z.; MOLAPARAST, M.; MEHRABANI, M. G.; MEHRAMOUZ, B.; YOUSELF, M.; AHMADI, R.; YOUSEFI, B.; GANBAROV, K.; KAMOUNAH, F.; SHAFIEI-IRANNEJAD, V.; KAFIL, H. S. Carbohydrate polymer-based silver nanocomposites: Recent progress in the antimicrobial wound dressings. **Cabohydrate Polymers**, v.231, p.1-16, 2020.

ROSA, T. F. DA, FOLETTO, V. S., SERAFIN, M. B., BOTTEGA, A., & HÖRNER, R. (2020). Estratégias emergentes para tratamento de ESKAPE. **Saúde (Santa Maria)**, 46 (1).

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. 14, 2018.

SINGH, R.; UTKARSHA U. SHEDBALKAR, U. U.; WADHWANI, S. A.; CHOPADE, B. A. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, 2015.