

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULA DE PRATA BIOGÊNICA FRENTE A *Enterococcus faecium*

JÚLIA OLIVEIRA DE ALMEIDA¹; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK²; ISABEL LADEIRA PEREIRA³; PATRÍCIA GOMES⁴; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – juliaoliveiralmeida@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – patgomes1206@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os enterococos são bactérias Gram-positivas que vivem como parte da microbiota intestinal de animais e humanos, além de patógenos oportunistas que causam infecções em pacientes hospitalizados (WEI, 2024). Neste gênero, duas espécies se destacam, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, sendo a primeira classificada como de alta prioridade pela Organização Mundial de Saúde devido às cepas resistentes ao antibiótico de último recurso, a vancomicina (OMS, 2023). *E. faecium* resistente a vancomicina (VREfm) surgiu na década de 80, provavelmente por meio de transferência horizontal de genes. As infecções por VREfm levam à óbito 57% dos casos e causaram cerca de 250 mil mortes no ano de 2019 (MURRAY, *et al.*, 2022).

A capacidade dos enterococos de produzirem biofilmes é uma de suas principais características de patogenicidade. O biofilme é uma comunidade de células bacterianas envolvidas por uma matriz polimérica extracelular (EPS), aderida a uma superfície inerte ou viva. Essa matriz contribui para a resistência bacteriana, pois permite que as células bacterianas escapem das defesas do hospedeiro e da atividade de antimicrobianos (DAMACENO & FARIAS, 2016). Para eliminar o biofilme, os antibióticos devem penetrar a EPS e obter acesso às células bacterianas. Neste contexto podemos inserir a nanotecnologia como uma estratégia favorável para o tratamento de cepas resistentes (SANTOS, 2021).

Nos últimos anos a nanotecnologia vem sendo empregada para sintetizar nanopartículas (NPs) funcionalizadas como alternativa medicamentosa (POPESCU *et al.*, 2019). A ação antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas de prata (AgNPs) já foi demonstrada contra diversas espécies bacterianas de importância clínica, como por exemplo *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* conforme descrito anteriormente por (ALLEND *et al.*, 2021; DA CUNHA *et al.*, 2023).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antibacteriana e antibiofilme de uma nanopartícula de prata biogênica contra *Enterococcus faecium*.

2. METODOLOGIA

Nesta pesquisa foram utilizadas a cepa padrão de *E. faecium* NCTC® 12202 e um isolado clínico obtido de humanos. Este foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Escola da UFPel (HE-UFPel) e armazenado no biorepositório do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio) da UFPel.

Para os testes antimicrobianos foi utilizada uma nanopartícula biogênica de prata (BioAgNP) produzida a partir da síntese mediada por fungos. O método de

produção consistiu na redução de nitrato de prata pela cepa 551 de *Fusarium oxysporum* no Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil) (ALLEND, *et al.*, 2021).

Para definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da BioAgNP foi utilizado o método de microdiluição em caldo segundo estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) com adaptações. Para o inóculo bacteriano, foram utilizado 50 µL da suspensão bacteriana feita de acordo com a Escala 0,5 de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL), em 4.950 µl de caldo de *Brain Heart Infusion* (BHI). Em uma placa de poliestireno de 96 poços foi adicionado caldo BHI por poço e Bio-AgNP, de forma a realizar a diluição seriada do composto obtendo concentrações entre 0,06 a 30 µg/mL. Por fim foi adicionado o inóculo (contendo 5×10^5 UFC/mL por poço) e as placas foram incubadas por 24h à 37°C em aerobiose. Como controles, foram utilizados o inóculo bacteriano (controle positivo) e apenas o meio BHI (controle negativo). Após o período de incubação, foram adicionados 20 µl de resazurina 0,4% (Sigma®, St. Louis, EUA) em todos os poços e deixado por mais 2 horas a fim de avaliar a viabilidade celular. Se houver atividade bacteriana indicativa de viabilidade celular, a coloração do poço mudará de azul para vermelho, por conta das reações de respiração celular bacteriana.

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram coletados 5µl dos poços que não houve atividade bacteriana (poços de coloração azul) e semeados em ágar *Mitis Salivarius*, incubados por 24h à 37°C em aerobiose e analisado se houve crescimento ou não.

O teste de degradação do biofilme foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços, adicionando 180 µL de caldo triptona de soja (TSB) (Kasvi®) e 20 µl da suspensão bacteriana ajustada a escala 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL). As placas foram incubadas a 37° C por 24h para formação do biofilme e, após, o conteúdo dos poços foi descartado e adicionadas diferentes concentrações de Bio-AgNP (entre 0,06 e 30 µg/mL). As placas foram levadas novamente para incubação (37°C, 24 horas, aerobiose). Ao final, o conteúdo dos poços foi descartado novamente, lavado com solução de NaCl 0,9% e adicionados 150 µl de metanol P.A. por 15 min para fixação do biofilme. Após, o metanol foi descartado e as placas incubadas por mais 30 minutos a 37°C para secagem. Em seguida, 200 µl de cristal violeta a 0,2% foram adicionados por 15 minutos para completa coloração. Após, a solução de cristal violeta é descartada, as placas são lavadas com água destilada e 150 µL de etanol 95% foi adicionado por 30 min para eluição do biofilme. A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos foi lida usando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata. As diferenças significativas entre as concentrações foram determinadas pela análise de variância (ANOVA de uma via) e pelo pós-teste de Dunnett. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. A análise foi realizada usando o GraphPad Prism versão 8.0.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antibacteriana da Bio-AgNP usando a metodologia de microdiluição em caldo demonstrou uma inibição de crescimento para as duas cepas com CIM de 1,8 µg/ml, e efeito bactericida foi observado nas bactérias com CBM de 7,5 µg/ml. Esta descoberta está de acordo com outros estudos que

demonstraram a eficácia da Bio-AgNP contra outros micro-organismos, destacando o potencial dessa nanopartícula para uso na formulação de antimicrobianos (ALLEND, *et al.*, 2021; SEO, *et al.*, 2021; MATTOS, 2023).

A densidade óptica (DO 570 nm) de biofilmes de *E. faecium* NCTC 1202 e de um isolado clínico foi avaliada após exposição a diferentes concentrações de Bio-AgNP (0,06 a 30 µg/mL). Para ambas as cepas, as concentrações mais elevadas testadas (30; 15; 7,5 e 3,75 µg/mL) reduziram significativamente a densidade óptica em relação ao controle não tratado (**** $p < 0,0001$), indicando efeito de destruição sobre o biofilme formado. As concentrações abaixo destas testadas (1,87 a 0,06 µg/mL) não apresentaram efeito significativo sobre o biofilme com densidades ópticas próximas ao controle.

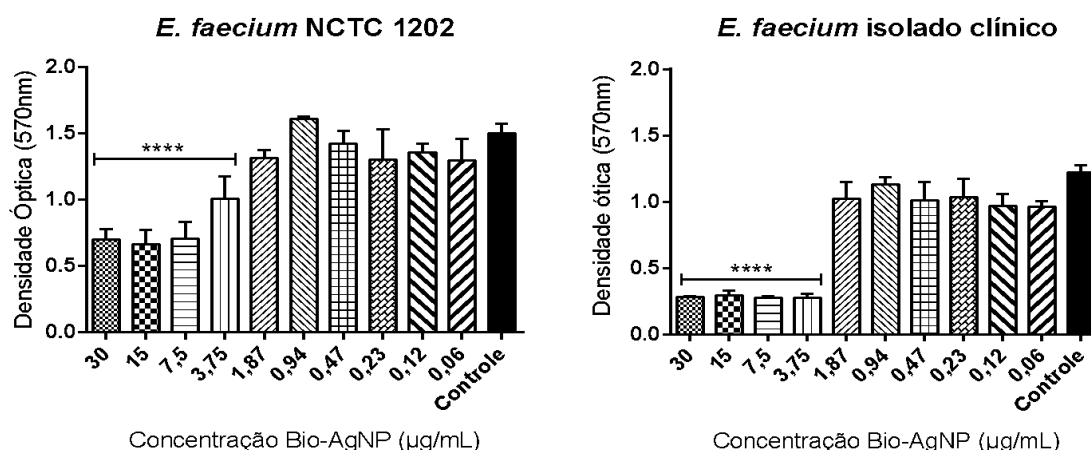


Figura 1 - Atividade de degradação do biofilme de *E. faecium* NCTC 1202 e isolado clínico por diferentes concentrações de Bio-AgNP. As barras representam a média \pm desvio padrão da leitura de densidade óptica (570nm). Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos comparados ao controle ($p < 0,0001$).

As AgNPs atuam na permeabilização da membrana bacteriana, entre outros mecanismos ainda não completamente elucidativos (SEO *et al.*, 2021). Para a eliminação do biofilme, os antimicrobianos precisam penetrar na matriz polissacarídica; entretanto, o tratamento isolado com antibióticos geralmente é ineficaz, pois esses fármacos frequentemente não atingem as células bacterianas-alvo. Nesse contexto, a combinação de antibióticos com AgNPs surge como uma estratégia promissora (ANSARI *et al.*, 2014), reforçando a necessidade de estudos sobre sinergismo entre Bio-AgNPs e antibióticos. Além disso, as Bio-AgNPs demonstram capacidade de prevenir o desenvolvimento de resistência mesmo durante uso prolongado, característica particularmente relevante diante do aumento de bactérias multirresistentes (MATTOS, 2023).

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que a Bio-AgNP testada possui atividade antibacteriana e antibiofilme contra *E. faecium*. A Bio-AgNP inibiu o crescimento bacteriano e apresentou efeito bactericida. Além disso, foi capaz de degradar biofilmes formados, evidenciando sua capacidade antibiofilme. Esses achados reforçam o potencial das Bio-AgNPs como alternativa no tratamento de infecções causadas por *E. faecium*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEND, Suzane Olachea et al. Antibiofilm effect of biogenic silver nanoparticle alone and combined with polymyxin B against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 2789-2796, 2024.

ANSARI, M.A., KHAN, H.M., KHAN, A.A. et al. Eficácia antibiofilme de nanopartículas de prata contra biofilme de isolados de β -lactamase de espectro estendido de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **Appl Nanosci** 4, 859–868 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13204-013-0266-1>

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

DA CUNHA, Kamila Furtado; ALBERNAZ, Déborah Trota Farias; GARCIA, Marcelle de Oliveira; et al. Nanopartículas de prata (AgNPs) no controle de *Staphylococcus* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 1, p. ovac032, 2023.

DAMACENO, Neila Batista; FARIAS, Luciana Ramalho. Relação existente entre biofilmes bacterianos, quorum sensing, infecções e resistência a antibióticos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 46-51, 2016.

MATTOS, Maiana Maria Rios Siqueira. Atividade de nanopartículas de prata biogênicas em isolados orais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. / Maiana Maria Rios Siqueira Mattos. – Salvador (BA), 2023. 74 f.: il.

MURRAY, Christopher JL et al. Carga global de resistência antimicrobiana bacteriana em 2019: uma análise sistemática. **A lanceta**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

Organização Mundial da Saúde. Classificação AWaRe de antibióticos para avaliação e monitoramento do uso, 2023.

POPESCU, Elena Leocadia, BALASOIU, Maria; CRISTEA, Oana Mariana et.al. Estudo dos efeitos antimicrobianos de nanopartículas de prata funcionalizadas. **Embrião**, v. 60, p. 939-946, 2019.

SEO, Mimi; OH, Taeho; BAE, Seulgi. Antibiofilm activity of silver nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with otitis externa. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 5, p. 1551-1557, 2021.

WEI, Yahan; PALACIOS ARAYA, Dennise; PALMER, Kelli L. *Enterococcus faecium*: evolução, adaptação, patogênese e terapêutica emergente. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 11, p. 705-721, 2024.