

Nanopartícula de prata Biogênica (Bio-AgNP): uma associação com meropenem na destruição de biofilme formado por isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*

BRUNO LOUZADA NASCIMENTO¹; SUZANE OLACHEA ALLEND¹; SAMUEL RODRIGUES CARVALHO²; NATALI LIMA DIAS²; AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG³

¹Universidade Federal de Pelotas – bruno.nascimento1227@gmail.com 1

¹Universidade Federal de Pelotas – suzaneolachea@gmail.com 1

²Universidade Federal de Pelotas – samukrc17@gmail.com 2

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

²Universidade Federal de Pelotas – amiltonseixas@gmail.com 2

³Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com 3

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii (Ab) é considerada a espécie mais significativa do gênero *Acinetobacter* e têm se manifestado como um agente oportunista que afeta principalmente indivíduos com sistema imunológico comprometido, que estão hospitalizados em unidades de terapia intensiva (UTI) e ligados a casos com dispositivos invasivos (respiradores e cateteres) (NEETHU et al., 2018). Além disso, a capacidade de sobreviver por longos períodos em superfícies, o desenvolvimento de resistência à antibióticos e a habilidade de formar biofilme contribuem para a sua disseminação e persistência no ambiente hospitalar (HARDING et al., 2018).

O meropenem pertence à classe dos carbapenêmicos e têm sido bastante utilizado no tratamento de infecções por Ab multirresistente (MDR), devido à sua eficácia e amplo espectro de ação, é frequentemente usado para tratar infecções graves, como pneumonia, infecções do trato urinário e infecções da pele (BERGOGNE; TOWNER, 1996; WEINBREN et al., 1998; LEVIN et al., 1999; KO et al., 2004). Os tratamentos antimicrobianos atuais frequentemente apresentam baixa efetividade na eliminação dos micro-organismos presentes nos biofilmes, e, como resultado, uma resposta inflamatória crônica local é quase sempre desencadeada como reação à formação do biofilme (TURNER et al., 2009).

Desta maneira, a nanotecnologia surge como uma opção no desenvolvimento de novos antimicrobianos ou de estratégias inovadoras de tratamento (LEE; KO; HSUEH, 2019). As nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser promissoras, devido à sua significativa e comprovada propriedade antimicrobiana (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018). Adicionalmente, as nanopartículas biogênicas (Bio-AgNP) em conjunto com os antibacterianos são eficazes contra cepas bacterianas resistentes no combate a várias infecções (SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018, ALLEND et al., 2022). Considerando o mencionado anteriormente, o presente estudo tem como objetivo avaliar a destruição do biofilme formado por cepas de *A. baumannii* diante da ação da Bio-AgNP e meropenem sozinhos e associados.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes da bactérioteca do Laboratório de Bacteriologia e

Bioensaios (LaBBio) da UFPel. Esses isolados foram previamente caracterizados molecularmente e fenotipicamente, possuindo diferentes padrões genéticos (FREITAS et al., 2020). Os isolados selecionados foram mantidos a -20°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 10% de glicerol, sendo reativados e semeados em ágar MacConkey (HIMEDIA®) 24 h antes dos ensaios. A Bio-AgNP utilizada em nosso estudo foi obtida pelo método biológico de síntese que consistiu na redução do nitrato de prata pelo fungo *Fusarium oxysporum* cepa 551 no Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil) (DURÁN et al., 2005). A capacidade de formação do biofilme dos isolados de *A. baumannii* foi determinada anteriormente por Freitas et al., 2020. Todos os isolados utilizados são fortes formadores de biofilme. Para a avaliação da atividade antibiofilme foram utilizados quatro isolados clínicos de *A. baumannii* multirresistente e uma cepa padrão ATCC® 19606™ e seguiu Halicki et al., 2019 com modificações. Para o ensaio de ruptura do biofilme, a etapa de formação do biofilme bacteriano foi previamente realizada e as células aderidas foram expostas a concentração de $2\times$ MIC dos compostos (meropenem, Bio-AgNP e a combinação meropenem/Bio-AgNP) para avaliar a capacidade de destruir o biofilme bacteriano. Os isolados e cepa padrão foram cultivados em ágar MacConkey (HIMEDIA®), e uma suspensão bacteriana de cada isolado e cepa de *A. baumannii* foi preparada em BHI. Cem microlitros da suspensão foram transferidos para microplacas de fundo plano de poliestireno de 96 poços e, em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para formação de biofilme. Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a lavagem foi realizada com $1\times$ PBS para eliminar as células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 100 mL de BHI contendo a concentração de $2\times$ MIC dos compostos. As placas foram reincubadas por mais 24h a 37°C e foram realizadas as etapas de lavagem, fixação e coloração do biofilme, e a quantificação da formação do biofilme foi realizada pela medida da densidade óptica a 540 nm (OD). A análise estatística foi realizada por análise de variância de duas vias (ANOVA) usando um valor de probabilidade de $p < 0,05$ usando o software GraphPad Prism 8.2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de formação de biofilme de isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* foram calculados com base nas réplicas e triplicatas biológicas do experimento e são expressos como a média. Os resultados da formação de biofilme foram interpretados e classificados como não formadores ($\text{OD} \leq \text{ODc}$), formadores de biofilmes fracos ($\text{DOc} < \text{DO} \leq 2\times\text{DOc}$), moderados ($2\times\text{DOc} < \text{DOc} \leq 4\times\text{DOc}$) e fortes ($\text{OD} \geq 4\times\text{DOc}$). Todos os isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* foram classificados como fortes formadores de biofilme. A atividade antibiofilme de meropenem e Bio-AgNP isoladamente e em combinação usando a concentração de $2\times$ MIC contra isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* demonstram atividade de ruptura do biofilme e são mostrados na Figura 1. Os isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii* mostraram uma variação de 22% a 50% na ruptura do biofilme formado quando meropenem/Bio-AgNP foi combinado, exceto Ab47. No entanto, a maior capacidade de romper o biofilme ocorreu para Ab2 (76%) quando o meropenem foi usado sozinho. Enquanto isso, as maiores porcentagens de destruição 55,6% e 42,4% foram obtidas usando Bio-AgNP sozinho contra Ab13 e Ab47, respectivamente. HU et al. (2021) mostraram que a combinação de Bio-AgNP e domiphen produziu efeitos inibitórios sinérgicos na erradicação de biofilmes

de *A. baumannii*, indicando que a combinação poderia exercer efeitos antimicrobianos sinérgicos pela erradicação da biomassa de biofilmes patogênicos.

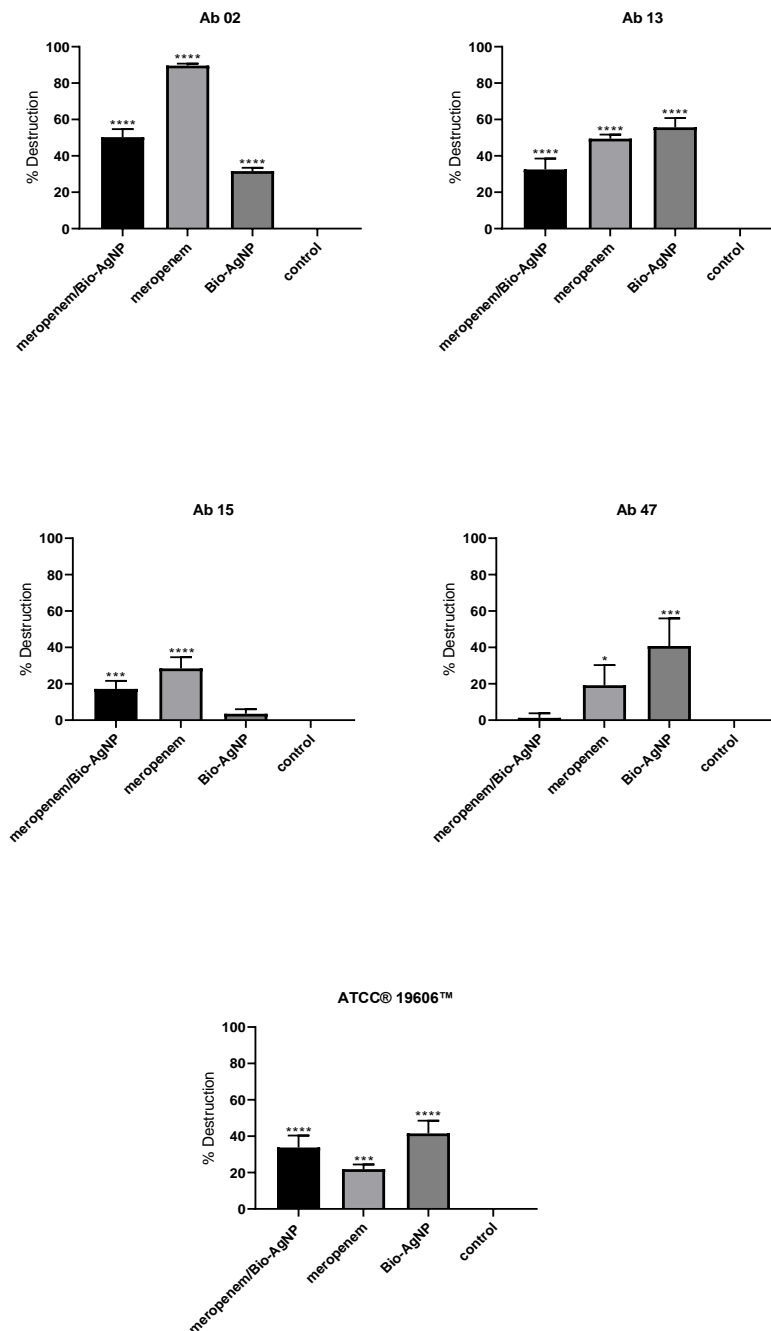


Figura 1. Capacidade de ruptura de biofilme por meropenem e Bio-AgNP: tratamento sozinho e em combinação com 2x MIC para isolados e ATCC® 19606™ de *A. baumannii*.

4. CONCLUSÕES

Dessa forma, é possível concluir que a associação de Bio-AgNP com o meropenem, assim como os compostos de forma isolada, demonstraram efeitos

significativos na destruição do biofilme frente à cepa ATCC® 19606™ e isolados multirresistentes de *A. baumannii*, evidenciando atividade antibiofilme.

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, n. 2, p. 1036– 1047, 2022.
- BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.
- HARDING, C.M., HENNON, S.W., & FELDMAN, M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 91– 102, 2018.
- KO, Wen-Chien et al. In vitro and in vivo activity of meropenem and sulbactam against a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 393-395, 2004.
- 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.
- LEVIN, Anna S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 5, p. 1008-1011, 1999.
- 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.
- SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles 751 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.
- WEINBREN M. J et al. *Acinetobacter spp.* isolates with reduced susceptibilities to carbapenems in a UK burns unit. **J Antimicrob Chemother**, v. 41, n. 5, p. 574 – 576, 1998.