

## EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ASSOCIADAS A METAIS EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Isabel Rodrigues Soares<sup>1,2</sup>, Sônia Khouri Sibelino<sup>2</sup>, Guilherme Rodrigues Teodoro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Golden Technology Ltda/Centro de Estudos e Análises Microbiológicas (CEAM), Avenida Shishima Hifumi, 2911, Bloco 09, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, isabelsoares2002@gmail.com; guilherme@goldentecnologia.com

<sup>2</sup>Universidade do Vale do Paraíba Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, isabelsoares2002@gmail.com; soniak@univap.br

### Resumo

Micro-organismos multirresistentes se tornaram uma ameaça global, com cada vez mais medicamentos convencionais perdendo sua eficácia. Com isso, existe a necessidade de novas alternativas para tratamento das infecções, dentre elas a utilização de nanopartículas (NP) de dióxido de titânio associadas a íons metálicos (TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn). O presente estudo possui como objetivo avaliar a ação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn contra as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM). Para tal, utilizou-se o documento M07 do CLSI para realização de microdiluição em caldo para da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das NP frente aos micro-organismos. Foram obtidos resultados de CIM e CBM entre 12,5 mg/mL e 50 mg/mL, evidenciando sua efetividade contra as espécies testadas. Com isso, concluiu-se que as NPs de TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn podem representar uma alternativa em potencial para tratamento de infecções por micro-organismos multirresistentes, entretanto ainda são necessários mais estudos sobre o tema.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Dióxido de titânio. Micro-organismos multirresistentes.

**Área do Conhecimento:** Biomedicina – Microbiologia

### Introdução

Micro-organismos multirresistentes são considerados uma ameaça global à saúde (OMS, 2023), sendo uma das mais preocupantes questões de saúde pública nas últimas décadas, aumentando a cada ano, conforme as cepas se tornam resistentes a mais antimicrobianos. Nos últimos anos, cerca de 4,95 milhões de óbitos no mundo associados à infecções por bactérias multirresistentes (MURRAY *et al.*, 2022). A multirresistência diz respeito à capacidade desenvolvida por alguns patógenos, como bactérias e fungos, de sobreviver a tratamentos com antimicrobianos que normalmente os matariam ou reduziria seu crescimento (O'NEIL, 2016), fazendo com que as infecções se tornem mais difíceis de tratar (SANYAOLU *et al.*, 2022).

Entre os micro-organismos que representam grande desafio na luta contra a multirresistência, destaca-se o grupo de bactérias ESKAPE, que está associado a uma alta taxa de mortalidade e engloba os gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Actinobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacter* (MBA; NWEZE, 2021). Destes, as espécies Gram-negativas KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) e *Acinetobacter baumannii* possuem importância significativa em infecções nosocomiais. No caso de bactérias Gram-positivas, a espécie *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) também se mostra de grande relevância, devido ao seu impacto clínico significativo (ROSSOLINI *et al.*, 2014).

Com os medicamentos convencionais perdendo sua efetividade contra patógenos, novas alternativas para tratamento vêm sendo estudadas, sendo uma delas o uso de nanopartículas. Nanopartículas (NPs) são moléculas de um ou mais metais que apresentam características morfológicas e físico-químicas variadas conforme os elementos presentes, sendo que alguns metais, como titânio, prata, cobre, entre outros, demonstraram possuir atividade antimicrobiana, microbicida e/ou microbistática contra bactérias, fungos, leveduras e até vírus (GHARPURE; AKASH; ANKAMWAR, 2020). Nanopartículas como dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), por exemplo, são bastante estudadas e acredita-

# A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

se que suas ações antimicrobianas incluem a formação de espécies reativas de oxigênio e dano à parede celular (GHARPURE; AKASH; ANKAMWAR, 2020). Os exatos mecanismos destes efeitos ainda estão a ser estudados, porém são comumente observados. No combate a bactérias, mais especificamente, acredita-se que, além da geração de espécies reativas de oxigênio, há inativação de vias de sinalização celular e dano na membrana celular, podendo tais efeitos serem intensificados quando associadas as NPs à exposição à luz ultravioleta (ALLAHVERDIYEV *et al*, 2011; MBA; NWEZE, 2021).

Levando-se em conta que as nanopartículas podem ser possíveis aliadas para o tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, devido ao seu potencial antibacteriano observado na literatura, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de nanopartículas de dióxido de titânio associadas a outros elementos metálicos contra os micro-organismos multirresistentes *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), visando um novo método de combate à ameaça da multirresistência em patógenos.

## Metodologia

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi avaliada com uma solução de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) associadas a íons de prata (Ag), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), abreviado como TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn, de acordo com o documento M07 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com algumas adaptações (CLSI, 2018).

As nanopartículas foram disponibilizadas pela empresa Golden Technology Ltda. O preparo das NPs se deu a partir de uma solução aquosa de 100 mg/mL que foi diluída 1:1 em caldo Triptona de Soja (TSB) 2x concentrado e esterilizada com filtração a 0,22 µm, obtendo-se uma solução de 50 mg/mL da nanopartícula em meio de cultura.

Sequencialmente, um inóculo inicial foi preparado. Para tal, uma colônia isolada em ágar Triptona de Soja (TSA) proveniente de uma cultura de cerca de 24 horas a 35-37°C de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) NCTC 13552, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) NCTC 13440 e *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304, foram diluídas em 10 mL de TSB e incubadas *overnight* em agitador orbital a 35-37°C.

Para microdiluição, 100 µL de TSB foram pipetados entre as colunas 2 e 12 de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 200 µL da solução de nanopartícula anteriormente preparada foi pipetada na coluna 1 da microplaca e diluições seriadas base 2 foram realizadas até a coluna 10. Finalmente, 5 µL do inóculo inicial foi pipetado em todos os orifícios da placa. Como controle positivo, utilizou-se hipoclorito de sódio a 2,5%. Desta maneira, foram definidos para a análise as concentrações de nanopartículas entre 50 e 0,025 mg/mL (colunas de 1 a 10) e como controles positivo e negativo respectivamente as colunas 11 e 12. As microplacas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas. Para confirmação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), subculturas de cerca de 3 µL foram realizadas em placas de TSA, que foram incubadas a 35-37°C por 24 horas. A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em relação ao controle negativo e a CBM foi a menor concentração capaz de eliminar o crescimento microbiano também em relação ao controle negativo.

## Resultados

Após realizadas as subculturas e incubadas por 24 horas, foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e/ou a Concentração Bactericida Mínima (CBM) para cada espécie estudada, sendo estas demonstradas na Tabela 1.

# A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

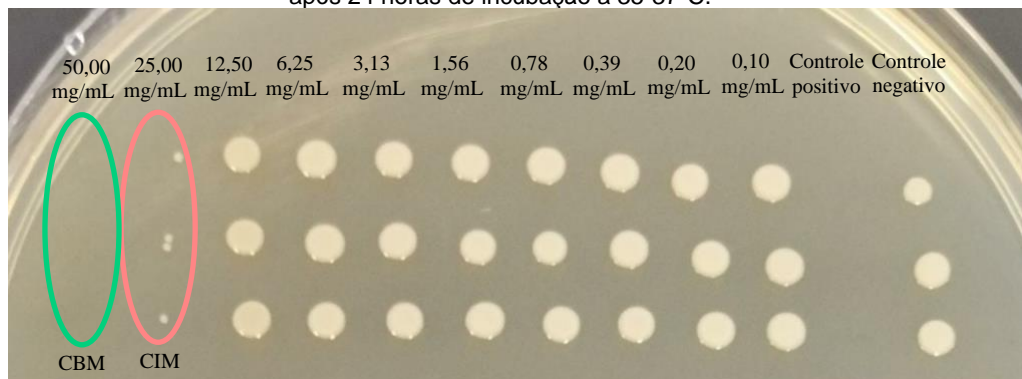
Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) associadas a íons de prata (Ag), Cobre (Cu) e Zinco (Zn) verificada contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM) NCTC 13552, *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) NCTC 13440 e *Acinetobacter baumannii* NCTC 13304

Micro-organismo	CIM	CBM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25 mg/mL	50 mg/mL
KPC	-	25 mg/mL
SARM	12,5 mg/mL	50 mg/mL

Fonte: o autor.

Como observado na subcultura em ágar TSA (Figura 1), para *Acinetobacter baumannii*, observou-se acentuada inibição do crescimento bacteriano na coluna onde a concentração de nanopartículas foi de 25 mg/mL e ausência total do micro-organismo em 50 mg/mL.

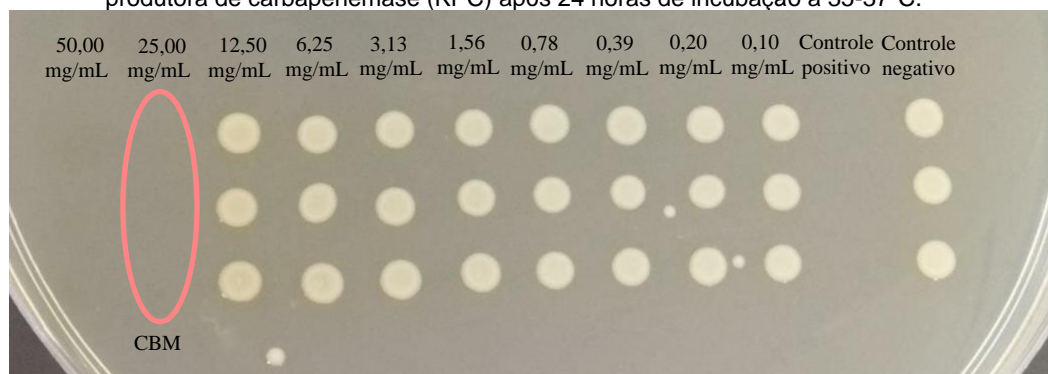
Figura 1 – Representação da subcultura em ágar Triptona de Soja (TSA) de *Acinetobacter baumannii*, após 24 horas de incubação a 35-37°C.



CBM: Concentração Bactericida Mínima; CIM: Concentração Inibitória Mínima. Fonte: o autor.

No caso de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), obteve-se ausência completa de crescimento já na concentração de 25 mg/mL, não havendo concentração que apresentasse inibição parcial, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Representação da subcultura em ágar Triptona de Soja (TSA) de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) após 24 horas de incubação a 35-37°C.

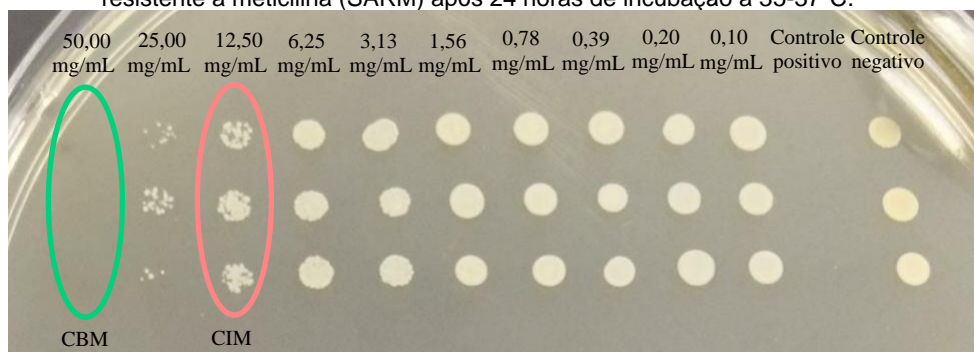


CBM: Concentração Bactericida Mínima. Fonte: o autor.

Para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), conforme a Figura 3, foi observada redução discreta do crescimento microbiano na coluna correspondente à concentração de 12,5 mg/mL, com efeito mais acentuado na concentração de 25 mg/mL, e, por fim, nenhum crescimento com 50 mg/mL.

# A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 3 – Representação da subcultura em ágar Triptona de Soja (TSA) de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (SARM) após 24 horas de incubação a 35-37°C.



CBM: Concentração Bactericida Mínima; CIM: Concentração Inibitória Mínima. Fonte: o autor.

## Discussão

No presente estudo, as nanopartículas (NPs) utilizadas eram compostas por  $\text{TiO}_2\text{-Ag-Cu-Zn}$ , cujos efeitos antimicrobianos dos metais individualmente já foram demonstrados na literatura, incluindo algumas combinações, evidenciando seu potencial para tratamento de infecções de micro-organismos resistentes (GHARPURE; AKASH; ANKAMWAR, 2020). Entretanto, não são abundantes na literatura estudos com a combinação específica utilizada neste trabalho.

Para *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, há relatos na literatura corroborando com o efeito antibacteriano de NPs de  $\text{TiO}_2$  puro observados neste trabalho, apesar de utilizar metodologia e unidades de medida diferentes. Entretanto, melhores resultados foram obtidos com a associação de NPs de  $\text{TiO}_2$  com vancomicina (ULLAH *et al*, 2020). Tal efeito de sinergismo contra SARM também foi relatado com NPs de prata pura associadas a peptídeos antimicrobianos (MASIMEN *et al*, 2022). De modo semelhante ao presente artigo, NPs de  $\text{TiO}_2$  associadas a cobre apresentaram efeito bactericida contra SARM melhores do que NPs de  $\text{TiO}_2$  puro, apesar de também utilizar diferentes métodos (HAENLE *et al*, 2011).

Neste estudo, os testes com a cepa *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) obtiveram valores de CBM em 25 mg/mL, sendo os melhores resultados bactericidas do presente estudo. Ação semelhante foi observada em KPC com NPs de óxidos de zinco ( $\text{ZnO}$ ), tendo, entretanto, os efeitos antimicrobianos em concentrações menores e os testes não associadas a  $\text{TiO}_2$  (RASHA *et al*, 2021). Já para outras cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, um estudo com NPs de prata isoladas ou associadas a  $\text{TiO}_2$  resultaram em um promissor efeito antibacteriano em concentrações inibitórias a partir de 0,350 mg/mL até 2,6 mg/mL, sendo estes menores que os valores encontrados no presente estudo (KAREEM; ALSAMMAK, 2017). Contudo, são escassos na literatura trabalhos sobre a ação de NPs de  $\text{TiO}_2$  associadas ou não a outros metais contra KPC especificamente.

O presente estudo evidenciou a ação antibacteriana de nanopartículas de  $\text{TiO}_2\text{-Ag-Cu-Zn}$  contra *Acinetobacter baumannii*. Apesar de utilizarem metodologia dissemelhante, outro trabalho também obteve ação antimicrobiana contra *A. baumannii*, porém os resultados de CIM e CBM foram significativamente maiores do que os encontrados nesta pesquisa, chegando em até 125 mg/mL (ABDULAZEEM *et al*, 2019). No entanto, Hamza e Yaaqoob (2020) estudando NPs de  $\text{TiO}_2$ , e também utilizando metodologia diferente para determinação da atividade antimicrobiana, obtiveram valores de CIM contra *A. baumannii* em torno de 0,008 mg/mL. A menor CIM encontrada no presente estudo foi contra *A. baumannii*. É possível assim evidenciar que a NP de  $\text{TiO}_2\text{-Ag-Cu-Zn}$  possui um promissor efeito contra tal micro-organismo. Semelhantemente, Masoumi *et al* (2018) observou melhores resultados de NPs de  $\text{TiO}_2$  associada a  $\text{ZnO}$  do que as mesmas NPs isoladas.

Neste trabalho, as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  não foram submetidas à exposição à luz ultravioleta (UV), apesar de ser um procedimento comumente associado a este composto, visto que há evidência robusta de que, quando estimulada, sua propriedade fotocatalítica resulta em melhor efeito antibactericida do que sem luz UV (ALLAHVERDIYEV *et al*, 2011; GHARPURE; AKASH; ANKAMWAR, 2020). Além disso, deve-se ressaltar que para cada estudo, as nanopartículas utilizadas foram obtidas de maneiras

# A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

diferentes, o que pode ser outro possível fator que diferencie os resultados. Da mesma forma, a concentração de TiO<sub>2</sub> na nanopartícula quando comparada a dos outros metais associados também pode ser um fator relevante para os resultados obtidos. Novos estudos comparando TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn em diferentes concentrações devem ser realizados, um vez que na literatura são limitados os estudos com esta combinação.

## Conclusão

Com este estudo foi possível concluir que a nanopartícula de dióxido de titânio associadas a outros elementos metálicos (TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn), apresentou ação antimicrobiana próspera contra os micro-organismos *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Contudo, ainda são necessárias mais pesquisas acerca deste assunto para melhor compreender os possíveis mecanismos de ação das NP nos micro-organismos em questão bem como estudar diferentes concentrações de cada elemento afim de otimizar os efeitos antimicrobianos para então sugerir a utilização de NPs TiO<sub>2</sub>-Ag-Cu-Zn como uma possível alternativa para combate a micro-organismos multirresistentes.

## Referências

- ABDULAZEEM, L. *et al.* Titanium dioxide nanoparticles as antibacterial agents against some pathogenic bacteria. **Drug Invention Today**, v. 12, n. 5, p. 963-967, 2019.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. *et al.* Antimicrobial effects of TiO<sub>2</sub> and Ag<sub>2</sub>O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. **Future microbiology**, v. 6, n. 8, p. 933-940, 2011.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th ed. CLSI standar M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- GHARPURE, S.; AKASH, A.; ANKAMWAR, B. A review on antimicrobial properties of metal nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 20, n. 6, p. 3303-3339, 2020.
- HAENLE, M. *et al.* An extended spectrum bactericidal titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) coating for metallic implants: in vitro effectiveness against MRSA and mechanical properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 381-387, 2011.
- HAMZA, M. R.; YAAQOOB, L. A. Evaluation the effect of green synthesis titanium dioxide nanoparticles on *Acinetobacter baumannii* isolates. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences**, v. 51, n. 6, 2020.
- HUANG, T. *et al.* Using inorganic nanoparticles to fight fungal infections in the antimicrobial resistant era. **Acta Biomaterialia**, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706123000181>. Acesso em 10 jul. 2023.
- KAREEM, P. A.; ALSAMMAK, E. G. The effect of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Klebsiella pneumoniae* isolates multi resistant to antibiotics and observed by scanning electron microscopy. **Cihan Univ Sci J**, v. 2017, n. Special-2, p. 284-297, 2017.
- MASIMEN, M. A. A. *et al.* Overcoming methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) using antimicrobial peptides-silver nanoparticles. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 951, 2022.
- MASOUMI, S. *et al.* Evaluation synergistic effect of TiO<sub>2</sub>, ZnO nanoparticles and amphiphilic peptides (Mastoparan-B, indolicidin) against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, 2018.

# A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Nanoparticles as therapeutic options for treating multidrug-resistant bacteria: Research progress, challenges, and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-30, 2021.

MURRAY, C. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext?ref=healthtips.kr](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext?ref=healthtips.kr). Acesso em 5 jul. 2023.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations**. 2016.

Organização Mundial da Saúde. **Resistência antimicrobiana**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em 5 jul. 2023.

RASHA, E. *et al.* Effects of zinc oxide nanoparticles synthesized using *Aspergillus niger* on Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* in vitro and in vivo. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 748739, 2021.

ROSSOLINI, G. M. *et al.* Update on the antibiotic resistance crisis. **Current opinion in pharmacology**, v. 18, p. 56-60, 2014.

SANYAOLU, A. *et al.* Candida auris: an overview of the emerging drug-resistant fungal infection. **Infection & Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 236, 2022.

ULLAH, K. *et al.* Enhancing the antibacterial activity of erythromycin with titanium dioxide nanoparticles against MRSA. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 948-954, 2020.

## Agradecimentos

O presente trabalho agradece ao CDLAB da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba e ao Centro de Estudos e Análises Microbiológicas (CEAM), da empresa Golden Technology Ltda pelo suporte logístico e financeiro para realização dos estudos.