



Site:
inicepg.univap.br
20 A 22 DE OUTUBRO

CIÊNCIA, SAÚDE E TECNOLOGIA:
AGENTES DE TRANSFORMAÇÃO E
CONSCIENTIZAÇÃO DA SOCIEDADE

ESTUDO DA AÇÃO ANTI-BIOFILME DA ANTIBIOTICOTERAPIA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM *Staphylococcus aureus*

Flávia Sant'Anna Dela Rosa, Thaís da Silva Veriato, Leandro Raniero, Maiara Lima Castilho.

Laboratório de Bionanotecnologia, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, flavia.sdelarosa@gmail.com, thaissveriato@gmail.com, Iraniero@univap.br, mcastilho@univap.br.

Resumo

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria gram-positiva, patogênica, responsável por vários tipos de infecções em ambiente nosocomial, sendo capaz de formar biofilme em superfícies orgânicas e inorgânicas. Com a maturação do biofilme, o mesmo adota uma forma tridimensional, o qual impacta diretamente em sua virulência, ocasionando resistência aos antibióticos. Dessa forma, a procura por novas alternativas para controlar essa resistência torna-se fundamental. Neste âmbito, nanopartículas de prata (AgNPs) têm apresentado grande potencial como um inibidor antimicrobiano, impedindo a formação de biofilmes. Assim, o objetivo deste estudo foi aplicar AgNPs associada ao antibiótico vancomicina em biofilmes de *S. aureus*, visando a potencialização do tratamento pela presença das AgNPs. O grupo tratado com a associação do antibiótico e das AgNPs apresentou uma redução significativa em todas as concentrações testadas, evidenciando que a presença das nanopartículas potencializa o efeito de tratamento podendo ser utilizada como um tratamento alternativo.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, vancomicina, nanopartículas de prata.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Biomedicina.

Introdução

Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos é um dos problemas mais relevantes de saúde pública, uma vez que bactérias anteriormente suscetíveis a tratamentos por antibióticos usuais deixaram de responder aos mesmos agentes. O desenvolvimento dessa resistência aos antibióticos é considerado um fenômeno natural e resultante da pressão seletiva exercida pelo uso inadequado destes fármacos, existindo uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (LOUREIRO et al., 2016).

As infecções hospitalares são relevantes devido a sua frequência, morbidade e mortalidade, destacando-se as infecções provenientes da bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (LIMA et al., 2015). Essa bactéria possui a capacidade de invadir e sobreviver no interior das células que realizam fagocitose, se evadem da resposta imunológica e são capazes de formar biofilme nas superfícies orgânicas, como nas mucosas de vários tecidos, e em superfícies inorgânicas, como próteses e cateteres (BOSCARIOL; OUCHI; PEREIRA, 2018). Os biofilmes são agregados de microrganismos, podendo ter mais de uma espécie em sua composição, em que a adesão a um substrato é mantida por interações físico-químicas envolto por uma matriz (CAIXETA et al., 2019). Com a maturação do biofilme, o mesmo adota uma forma tridimensional, impactando diretamente em sua virulência. O aumento da virulência causa impacto na resistência aos antibióticos. As razões responsáveis por essa resistência incluem a inserção limitada do agente antibiótico pela matriz do biofilme, a alteração da taxa de crescimento dos microrganismos que o compõe e outras alterações fisiológicas (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

A vancomicina tem sido utilizada a mais de 50 anos e ainda tem se mostrado em evidência entre os agentes antimicrobianos. Este antibiótico é considerado um agente bactericida devido a sua habilidade de interromper e inibir a síntese da parede celular (HICKS; HERNANDEZ, 2011). O uso deste antibiótico está direcionado para o tratamento de vários microrganismos aeróbios e anaeróbios gram-positivos bem como para o tratamento de infecções graves causadas por organismos que não respondem a



outros agentes antimicrobianos (SILVA; TERRA, 2017). A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação dos agentes antimicrobianos. A crescente incidência de bactérias resistentes tem limitado o uso terapêutico dos antibacterianos existentes (SILVA, 2013).

Neste contexto, a procura por novas alternativas que busquem combater essa resistência é urgente e fundamental. A nanotecnologia apresenta-se como uma alternativa, sendo utilizada na medicina e apresentando grande interesse por destruir ou reduzir a atividade de vários microrganismos. Há um grande potencial nas nanopartículas de prata (AgNPs) devido às suas propriedades notáveis como área superficial elevada e excelente atividade antimicrobiana, se tornando uma alternativa para redução da adesão bacteriana e prevenção da formação de biofilmes (FREIRE et al., 2018). Assim, o presente estudo visou estudar a eficiência da associação da antibioticoterapia com as nanopartículas de prata como um método alternativo para o tratamento em biofilmes formados por *S. aureus* com o objetivo de potencializar a ação do tratamento pela presença das AgNPs, como um método alternativo ao convencional.

Metodologia

Diluição e Caracterização da vancomicina

A solubilização da solução estoque do antibiótico vancomicina seguiu a normativa descrita pela *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, em que o fármaco deve ser diluído em água ultrapura na concentração de 1 mg/mL. A caracterização do antibiótico foi realizada pela Espectroscopia UV-Visível a fim de garantir a integridade do fármaco.

Síntese das Nanopartículas de Prata

Na síntese de nanopartículas foram utilizados protocolos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa, no qual está baseado na metodologia descrita por Solomon et al. (2007). As vidrarias foram lavadas com água régia na proporção 1:3 de ácido nítrico (HNO_3) e ácido clorídrico (HCl) para remoção de metais contaminantes. As concentrações dos reagentes foram calculadas baseadas na relação estequiométrica de duas partes de borohidreto para uma parte de nitrato de prata (AgNO_3). Assim, uma solução de 30 mL de borohidreto de sódio contida em um Erlenmeyer foi resfriada em um banho de gelo, sobre uma placa magnética de agitação constante. A solução de AgNO_3 foi adicionada a reação até a formação das nanopartículas. A solução coloidal foi armazenada ao abrigo da luz em temperatura ambiente até sua aplicação.

Cultura Bacteriana

As cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram reativadas em 5 ml de caldo de enriquecimento BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi®) em tubo de ensaio de vidro com rosca por 24 horas a 35°C em estufa bacteriológica. O repique das cepas foi realizado com o auxílio de alça de platina em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi®) por meio da semeadura por esgotamento e incubadas a 35°C por 24 horas para o crescimento. A preparação do inóculo foi realizada por meio do turbidímetro e ajustada para a escala 0,5 *McFarland* em solução fisiológica. Os experimentos microbiológicos foram realizados em duplicatas experimentais a partir da segunda passagem da cepa utilizando os mesmos parâmetros de crescimento bacteriológico.

Formação do Biofilme

Na formação do biofilme, o protocolo utilizado foi baseado na metodologia adaptada descrita por Caixeta et al. (2019), em que foi adicionado em placas de 96 poços de poliestireno o inóculo em suspensão de 10^7 UFC/mL em caldo BHI por 48h a 35°C. Após este período, os poços, exceto o controle positivo, foram expostos a diferentes concentrações do antibiótico vancomicina associados com as AgNPs. O método utilizado para o experimento foi de microdiluição da droga em caldo partindo da concentração inicial de 16 µg/mL e a concentração das AgNPs foram mantidas constantes para todos os grupos. Um grupo tratado somente com o antibiótico foi utilizado como padrão para a comparação da associação utilizada. A fim de garantir a esterilidade das drogas utilizadas foi realizado um grupo controle negativo utilizando a droga de menor concentração adicionada ao caldo. A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 35°C por 24h para avaliação da biomassa e para coleta das micrografias.



Avaliação da Biomassa

A avaliação da biomassa foi realizada pela leitura em densidade óptica gerada pela marcação do biofilme com o cristal violeta, seguindo a metodologia adaptada de Caixeta et al. (2019). Assim, após o tratamento dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com solução fisiológica estéril, em seguida foi adicionado o metanol por 10 minutos a fim de fixar o biofilme. O metanol foi então removido e foi adicionado 200 µL de cristal violeta a 1% (V/V) (*NewProv®*) por 10 minutos. Decorrido o tempo, o cristal violeta foi removido e seu excesso foi lavado com solução fisiológica estéril. A leitura de densidade óptica foi realizada no Espectrofotômetro *Synergy HTX Multi-Detection Microplate Reader* (*BioTek Instruments, USA*), no comprimento de onda de 570 nm, realizado no Laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP, após a solubilização do cristal violeta com ácido acético a 33% (V/V).

Micrografias do Biofilme

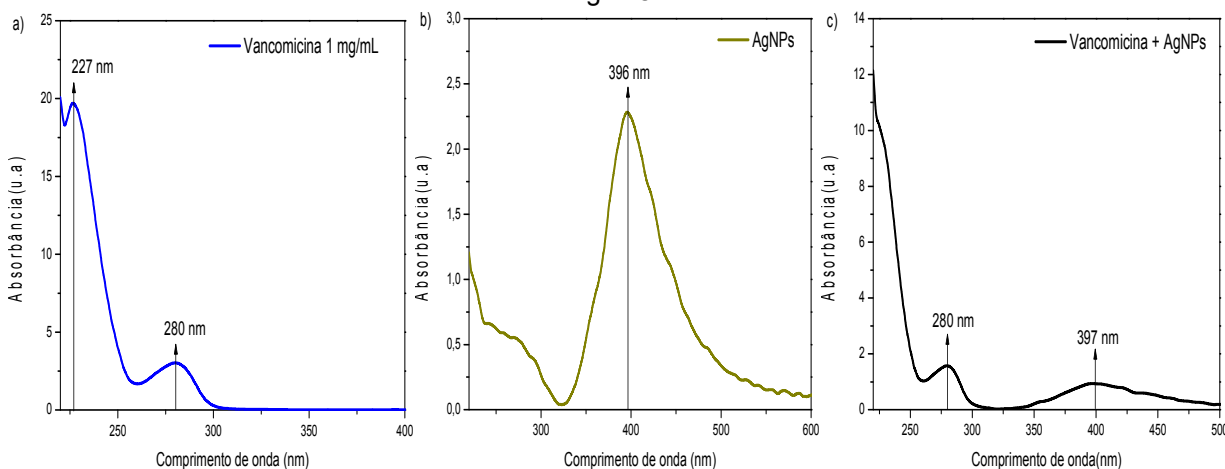
As micrografias do biofilme de *S. aureus* foram obtidas utilizando uma câmera acoplada ao microscópio óptico invertido (Zeiss® - Axio Vert A1), no Laboratório de Fotobiologia Aplicada à Saúde do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UNIVAP. A aquisição foi realizada após a coloração do biofilme com o cristal violeta. Assim, o tratamento dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com solução fisiológica estéril, em seguida foi adicionado o metanol por 10 minutos a fim de fixação do biofilme. O metanol foi então removido e foi adicionado 200 µL de cristal violeta a 1% (V/V) (*NewProv®*) por 10 minutos. Decorrido o tempo, o cristal violeta foi removido e seu excesso foi lavado com solução fisiológica estéril para a aquisição das micrografias.

Resultados

Caracterização do antibiótico e das AgNPs

Os espectros da vancomicina, das AgNPs e da associação entre eles estão mostrados na Figura 1. O espectro característico do antibiótico evidencia a presença das bandas de ressonância plasmônica em 227 nm e 280 nm, observando um espectro de absorção característico da droga. As AgNPs apresentaram uma banda única de ressonância plasmônica centrada em 396 nm, o que corresponde diretamente à sua forma, tamanho e concentração. A associação das nanopartículas com a vancomicina resultou na somatória das bandas como pode ser visto no espectro UV-visível, no qual apresenta absorção em 280 nm e 397 nm, caracterizando a presença do antibiótico e das AgNPs.

Figura 1 - Espectro UV-Visível: a) Antibiótico, b) AgNPs e c) Associação entre a vancomicina + AgNPs.



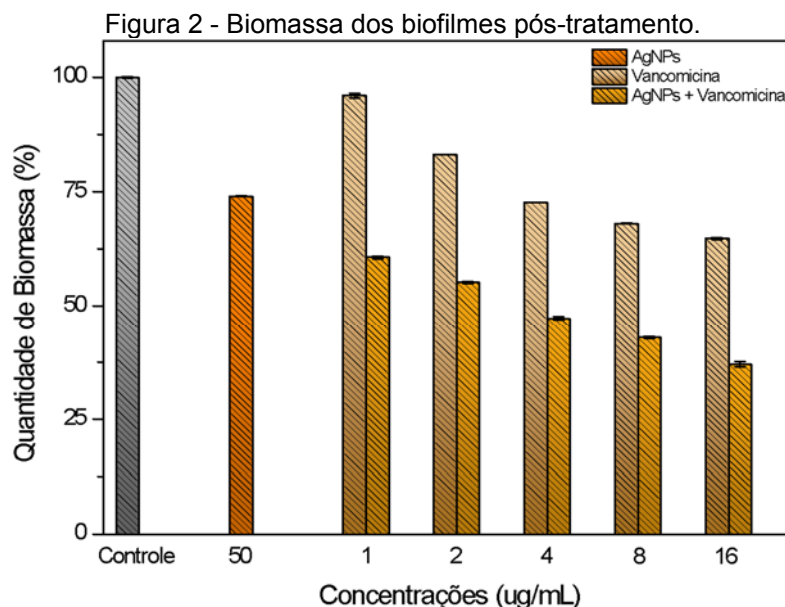
Fonte: A autora.

Quantificação da biomassa pós-tratamento



O método por cristal violeta foi utilizado para quantificar a biomassa total do biofilme, como mostra a Figura 2. Após os tratamentos, observou-se que 74,9% da biomassa permaneceu íntegra para o grupo tratado somente com as AgNPs, apresentando uma baixa redução. Os grupos tratados com o antibiótico e vancomicina demonstraram uma eficácia na diminuição da biomassa total, sendo possível observar que quanto maior sua concentração, menor a biomassa restante. Ao correlacionar as cepas de *S. aureus* com o perfil de susceptibilidade da vancomicina determinado pelo CLSI (M100-S22), fica determinado que cepas que apresentam crescimento em concentrações superiores a 16 µg/mL são consideradas com o perfil de resistentes. Assim, o grupo tratado com 16 µg/mL apresentou uma biomassa de 64,8% se mostrando com baixa eficiência para a inibição da formação do biofilme. Na concentração de 1 µg/mL, 96,0% da biomassa total foi preservada, o qual observa-se que a efetividade de inibição é reduzida conforme a concentração.

Na associação entre a vancomicina e as nanopartículas de prata, foi observada uma potencialização significativa na redução da biomassa total. Na concentração de 16 µg/mL de vancomicina apenas 37,1% da biomassa foi preservada, apresentando uma redução significativa em relação ao grupo tratado somente com a vancomicina. Na concentração de 4 µg/mL 47,3% da biomassa foi preservada, pouco menos da metade, enquanto em 2 µg/mL 55,1% foi preservada. A menor concentração deste grupo, de 1 µg/mL apresentou 60,6% de biomassa íntegra, resultando em 39,3% de redução. Em resumo, a associação das AgNPs com o antibiótico resultou em um aumento de 1,6x de eficiência quando comparado ao grupo tratado apenas com antibiótico na mesma concentração. A partir disso, é possível observar que as nanopartículas trazem efeito significativo na redução do biofilme, principalmente em concentrações mais altas.

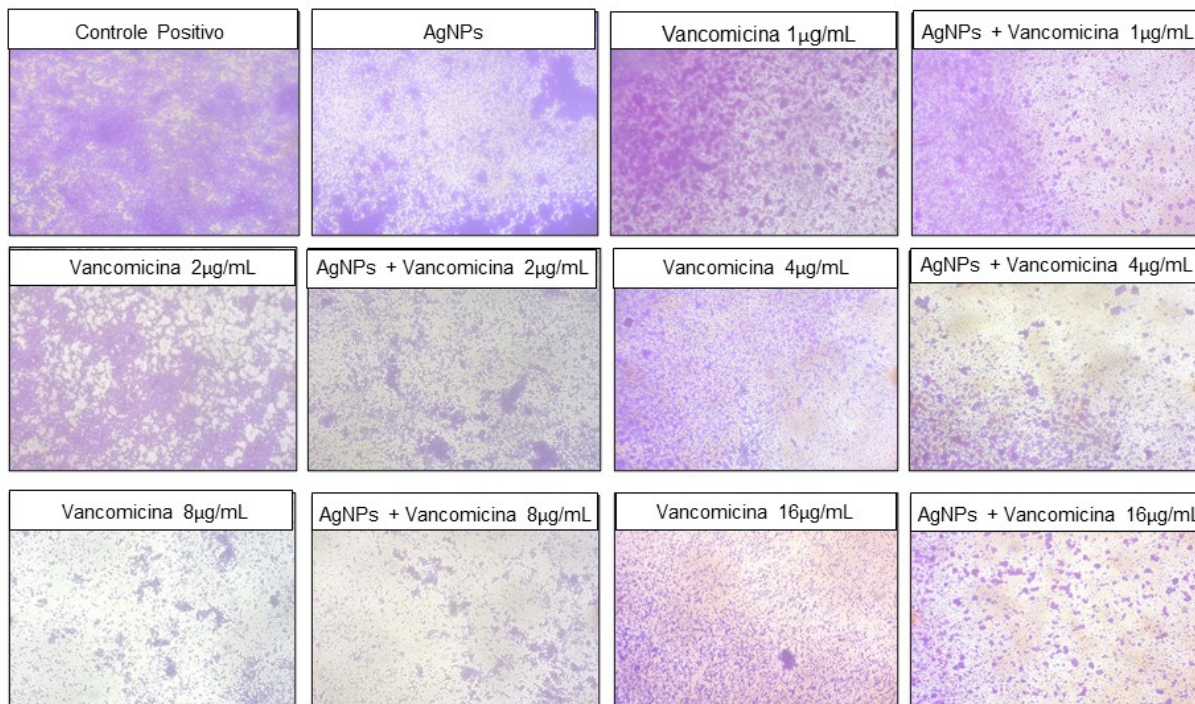


Fonte: A autora.

Micrografias dos biofilmes de *S. aureus*

As micrografias dos biofilmes foram realizadas após o tratamento utilizando à objetiva 10x (Figura 3) em microscópio óptico invertido (Zeiss® - Axio Vert A1), sendo possível visualizar a biomassa entre os tratamentos de acordo com as respectivas concentrações em relação ao grupo Controle e ao grupo tratado apenas com AgNPs.

Figura 3 - Biomassa de *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações.



Fonte: A autora.

Discussão

O efeito antibacteriano das AgNPs pode ser considerado devido ao seu menor tamanho de partículas, que possuem capacidade de penetração superior nas bactérias, exibindo efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Além disso, a vantagem do uso de AgNPs é sua baixa toxicidade, sendo considerada adequada para uso em aplicações clínicas e terapêuticas (DAKAL et al., 2016). O método de síntese das AgNPs por redução utilizando o borohidreto de sódio produz nanopartículas com carga superficial negativa e esta característica não impossibilitou a sua interação com o biofilme de *S. aureus*, interação observada na diminuição de sua biomassa (Figura 2).

A ação antimicrobiana da nanopartícula está ligada a quatro mecanismos bem definidos, começando pela adesão dos AgNPs na superfície da parede celular e membrana, inserção dos AgNPs no interior da célula, acarretando danos às estruturas intracelulares. Além disso, a nanopartícula de prata induz toxicidade celular e estresse oxidativo ocasionado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres e modulação das vias de transdução de sinal. O crescimento bacteriano é inibido e a nanopartícula é capaz de interagir com o DNA das células microbianas impedindo sua reprodução celular. O efeito antimicrobiano dos íons prata é proporcional a sua concentração, pois, quanto maior é a concentração de Ag^+ , maior é sua ação antimicrobiana (RAMIN, 2016). Neste trabalho, a concentração utilizada das AgNPs é considerada como baixa, porém ao serem associadas com a antibiótico foram capazes de apresentar efeito antimicrobiano sobre a biomassa total do biofilme de *S. aureus*.

O mecanismo de ação da vancomicina está relacionado à inibição da síntese da parede celular, em virtude da afinidade com a D-alanyl-D-alanine, que é um componente do peptidoglicano, composto presente na parede celular da bactéria, sendo considerado um agente bactericida (HICKS e HERNANDEZ, 2011; MACEDO, 2017). Assim, no grupo tratado com 16 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma pequena redução de biomassa se mostrando com baixa eficiência para a inibição da formação do biofilme, exibindo 35,22%. No entanto o grupo tratado com a associação das nanopartículas e do antibiótico para a mesma concentração apresentou resultado significativo, em que houve uma redução da biomassa de 60,26%, o que mostra a efetividade de potencialização do tratamento de biofilmes de *S. aureus*.

Conclusão



O tratamento de *S. aureus* com diferentes concentrações de vancomicina associada às AgNPs demonstrou que a menor concentração necessária para uma redução significativa da biomassa foi de 4 µg/mL, que apresenta uma redução de aproximadamente 50% da biomassa, exibindo um resultado satisfatório, determinado pela densidade óptica e corroborado pelas micrografias. Um resultado promissor quando relacionado ao grupo tratado apenas com vancomicina. Assim, é importante ressaltar que as AgNPs em concentrações mais baixas, como a de 50 µg/mL, apresentam efeito bactericida, o qual é potencializado quando associado ao antibiótico. Assim, a associação das AgNPs com a antibioticoterapia se torna um método alternativo ao convencional para o tratamento de biofilmes em cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, podendo ser aplicado futuramente em cepas resistentes.

Agradecimentos

Os autores deste presente estudo agradecem a agência de fomento FAPESP (2018/23898-6) e ao CNPq (144911/2018-3) pelo auxílio financeiro. Agradecemos ao Laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica e Laboratório de Fotobiológica Aplicada a Saúde pela infraestrutura para as análises de absorção do biofilme e para aquisição das micrografias, respectivamente.

Referências

- BOSCARIOL, R.; OUCHI, J. D.; PEREIRA, G. C. **Produção de biofilme por Staphylococcus Aureus**. Revista Saúde em Foco, v. Edição nº, p. 11–16, 2018.
- CAIXETA, M. et al. **Estudo Da Formação De Biofilmes Por Pseudomonas Aeruginosa**. Enciclopédia Biosfera, v. 16, n. 29, p. 1870–1880, 2019.
- DAKAL, T. C. et al. **Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles**. Front. Microbiol, v. 7, p. 1831, 2016.
- FREIRE, N. B. et al. **Antimicrobial and antibiofilm activity of silver nanoparticles against Aeromonas spp. isolated from aquatic organisms**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 38, n. 2, p. 244–249, 2018.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. **A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais - o estado da arte**. Arquivos de Medicina, v. 27, n. 1, p. 27–36, 2013.
- HICKS RW, HERNANDEZ J. **Perioperative pharmacology: a focus on vancomycin**, 2011.
- LIMA, M. F. P. et al. **Staphylococcus aureus And Nosocomial Infections - Literature Review**. Revista Uningá, v. 21, n. 2178–2571, p. 32–39, 2015.
- LOUREIRO, R. J. et al. **Use of antibiotics and bacterial resistances: Brief notes on its evolution**. Revista Portuguesa de Saúde Pública. Ediciones Doyma, S.L., 2016.
- NALWADE, A. R.; JADHAV, A. **Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of Daturaalba Nees. and evaluation of their antibacterial activity**. Scholars Research Library Archives of Applied Science Research, 2013.
- SILVA, R. S., TERRA, M. R. **Vancomicina - um antimicrobiano de importância nosocomial**. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research. vol.19, n.3, p.76-80, 2017.
- SILVA, S. **Potencial antibacteriano e modulador de resistência a drogas de extratos e constituintes de algas marinhas em Staphylococcus aureus**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- SOLOMON S., et al. **Mulfinger Synthesis and study of silver nanoparticles**. J. Chem. Educ., 84, p.332-325, 2007.
- RAMIN, B. **Síntese, Caracterização e Avaliação de nanopartículas de prata com o Plurônico F-127**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Superior de Licenciatura em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.