

## **Avaliação da atividade antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas com modificações moleculares de superfície**

### **Evaluation of the antibiofilm activity of biogenic silver nanoparticles with molecular surface modifications**

DOI:10.34117/bjdv7n7-301

Recebimento dos originais: 13/06/2021

Aceitação para publicação: 13/07/2021

#### **Matheus Alves Pauletti**

Mestrando em Microbiologia

Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.

Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

E-mail: matheuspauletti@uel.br

#### **Natália Yukari Kashiwaqui**

Graduanda em Biomedicina

Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.

Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

E-mail: n.y.kashiwaqui@uel.br

#### **Thiago Hideo Endo**

Graduanda em Biomedicina

Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.

Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

E-mail: th.endo@uel.br

#### **Gerson Nakazato**

Doutor em Genética e Biologia Molecular

Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.

Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

E-mail: gnakazato@uel.br

#### **Renata Katsuko Takayama Kobayashi**

Doutora em Microbiologia

Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada

Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.  
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.  
Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.  
E-mail: kobayashirt@uel.br

**Marcelly Chue Gonçalves**  
Doutoranda em Microbiologia  
Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada  
Instituição: Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas.  
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário.  
Caixa Postal: 10.011, CEP: 86057-970, Londrina-PR, Brasil.  
E-mail: marcelly.chue@gmail.com

## RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem se mostrado um grande desafio a saúde humana, e apesar da necessidade de novos antimicrobianos, e da intensa pesquisa poucos tornaram-se efetivos nos últimos anos. As nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam grande eficiência bactericida. Essas nanopartículas podem ser sintetizadas por vias químicas, físicas e biológicas, sendo que a síntese biológica pelo fungo *Fusarium oxysporum* é conhecida por utilizar reagentes menos tóxicos, e eficiente atividade antimicrobiana. Diferentes alterações de superfície das nanopartículas podem ser feitas, como a encapsulação por albumina ou a incorporação em micelas, e é provável que essas alterações sejam capazes de modificar as propriedades das nanopartículas. Nesse trabalho, essas modificações foram realizadas e avaliadas com relação as propriedades antibacterianas e antibiofilme. O objetivo desse trabalho foi analisar essas AgNPs, comparando suas características e as possíveis modificações na sua atividade microbicida, citotóxica, além de trazer novos conhecimentos sobre as nanopartículas e a nanotecnologia. Para isso foi feita a determinação da concentração mínima inibitória e determinada a atividade antibiofilme das AgNPs. As AgNPs sem modificações apresentaram um tamanho médio de 81,25 nm, as AgNPs micelares apresentaram um tamanho médio de 138,1 nm, não foi possível medir o tamanho médio das nanopartículas encapsuladas por albumina. Todas as nanopartículas testadas foram bactericidas para todas as cepas analisadas, as médias das faixas de concentração mínima inibitória foram de 10,62 a 29,75 µg/ml. Enquanto as AgNPs micelares apresentaram menor atividade antibiofilme, as AgNP BSA apresentaram atividade antibiofilme equivalente à das AgNP, indicando potencial para serem usados como tratamento contra biofilme. Os resultados desse trabalho sugerem que a modificação das nanopartículas por albumina não demonstrou grande alteração na atividade antimicrobiana e atividade antibiofilme, enquanto a nanopartícula micelar apresentou indicativos de redução na atividade antibiofilme. A nanotecnologia, em especial as nanopartículas de prata oferecem novas estratégias para o combate de infecções comuns e causadas por bactérias multirresistentes. As modificações dessas AgNPs auxiliam ainda mais na atividade antimicrobiana e biossegurança.

**Palavras-Chave:** Albumina Sérica Bovina, Resistência Bacteriana, Micelas, Nanotecnologia, Biofilmes.

## ABSTRACT

Bacterial resistance to antimicrobials has been a great challenge to human health, and despite the need for new antimicrobials, and the intense research, few have become effective in recent years. Silver nanoparticles (AgNPs) show great bactericidal efficiency. These nanoparticles can be synthesized by chemical, physical and biological routes, and the biological synthesis by the fungus *Fusarium oxysporum* is known for using less toxic reagents, and efficient antimicrobial activity. Different surface modifications of nanoparticles can be made, such as encapsulation by albumin or incorporation into micelles, and it is likely that these modifications are able to modify the properties of the nanoparticles. In this work, these modifications were performed and evaluated with respect to antibacterial and antibiofilm properties. The objective of this work was to analyze these AgNPs, comparing their characteristics and the possible modifications in their microbicidal and cytotoxic activity, besides bringing new knowledge about nanoparticles and nanotechnology. To this end, the minimum inhibitory concentration was determined and the antibiofilm activity of AgNPs was determined. The AgNPs without modifications showed an average size of 81.25 nm, the micellar AgNPs showed an average size of 138.1 nm, it was not possible to measure the average size of the albumin-encapsulated nanoparticles. All nanoparticles tested were bactericidal for all strains analyzed, the mean minimum inhibitory concentration ranges were 10.62 to 29.75 µg/ml. While micellar AgNPs showed lower antibiofilm activity, BSA AgNPs showed antibiofilm activity equivalent to that of AgNPs, indicating potential to be used as a treatment against biofilm. The results of this work suggest that the modification of nanoparticles by albumin did not show much change in antimicrobial activity and antibiofilm activity, while the micellar nanoparticle showed indications of reduction in antibiofilm activity. Nanotechnology, especially silver nanoparticles offer new strategies to combat common infections caused by multidrug-resistant bacteria. Modifications of these AgNPs further assist in antimicrobial activity and biosafety.

**Keywords:** Bovine Serum Albumin, Bacterial Resistance, Micelles, Nanotechnology, Biofilms.

## 1 INTRODUÇÃO

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas que são aderidas a uma superfície e encobertas por uma matriz de material exopolimérico (RAMAGE et al., 2005). As bactérias são atraídas por superfícies às quais podem aderir para formar populações sésseis, sendo que a bactéria passa a crescer diferentemente depois que aderem a uma superfície e iniciam a formação do biofilme (COSTERTON, 1999).

Quando formados em equipamentos, os biofilmes causam biocorrosão, além de causar a contaminação de produtos, perdas energéticas por conta do aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão (XAVIER et al., 2003). A formação de biofilmes em equipamentos médicos, como cateteres e implantes, resulta frequentemente em infecções crônicas difíceis de tratar (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010)

Há vários benefícios que uma bactéria obtém da formação de biofilme, tais como resistência a muitos antimicrobianos, proteção contra protozoários e contra a defesa do hospedeiro (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010). As bactérias em biofilme produzem uma matriz rica em proteínas, polissacarídeos, ácidos húmicos e DNA, que serve como uma cola que segura os biofilmes bacterianos, protegendo-os contra o sistema imunológico do hospedeiro e contra estresses ambientais.

Além disso, o aumento no uso dos antibióticos resultou na seleção de microrganismos resistentes, e a descoberta de novos medicamentos não foi capaz de acompanhar essa resistência. Apesar de ser amplamente divulgada a necessidade de novos antibacterianos, apenas duas novas classes de antibióticos foram desenvolvidas e aprovadas nos últimos 20 anos (lipopeptídeos e oxazolidinonas) (TACCONELLI et al., 2018).

O uso contínuo e inadequado dos antibióticos está relacionado com a seleção de bactérias multirresistentes, essas bactérias têm se tornado um dos maiores desafios a saúde pública e tornam-se cada vez mais impactantes, levando-se em consideração que afetam não somente a saúde de milhões de pessoas, mas também a economia mundial, ameaçam o sucesso de tratamento de infecções comuns e resultam em doenças prolongadas, incapacitações e mortes (WHO, 2021)

As nanopartículas de prata (AgNP) têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido a sua gama de aplicações. As AgNPs demonstraram atividades contra diversos microrganismos, além de ter sido demonstrado seu potencial contra multirresistentes (FIGUEIREDO et al., 2019; SCANDORIEIRO et al., 2016). Outro aspecto importante das propriedades antimicrobianas das AgNP é o potencial de erradicar ou inibir a formação de biofilme (ESTEVEZ et al. 2020).

Devido ao amplo uso de AgNPs em muitos campos, vários métodos sintéticos foram desenvolvidos para eles, sendo os métodos mais tradicionais físicos e químicos. No entanto, estes usam reagentes caros e / ou prejudiciais ao meio ambiente, portanto, podem ser substituídos por métodos verdes funcionais e ambientalmente corretos (DIAS et al., 2021)

As AgNP ainda podem ser revestidas por proteínas e micelas, a fim de modificar algumas propriedades, tais como solubilidade e polaridade. A albumina é a proteína carreadora mais abundante no sangue e, quando usada como revestimento para as nanopartículas, esta proteína serve como agente estabilizador e carreador para Drug delivery (AN; ZHANG, 2017; MATHEW; KURIAKOSE, 2013). Micelas são formadas

quando um surfactante sofre auto-agregação, resultando em uma estrutura globular, formada por moléculas de tensoativo (ITO, 2011). As AgNP podem ser englobadas por micelas, modificando suas propriedades físico-químicas.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar as alterações das AgNPs com relação a atividade antimicrobiana e antibiofilme.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas cepas bacterianas de referência (*Escherichia coli*, American Type Culture Collection, ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e uma cepa bacteriana multirresistente (*S. aureus*, Clone Epidêmico Brasileiro BEC 9393, Meticilina-resistente -MRSA). Para a avaliação do biofilme foi utilizada a cepa de *E. coli* Enteroagregativa 042.

### 2.2 SÍNTESE BIOGÊNICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata foram obtidas seguindo o método de DURÁN et al., (2005) adaptado. Resumidamente, foi utilizado o fungo *Fusarium oxysporum* cepa 551 da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). *F. oxysporum* foi cultivado em meio contendo extrato de levedura a 0,5% (p/v) (Neogen), extrato de malte a 2% (p / v) (Neogen), ágar a 2% (p / v) (Neogen) e água destilada a 28 °C por 7 dias. Dez gramas da biomassa fúngica foram adicionados em 100mL de água destilada. Após 72h a 28 °C e sob agitação a 150 rpm, os componentes da solução aquosa foram separados por filtração. Nesta solução (filtrado fúngico),  $\text{AgNO}_3$  ( $10^{-3}$  M) foi adicionado e o sistema foi mantido por 72 h a 28 °C, protegido da luz e em repouso. Em seguida, foi determinado se houve a formação de nanopartículas através da mensuração da absorvância em vários comprimentos de onda UV-Vis, o pico de absorção de a 440 nm indica a formação de AgNP devido a ressonância plasmônica de superfície dessas nanopartículas (DURÁN et al., 2005, 2015a). O potencial zeta e o diâmetro das nanopartículas foram determinados através do equipamento Zetasizer Nano (Malvern Instruments) na Universidade Federal do ABC (Santo André, São Paulo, Brasil). O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering, DLS) e o potencial Zeta foi medido por mobilidade eletroforética usando as dispersões das nanopartículas em uma solução de KCl (USB) na concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 2.3 SÍNTESE DA FORMA MICELAR DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A obtenção das micelas de AgNPs foram através do protocolo descrito por PELEGRINO; DE ARAÚJO; SEABRA, (2018) com modificações. Uma solução aquosa contendo 0,15% (m / v) de Poloxâmero 407 (Pluronic f-127 ® Sigma-Aldrich) foi preparada sob agitação manual leve para solubilização, em seguida foi armazenada a 4 °C por 18h. Essa solução foi adicionada a uma concentração estabelecida de bio-AgNPs 1700 µg/mL agitando para obter uma solução miscigenada, a concentração final do Poloxâmero 407 foi de 0,10% (m / v). Foram feitas análises de diâmetro e potencial zeta das micelas formadas através do equipamento Zetasizer Nano.

### 2.4 ENCAPSULAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM ALBUMINA BOVINA SÉRICA

O encapsulamento foi feito de acordo com o protocolo de MATHEW; KURIAKOSE, (2013) com modificações. A albumina de soro de bovino (bovine serum albumin, BSA - Cultilab) foi dissolvida em água deionizada 0,2 % (m / v) agitando à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. O encapsulamento de nanopartículas de prata em BSA foi obtido com vigorosa agitação de volumes iguais de solução de bio-AgNPs com solução aquosa de BSA à temperatura ambiente, resultando em uma solução estoque de 0,1 % (m / v) de BSA em uma concentração de 1700 µg/ml. Foram feitas análises de diâmetro e potencial zeta das nanopartículas formadas através do equipamento Zetasizer Nano.

### 2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As concentrações mínimas inibitórias (CIMs) foram determinadas por ensaios de microdiluição (triplicata), em caldo Mueller Hinton (Difco, EUA), em placas de 96 poços (CLSI, 2018). Diferentes concentrações de AgNPs foram adicionadas a cada poço, para determinar os valores de CIM. As suspensões bacterianas foram diluídas em salina na escala 0,5 de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), e depois diluídas 1:100 em caldo Mueller-Hinton e inoculadas nos poços, em uma concentração final de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Finalmente, a placa foi incubada em estufa por 24 h a 37 °C, para determinar os valores de CIM. Foram utilizados controles negativos (apenas as nanopartículas) e positivos (apenas as bactérias) para verificar a viabilidade e esterilidade dos testes. A concentração mínima bactericida (CBM) foi determinada por subcultivo de 10 µL da CIM e concentrações superiores em ágar MH (Oxoid) desprovido de agente antimicrobiano adicionado. A CBM foi definida como a menor concentração que elimina  $\geq 99,9\%$  das

células bacterianas após 24 h de tratamento com o antibacteriano (NCCLS, 1999). O Poloxâmoro 407 e BSA também foram testados para verificar se apresentavam atividade antibacteriana. Os ensaios foram realizados em triplicata, e no mínimo em três eventos diferentes.

## 2.6 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIBIOFILME

As nanopartículas, sintetizadas e modificadas foram testadas quanto à atividade antibiofilme em *E. coli* enteroagregativa 042, que foi utilizada como controle positivo para a formação de biofilme. Como controle negativo, foi utilizado o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 0,45% de glicose, sem adição de antimicrobiano ou de bactéria. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, com a utilização de 180 µL de meio DMEM suplementado com 0,45% de glicose, e 20 µL de cultura bacteriana ( $10^8$  unidades formadoras de colônia/mL) em cada poço. Essa placa foi incubada em repouso a 37°C por 24 h para a formação do biofilme. Após esse período 200 µL de nanopartículas em suas respectivas concentrações mínimas inibitória foram adicionadas aos poços teste. A placa foi novamente incubada, em repouso a 37°C, por 24 h, protegida da luz. Em seguida, o meio da placa foi retirado, lavado 2x com salina tamponada fosfato (PBS 0,01M), e 100 µL de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foi adicionado em cada poço. A placa foi incubada por 2 h e vertida para a remoção do MTT em suspensão. Então, 100 µL de solubilizante foram adicionados em cada poço, e após 15 min em agitação constante, a placa foi levada para leitura em espectrofotômetro (BioTek Synergy HT) a 570 nm.

A viabilidade do biofilme foi calculada pela fórmula:

$$100 \times \text{Absorbância da amostra} = \text{Absorbância do controle positivo} \times \text{Viabilidade do biofilme}$$

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

#### 3.1.1 Caracterização das Nanopartículas de Prata Biogênicas

Utilizando o fungo *F. oxysporum* foram sintetizadas as AgNPs baseada na metodologia de Durán et al. (2005). As bio-AgNPs apresentaram diâmetro médio de 81,25 nm. O potencial zeta foi de -36,4 mV.

### 3.1.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata Micelares

As nanopartículas micelares demonstraram valores diferentes de tamanho em relação a nanopartícula sem modificações, o diâmetro médio dessas nanopartículas foi de 138,1 nm, o que é um indicativo de que houve a formação de micelas recobrando a nanopartícula. O potencial zeta foi de -23 mV.

### 3.1.3 Caracterização das Nanopartículas de Prata Encapsuladas por Albumina

As nanopartículas biogênicas encapsuladas por albumina sedimentaram rapidamente e dessa maneira não foi possível fazer a análise de tamanho. De acordo com um estudo publicado por Durán et al., (2015b), diferentes agentes estabilizantes atuam de diferentes maneiras sobre a proteína BSA.

## 3.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CBM)

As diferentes nanopartículas inibiram o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas, incluindo a cepa multirresistente *S. aureus* BEC 9393. Os dados de CIM e CBM de cada bactéria analisada podem ser visualizados na tabela 1.

O valor médio de CIM para as nanopartículas de prata sem alterações foi de  $90 \pm 23 \mu\text{M}$ , para as nanopartículas micelares (AgNPs micel) foi de  $144,8 \pm 34,5 \mu\text{M}$  e para as nanopartículas encapsuladas por albumina (AgNPs BSA) foi de  $99,9 \pm 11,23 \mu\text{M}$

O valor médio de CBM para as nanopartículas de prata sem alterações foi de  $125 \mu\text{M}$ , para as nanopartículas micelares (AgNPs micel) foi de  $159 \pm 23,06 \mu\text{g/ml}$  e para as nanopartículas encapsuladas por albumina (AgNPs BSA) foi de  $125 \mu\text{M}$

Tabela 1 – Efeito antibacteriano das diferentes nanopartículas analisadas

Bactéria	AgNPs sem modificação		AgNPs micel		AgNPs BSA	
	CBM média ( $\mu\text{M}$ )	CIM média ( $\mu\text{M}$ )	CBM média ( $\mu\text{M}$ )	CIM média ( $\mu\text{M}$ )	CBM média ( $\mu\text{M}$ )	CIM média ( $\mu\text{M}$ )
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125,0	83,1	125,0	92,9	125,0	83,1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125,0	62,5	187,5	175,0	125,0	112,5
<i>S. aureus</i> BEC 9393	125,0	125,0	166,5	166,5	125,0	104,1

AgNPs micel, nanopartículas de prata micelares, AgNPs BSA, nanopartículas de prata encapsuladas por albumina BEC, Brazilian Endemic Clone CBM, concentração mínima bactericida CIM, concentração mínima inibitória Fonte: O próprio autor (2020)

Esses valores de CIM e CBM demonstram que não houve grande diferença na atividade inibitória e bactericida das diferentes nanopartículas analisadas já que essas pequenas diferenças nas faixas de concentração são comuns. Os resultados para a bactéria *E. coli* indicam que a nanopartícula sem alterações foi mais eficaz que aquelas que sofreram alterações.

Um estudo feito por GRADE et al., (2012) demonstrou uma menor atividade bacteriana das AgNPs quando encapsuladas por albumina, porém nesse trabalho essa redução não foi tão acentuada. Pode-se sugerir que essa diferença entre os trabalhos estaria relacionada com a diferença de concentração de BSA utilizada.

A nanopartícula micelar apresentou maior faixa de concentração da CIM, isso pode ocorrer devido ao aumento do tamanho da nanopartícula micelar, outros estudos já constataram que o aumento do tamanho das AgNPs pode estar relacionado com menor atividade antibacteriana principalmente contra bactérias Gram positivas, duas hipóteses já descritas por outros autores são de que esse aumento do tamanho das nanopartículas além de dificultar a penetração na célula bacteriana também esteja relacionado com uma menor área de superfície, e consequentemente menor eficácia (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; JEONG; HWANG; YI, 2005; MARTÍNEZ-CASTAÑÓN et al., 2008).

É interessante notar que esse aumento na faixa da CIM ocorreu especialmente com a bactéria *E. coli* e não houve um aumento tão expressivo contra as duas cepas de bactéria *S. aureus* ainda que como dito anteriormente o aumento do tamanho das nanopartículas reduz com maior intensidade a atividade antibacteriana contra bactérias Gram positiva (MARTÍNEZ-CASTAÑÓN et al., 2008).

Dessa maneira, era previsto que um tamanho maior de nanopartículas teria uma menor atividade antimicrobiana contra Gram positiva. Porém, mesmo com o maior tamanho, a nanopartícula micelar teve uma atividade antibacteriana equivalente à atividade da nanopartícula sem modificações

É importante ressaltar que os mesmos testes foram feitos com o Poloxâmero 407 e com a BSA e esses dois componentes não apresentaram atividade antibacteriana.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Os resultados, em triplicata, para a avaliação da atividade antibiofilme podem ser observados nos quadros abaixo.

Quadro 1: Resultados do ensaio 1 para atividade antibiofilme.

Concentração (uM)	Controle Positivo	Bio-AgNP*		AgNP micelas**		AgNP BSA***	
		62,5	31,25	250	125	125	62,5
Absorbância média	0,092	0,001	0,002	0,006	0,001	0,004	0
Viabilidade do biofilme (%)	100	1,0909	2,5454	6,1818	0,7272	4	0

\*Bio-AgNP: Nanopartículas de prata biogênicas. \*\*AgNP Micelas: Nanopartículas de prata micelares  
\*\*\*AgNP BSA: Nanopartículas com Albumina Sérica Bovina Fonte: O próprio autor (2020)

Quadro 2: Resultados do ensaio 2 para atividade antibiofilme.

Concentração (uM)	Controle Positivo	Bio-AgNP*		AgNP micelas**		AgNP BSA***	
		62,5	31,25	250	125	125	62,5
Absorbância média	0,675	0	0	0,004	0,003	0,0003	0
Viabilidade do biofilme (%)	100	0	0	0,6423	0,3953	0,0494	0

Fonte: O próprio autor (2020)

Quadro 3: Resultados do ensaio 3 para atividade antibiofilme.

Concentração (uM)	Controle Positivo	Bio-AgNP*		AgNP micelas**		AgNP BSA***	
		62,5	31,25	250	125	125	62,5
Absorbância média	0,527	0,002	0,002	0,006	0,004	0,002	0,002
Viabilidade do biofilme (%)	100	0,3795	0,3795	1,1385	0,7590	0,3795	0,3795

Fonte: O próprio autor (2020)

Como todos os poços testes e os controles foram feitos em triplicata, foi calculado uma média para cada um. O controle negativo foi usado para excluir os ruídos de fundo causados pela coloração do DMEM suplementado. Por isso, a média dos valores de absorbância do controle negativo foi subtraída das demais médias obtidas, sendo esses os valores que aparecem na tabela acima.

Gráfico 1: Viabilidade do biofilme da primeira placa

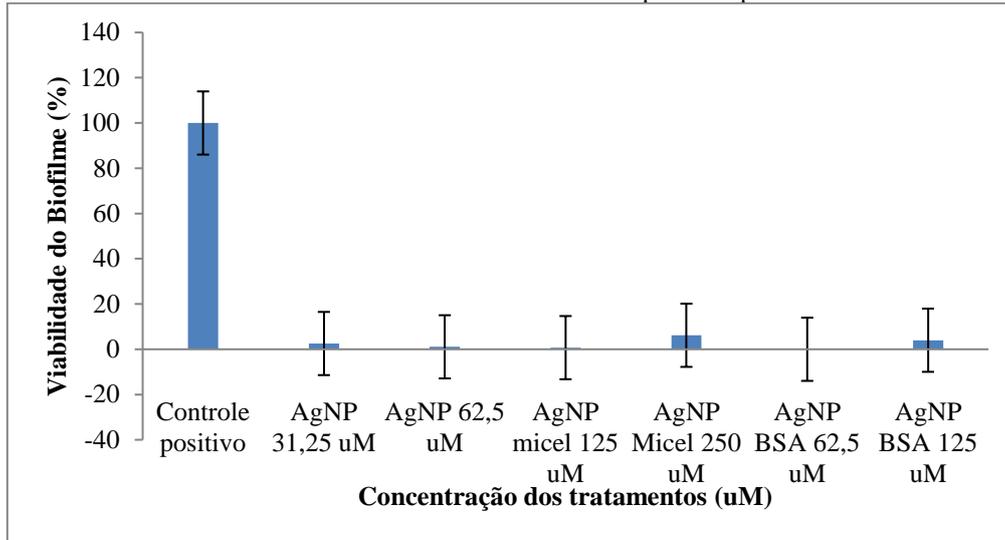


Gráfico 2: Viabilidade do biofilme da segunda placa

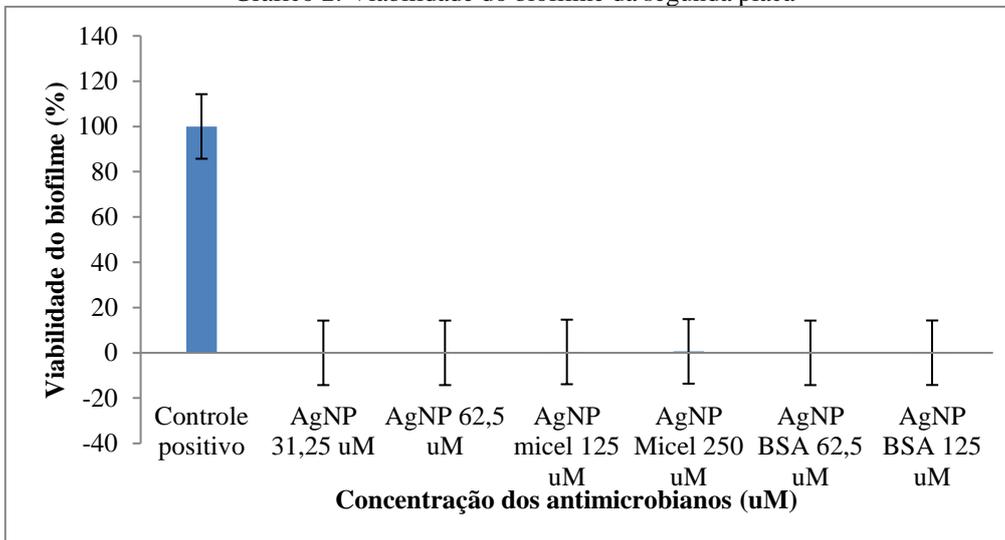
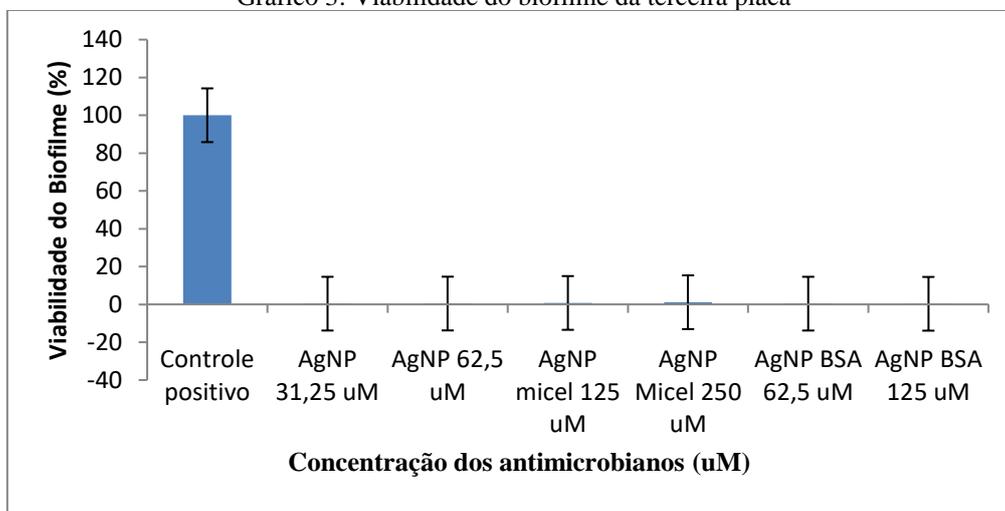


Gráfico 3: Viabilidade do biofilme da terceira placa



Nos gráficos, é possível observar que os biofilmes que foram tratados com os antimicrobianos apresentaram viabilidade celular baixa, indicando que os tratamentos tiveram atividade antibiofilme. Isso ocorre, pois, a prata danifica a membrana bacteriana, interfere no transporte de íons, desnatura proteínas, inibe a respiração celular e a transcrição do DNA, mesmo em baixas concentrações (RODRIGUES, 2018).

Apesar de a diferença ser pouca, as nanopartículas de prata micelares (AgNP micel) tiveram menor atividade antibiofilme quando comparadas com as nanopartículas de prata sem alterações (AgNP) e as nanopartículas de prata encapsulada por albumina (AgNP BSA). Isso provavelmente ocorre, pois, as nanopartículas micelares são maiores e, conseqüentemente, têm menor área de superfície. Como já foi descrito por outros autores, quanto maior a nanopartícula de prata, menor será a atividade antimicrobiana (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014). Da mesma forma, suspeita-se que a ação antibiofilme das nanopartículas de prata esteja relacionada ao seu tamanho extremamente pequeno (FREIRE et al. 2018).

No estudo desenvolvido por Freire et al., (2018), foram testadas nanopartículas de prata contra biofilme da bactéria Gram-negativa *Aeromonas* sp. e observou-se que as nanopartículas de prata apresentaram um grande potencial de ação antibiofilme, tanto no biofilme em formação quanto no biofilme já consolidado.

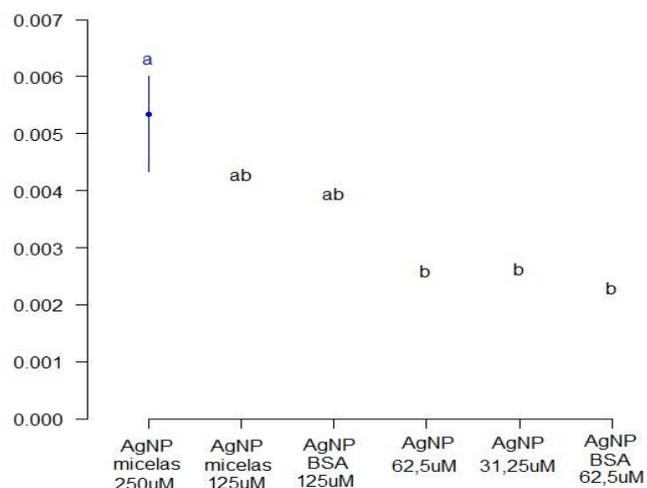
Assim, era esperado que as nanopartículas de prata micelares apresentassem menor ação antibiofilme, embora ainda tenha sido capaz de inibir o biofilme. Também era previsto que as nanopartículas de prata não alteradas tivessem ação antibiofilme contra biofilme de *E. coli* (EAEC 042). As nanopartículas de prata encapsuladas por albumina apresentaram atividade antibiofilme equivalente à das nanopartículas não alteradas.

Foi feita uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% pelo software R, na qual o valor de p foi 0,0126. Portanto, é possível afirmar que existe uma diferença significativa entre as nanopartículas testadas.

Foi realizado o teste de Tukey, a fim de determinar quais das nanopartículas testadas diferem entre si. O teste indicou que a AgNP micelar 250  $\mu$ M foi a que teve a maior absorvância, seguida por AgNP micelar 125  $\mu$ M, AgNP BSA 125  $\mu$ M, Bio-AgNP 62,5  $\mu$ M, Bio-AgNP 31,25  $\mu$ M e, por último, AgNP BSA 62,5  $\mu$ M.

O gráfico 4 abaixo demonstra através do Teste de Tukey que a AgNP micelar foi a que demonstrou maior absorvância diferindo das AgNPs 62,5  $\mu$ M, Bio-AgNP 31,25  $\mu$ M e, por último, AgNP BSA 62,5  $\mu$ M.

Gráfico 4: Teste de Tukey  
Groups and Range



#### 4 CONCLUSÃO

Todas as nanopartículas produzidas apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas, inclusive para a cepa de *S. aureus* Meticilina-resistente (MRSA, BEC 9393). As três nanopartículas de prata testadas, com e sem modificações moleculares de superfície, apresentaram atividade antibiofilme, sendo capazes de interferir até no biofilme já consolidado. Porém, as AgNP micelares tiveram menor atividade antibiofilme comparada com as outras duas. O desenvolvimento de novas estratégias para combater a resistência bacteriana é de grande relevância, e a Nanotecnologia apresenta grande potencial para aplicações envolvendo atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

AN, F.-F.; ZHANG, X.-H. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery. *Theranostics*, v. 7, n. 15, p. 3667–3689, 2017.

CLSI. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. Disponível em: <[www.clsi.org](http://www.clsi.org)>. Acesso em: 21 jun. 2021.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 217–221. 1999.

DIAS, D. V. S. et al. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato metanólico de *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 42062-42072, 2021.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 3, n. 1, p. 8, 13 jul. 2005.

DURÁN, N. et al. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR PROTEÍNAS NA PRODUÇÃO DE PRODUTOS TÊXTEIS ANTIBACTERIANOS E O TRATAMENTO DOS EFLUENTES PRODUZIDOS, 2015a. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/1b/51/de/bbc68417e3b9ac/BR132015004540E2.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

DURÁN, N. et al. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: A mini-review *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd. 4 set. 2015b.

ESTEVEZ, M. B.; RAFFAELLI, S.; MITCHELL, S. G.; FACCIO, R.; ALBORÉS, S. Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles (2020). *Molecules*. 25. 2023. 10.3390/molecules25092023.

FIGUEIREDO, E. et al. New Approach For Simvastatin As An Antibacterial: Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 14, p. 7975–7985, out. 2019.

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C.S.R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. *Pesq. Vet. Bras.* [online]. 2018, vol.38, n.2 [cited 2020-06-05], pp.244-249

GRADE, S. et al. Serum albumin reduces the antibacterial and cytotoxic effects of hydrogel-embedded colloidal silver nanoparticles. *RSC Advances*, v. 2, n. 18, p. 7190, 30 jul. 2012.

ITO, T. H. Reologia e estabilidade de micelas gigantes. 2011. 124 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP

JEONG, S. H.; HWANG, Y. H.; YI, S. C. Antibacterial properties of padded PP/PE nonwovens incorporating nano-sized silver colloids. *Journal of Materials Science*. Anais. out. 2005

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 7, p. a000398, jul. 2010.

MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G. A. et al. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 8, p. 1343–1348, 2008.

MATHEW, T. V.; KURIAKOSE, S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, p. 14–18, jan. 2013.

NCCLS. Methods for Determinating Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline. NCCLS, Vol. 19; 1999:50

PELEGRINO, M. T.; DE ARAÚJO, D. R.; SEABRA, A. B. S-nitrosoglutathione-containing chitosan nanoparticles dispersed in Pluronic F-127 hydrogel: Potential uses in topical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 43, p. 211–220, 1 fev. 2018.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*. Apr 2005.

RODRIGUES, M. A. P. Atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre biofilme – modelo implante dental. 2018. Tese (Mestrado em Odontologia) - Universidade Paulista.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 760, 23 maio 2016.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 318–327, mar. 2018.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 2-13. 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 21 jun. 2021.