

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E A CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DO CRESCIMENTO BACTERIANO DE LIPOSSOMAS CONTENDO CIPROFLOXACINA CONTRA A BACTÉRIA GRAM-POSITIVA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Maria Caiane Lino de Souza<sup>1</sup> (IC), Daniela Sachs<sup>1</sup>(PQ), Daniel Cristian Ferreira Soares(PQ)<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Itajubá – campus itajubá, <sup>2</sup>Universidade Federal de Itajubá - campus itabira

**Palavras-chave:** Atividade antibacteriana. Nanoformulação lipossomal. Carreadores de fármacos.

### Introdução

As infecções bacterianas são uma das principais causas de morte em todo o mundo, associadas a diversas complicações e causando milhões de mortes por ano (Ikuta *et al.*, 2022).

Com isso, diversos antibacterianos foram desenvolvidos ao longo dos anos para combater bactérias patogênicas, incluindo a ciprofloxacina. Este medicamento, da classe das fluoroquinolonas, age inibindo enzimas bacterianas essenciais para a replicação e transcrição, como a topoisomerase II e IV (Ojkic *et al.*, 2020).

Alguns fatores podem influenciar no desenvolvimento das infecções, como a estrutura da parede celular, a formação de biofilmes e a resistência bacteriana.

Os microrganismos podem ser classificados em gram-positivos e gram-negativos com base na estrutura da parede celular. As bactérias gram-negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa com lipopolissacarídeos, enquanto as gram-positivas têm uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos teicoicos (Zhou *et al.*, 2024).

Os biofilmes são comunidades microbianas, envoltas por uma matriz polimérica, que protegem os microrganismos e dificultam a ação dos antibacterianos, principalmente após a formação do biofilme maduro (Roy, 2022).

O tratamento também é dificultado pela resistência antimicrobiana, que ocorre devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso indiscriminado dos medicamentos (Morrison e Zembower, 2020).

A partir da limitação na atuação dos antibacterianos presentes atualmente no mercado devido a fatores como formação de biofilme e a crescente resistência bacteriana, demonstra-se a necessidade da pesquisa acerca de novos fármacos e novas formulações que sejam terapias alternativas para o tratamento das infecções.

Os lipossomas são nanocarreadores de fármacos que têm se destacado por suas vantagens, como capacidade de encapsular antibacterianos hidrofílicos e hidrofóbicos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixa ativação do sistema imunológico

(Ghosh e De, 2023).

Estudos sobre compostos antibacterianos encapsulados em lipossomas têm mostrado grande potencial para aumentar a eficácia desses agentes, tornando-se uma área de pesquisa promissora (Faraag *et al.*, 2022; Patil *et al.*, 2019).

Este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana do antibiótico ciprofloxacina encapsulado em lipossomas contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213.

A ciprofloxacina é um antibiótico com eficácia comprovada contra diversas bactérias, inclusive *S. aureus*, uma bactéria comumente associada a infecções nosocomiais, que causa preocupação devido ao aumento da resistência aos medicamentos (Brooks *et al.*, 2014).

Portanto, estratégias inovadoras, como o uso dos lipossomas como plataformas de medicamentos surgem como uma solução promissora para melhorar a entrega, aumentar a concentração local e reduzir a toxicidade dos antibacterianos, o que justifica a importância da investigação apresentada.

Partindo disso, na Iniciação Científica foram realizados testes de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) da nanoformulação lipossomal contendo ciprofloxacina contra a bactéria *S. aureus* para posteriormente comparar estes resultados com aqueles referentes ao composto livre.

Os lipossomas foram preparados anteriormente no campus Itabira da Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI - pelo Professor Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares.

### Metodologia

Para o teste da Concentração Mínima Inibitória (CMI) inicialmente foi preparada uma solução da bactéria *S. aureus* 29213 a 0,5 McFarland.

Em uma placa estéril de 96 poços, foram adicionados 180 µL de meio BHI em alguns poços da fileira A, completando com 100 µL de BHI nas respectivas

colunas. Na coluna 11, 100  $\mu\text{L}$  de BHI foram adicionados nos poços A, B, C e D, enquanto nos poços E, F, G e H foram adicionados 90  $\mu\text{L}$  de BHI e 10  $\mu\text{L}$  de DMSO. A coluna 9 recebeu 200  $\mu\text{L}$  de BHI. Foram colocados 20  $\mu\text{L}$  de uma nanoformulação lipossomal contendo ciprofloxacina (512  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos poços 1A a 7A, seguida de diluição seriada até a linha H. Na coluna 12A, foi adicionado o controle positivo, ciprofloxacina, a partir de uma solução diluída de vancomicina. O inóculo foi adicionado nas colunas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11 e 12. Após 24 horas a 37°C, a placa foi preparada para o teste de concentração mínima bactericida com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de resazurina.

Para a avaliação da Concentração Mínima Bactericida (CMB), foi utilizada uma placa de petri contendo ágar TSA, para cada substância a ser testada. A placa foi dividida em 9 quadrantes e em cada um anotou-se a diluição correspondente. Em cada campo foi pipetado 10  $\mu\text{L}$  da respectiva diluição e no último quadrante a mesma quantidade, mas do poço A do controle. Levou-se a placa à estufa, a 37 °C, por 24 horas. Após esse intervalo, foi observado se houve ou não crescimento bacteriano nos campos.

### Resultados e discussão

Nos testes realizados, o valor da nanoformulação no poço foram de 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  até 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no entanto, os valores de ciprofloxacina encapsulados eram menores. Os diferentes valores do fármaco nos diferentes casos, estão representados na tabela 1.

O TSLB refere-se ao lipossoma branco e não continha o fármaco, sendo utilizado como um controle, garantindo que não são os lipossomas os responsáveis pela ação antibacteriana. O TSLB foi testado anteriormente em outro trabalho.

O TSLC corresponde ao lipossoma contendo ciprofloxacina e o controle representa a ciprofloxacina em sua forma livre.

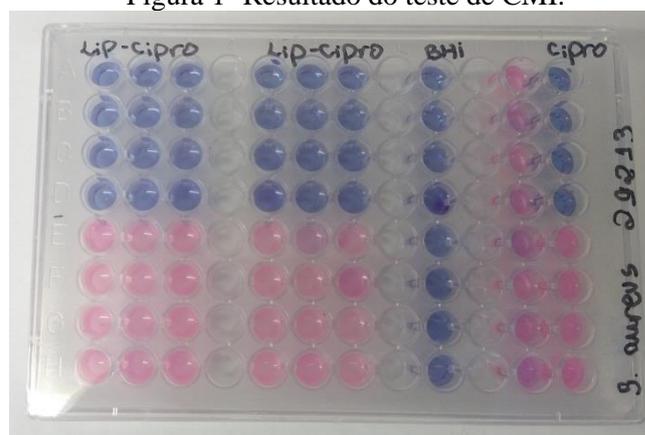
Tabela 1 – Concentração de ciprofloxacina nos poços.

Poços	TSLC	TSLB	Controle
A	3,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$
B	1,80 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
C	0,90 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$
D	0,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
E	0,22 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
F	0,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
G	0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,13 $\mu\text{g}/\text{mL}$
H	0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Já na Figura 1, está exposto o resultado do teste de CMI para a bactéria *S. aureus* (29213). A resazurina é um

corante azul que quando metabolizada pelas bactérias assume coloração rosa. Deste modo, a cor azul nos poços indica ausência de crescimento bacteriano enquanto a cor rosa indica que houve o crescimento, logo o fármaco não foi efetivo nesta concentração.

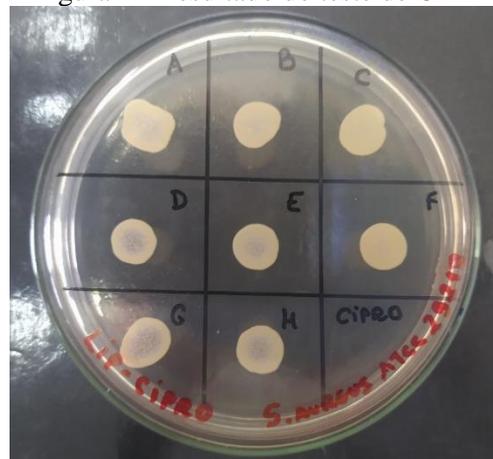
Figura 1- Resultado do teste de CMI.



É possível observar que o valor da CIM da nanoformulação lipossomal para *S. aureus* ocorreu no poço D. De acordo com os valores da tabela, percebe-se que o valor de ciprofloxacina encapsulado nos lipossomas no poço D foi de 0,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Em comparação com os valores do composto livre, que apresentou CIM na concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (poço D), podemos perceber que o encapsulamento nos lipossomas diminuiu em menos da metade o valor da CIM da ciprofloxacina, maximizando sua ação antibacteriana.

No teste de CMB, para o lipossoma contendo ciprofloxacina, nenhuma concentração testada foi capaz de matar as bactérias de *S. aureus*, como visto na Figura 2, apenas o controle, que apresentava uma concentração maior da ciprofloxacina.

Figura 2 - Resultado do teste de CMB



### Conclusões

Após os testes realizados, conclui-se que os lipossomas contendo ciprofloxacina foram capazes de melhorar a atividade bacteriostática da ciprofloxacina livre, diminuindo seus valores necessários para que este composto apresentasse sua ação antibacteriana. No entanto, a encapsulação não apresentou efeito bactericida nas concentrações testadas. Apesar de não matar as células de *S. aureus*, entende-se que o uso da ciprofloxacina encapsulada em lipossomas pode ser uma alternativa em conjunto a outros métodos no controle de infecções bacterianas.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Diretoria de Pesquisa (DIP) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) pela concessão da bolsa institucional de Iniciação Científica e ao Prof. Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares pela oferta do lipossoma contendo ciprofloxacina. Expresso também meus agradecimentos à professora Dra. Daniela Sachs e as colegas do laboratório LAMICRO pelo apoio e suporte durante o desenvolvimento da pesquisa.

### Referências

BROOKS, G. F. *et al.* Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

FAARAG, A. H. I. *et al.* Stress impact of liposomes loaded with ciprofoxacin on the expression level of MepA and NorB efux pumps of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Microbiology**. V. 25, p. 427–446, 2022.

GHOSH, R.; DE, M. Liposome-Based Antibacterial Delivery: An Emergent Approach to Combat Bacterial Infections. **ACS Omega**, v. 8, p. 35442–35451, 2023.

IKUTA, K. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**. V. 400, p. 2221 – 2248, 2022.

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020.

OJKIC, N. *et al.* A Roadblock-and-Kill Mechanism of Action Model for the DNA-Targeting Antibiotic Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 64, n. 9, 2020.

PATIL, R. *et al.* Mapping Fusogenicity of Ciprofloxacin-Loaded Liposomes with Bacterial Cells. **AAPS PharmSciTech**. V. 20, n. 180, 2019.

ROY, S. *et al.* Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 793615, 2022.

ZHOU *et al.* Rapid and robust bacterial species identification using hyperspectral microscopy and gram staining techniques. **Journal of biophotonics**, v. 17, 2024.