



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**RESISTÊNCIA A NANOPARTÍCULA DE PRATA:
ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA EM CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Londrina
2020

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**RESISTÊNCIA A NANOPARTÍCULA DE PRATA:
ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA EM CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Figueiredo, Erica .

Resistência a nanopartícula de prata: análise fenotípica e genotípica em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* / Erica Figueiredo. - Londrina, 2020.

57 f. : il.

Orientador: Gerson Nakazato.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Bacteriologia - Tese. 2. Nanopartículas - Tese. 3. Resistência aos antimicrobianos - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ÉRICA PELEGRIN FIGUEIREDO

**RESISTÊNCIA A NANOPARTÍCULA DE PRATA:
ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA EM CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial a obtenção do Título de Doutora em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Erick Kenji Nishio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Paula Signolfi Cyoia
Faculdade Pitágoras

Prof. Dr. Luís Eduardo de Souza Gazal
UNOPAR

Londrina, 28 de setembro de 2020.

“Se vi mais longe foi por estar
sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por me guiar em momentos difíceis, pela força diária e por cruzar meu caminho com o de tantas pessoas incríveis.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) pela minha formação no Mestrado e no Doutorado e por ter me permitido conhecer tantas realidades diferentes, ampliando minha visão sobre o universo acadêmico e ensino público.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte financeiro para a realização desta pesquisa. Agradeço, também, à todos os brasileiros por financiarem, mesmo que sem conhecimento, os meus estudos.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Universidade de Maringá (UEM), a EMBRAPA, ao Instituto Federal do Paraná (IFPR) e Universidade de São Paulo (USP) pela parceria e suporte para a realização desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerson Nakazato, por confiar no meu trabalho e dar a oportunidade de trabalhar junto a sua equipe de pesquisa desde 2013. Agradeço por todos os ensinamentos, por todo auxílio, toda compreensão e por todos os momentos de descontração no laboratório.

À Prof. Dra. Renata K. T. Kobayashi, por todo apoio, todo incentivo e todo carinho despositado a mim. Por sempre permitir aos alunos participação em projetos de ensino e extensão, nos proporcionando uma experiência muito valiosa e enriquecedora. Obrigada por toda a preocupação e cuidado que você tem com os “pequenos gafanhotos”.

Aos meus pais por sempre apoiarem minhas escolhas e me auxiliarem na realização dos meus sonhos, dando suporte e cuidado em todas as etapas. Aos meus irmãos por todo apoio, companheirismo e momentos de descontração. Aos

meus avós por toda a torcida, cuidado e preocupação de sempre. Sem o apoio e suporte da minha família eu jamais teria conseguido.

Ao Matheus Polo por embarcar comigo na pesquisa do doutorado, dando força e apoio em momentos difíceis e comemorando comigo as vitórias. Obrigada por todo o cuidado.

Agradeço a todo apoio que tive de amigos, tanto em momentos de descontração quanto em momentos de apoio, de conselhos e desabafos, que foram necessários à finalização dessa tese. Em especial a Anna Carolina, a Aline e ao João. Vocês fizeram essa etapa mais divertida e mais leve, obrigada!

Ao meu amigo Erick, o qual atribuo grande parte do meu crescimento profissional e pessoal. Desde 2013 tenho você como espelho de pesquisador e muito do que sou hoje devo a você. Obrigada por todos os ensinamentos, toda a paciência, toda a amizade durante esses anos.

Agradeço ao Jhonatan, meu primeiro parceiro de pesquisa. Com você desenvolvi o senso crítico e aprendi os primeiros passos do planejamento e execução de projetos de pesquisa. Agradeço pela amizade, pelo apoio em momentos difíceis e por todo zelo que você sempre teve comigo.

Agradeço à Giovana Nicolete, pela grande amizade e parceria. Obrigada por me ouvir sempre, mesmo que de longe, por me dar força e me incentivar a terminar o doutorado. Sem sua ajuda eu não teria conseguido.

Agradeço a Sara, parceira de turma de pós-graduação desde o mestrado e companheira de laboratório. Obrigada por todos os ensinamentos, todas as discussões científicas e por tantos momentos de apoio. Você foi fundamental para o desenvolvimento dessa tese.

Ao Luís Eduardo (Gazal) e a Vanessa por todo auxílio e ensinamento em Biologia Molecular. Por me auxiliarem nos experimentos e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Agradeço à Larissa, Marcelly (Chue), Paula, Isadora e Giovana Bodnar pela amizade dentro e fora do laboratório. Obrigada pelos momentos de descontração, por estarem sempre presentes na minha vida acadêmica e pessoal.

À todos do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada (NIP3) pela amizade e trocas de experiências e momentos de descontração que foram necessários para o desenvolvimento dessa tese., em especial à Viviane, Juan, Bruna, Meiriele, Erika, Heloísa, Leonardo, Victor Clébis, Carolina, Matheus, Miriam, Natalia.

À toda a equipe do Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal (NIP9) pelo auxílio e parceria na síntese das nanopartículas de prata.

Agradeço aos professores da Pós-graduação em Microbiologia, por todos os ensinamentos durante as disciplinas cursadas e por todo auxílio durante a execução da tese de doutorado.

Meu muito obrigada à todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram a execução desse trabalho.

FIGUEIREDO, Érica Pelegrin. **Resistência a nanopartícula de prata: análise fenotípica e genotípica em cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.** 2020. 57 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

As infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos, uma preocupação mundial, são responsáveis por aumentar o tempo de internação dos pacientes afetados, elevando o custo dos tratamentos e aumentando a taxa de morbimortalidade. Os metais têm sido usados desde a antiguidade como agentes antibacterianos e apresentam diferentes propriedades e espectros de ação. Dentre os metais, a prata é um dos mais utilizados devido à sua eficiência como antimicrobiano e sua baixa toxicidade. Com o advento da nanotecnologia na área médica, as nanopartículas de prata (AgNP) passaram a ser amplamente estudadas por sua ação antimicrobiana, inclusive contra bactérias multirresistentes. Em nosso estudo, avaliamos a alteração fenotípica e genotípica em cepas de bactérias Gram-negativas contra a exposição prolongada a subdoses de nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (AgNPbio). AgNPbio foi sintetizada biologicamente por utilizando extrato de *Fusarium oxysporum*. Após exposição prolongada, foi possível observar alteração na Concentração Inibitória Mínima (CIM) em 7 cepas bacterianas. Após o ensaio de indução, 3 cepas bacterianas apresentaram alteração na sensibilidade colateral e resistência cruzada frente a antimicrobianos convencionais. Nossos resultados mostraram uma atenção necessária na exposição prolongada de AgNPbio contra cepas bacterianas.

Palavras-chave: nanopartículas; nanotecnologia; resistência aos antimicrobianos; sensibilidade colateral; resistência cruzada.

FIGUEIREDO, Érica Pelegrin. **Resistance to silver nanoparticles:** phenotypic analysis in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. 2020. 57 p. PhD Thesis (Doctorate in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Infections caused by microorganisms resistant to antimicrobials are responsible for increasing the hospitalization length of affected patients, increasing the cost of treatments, increasing the rate of morbidity and mortality. Metals have been used since ancient times as antibacterial agents and present different properties and spectra of action. Among the metals, silver is one of the most commonly used due to its efficiency as an antimicrobial and low toxicity. With the advent of nanotechnology in the medical area, silver nanoparticles (AgNP) have become widely studied for their antimicrobial action, including against multidrug-resistant bacteria. In our study, we evaluate phenotypical and genotypical alteration in Gram negative bacterial strains against prolonged exposure to silver nanoparticles (AgNPbio) underdoses. AgNPbio was synthesized biologically by *Fusarium oxysporum*. After prolonged exposure, it was possible to observe alteration in Minimal Inhibitory Concentration (MIC) in 7 bacterial strains. After induction bacterial assay 3 bacterial strains showed alteration in collateral sensitivity and resistance cross in conventional antimicrobials. Our results showed a necessary attention in prolonged exposure of AgNPbio against bacterial strains.

Keyword: nanoparticles; nanotechnology; antimicrobial resistance; collateral sensitivity; cross resistance.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Table 1** - Bacteria strains submitted to resistance induction bacterial assay7
- Table 2** - Minimal inhibitory concentration (MIC) of bacterial strains before and after resistance induction assay11
- Table 3** - Antimicrobials alteration showed in antimicrobial disk diffusion before and after bacterial induction assay14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação antibacteriana de nanopartículas de prata proposto por Durán e colaboradores (2015)12

ARTIGO

Figure 1 - Size distribution by intensity (%) os AgNPbio synthetized by *Fusarium oxysporum*. Average diameter of AgNPbio was 67.69 nm31

Figure 2 - Average zeta potential of AgNPbio synthetized by *Fusarium oxysporum* was -23 nm32

Figure 3 - Silver nanoparticles synthetized biologically (AgNPbio) analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM). In the lower left corner, the bar is 20nm in size32

Figure 4 - ERIC-PCR dendrogram of bacterial strains berfore and after AgNPbio induction teste assay35

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	Micrômetro
AgNP	Nanopartícula de prata
AgNPbio	Nanopartícula de prata sintetizada biologicamente
AM	Ampicilina
AMC	Amoxicillin-clavulanic acid
AN	Amicacina
ATCC	Do inglês “American Type Culture Collection”
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidime
CFU	Do inglês “Counting Forming Unit”
CHL	Coramfenicol
CIP	Ciprofloxacino
CTX	Cefotaxima
DNA	Do inglês “Deoxyribonucleic acid”
EDX	Do inglês “Difração de raio-x”
ESBL	Do inglês “Extended-spectrum beta-lactamase”
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepime
FOT	Fosfomicina
GEN	Gentamicina
H	Horas
I	Intermediário
IPM	Imipenem
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LB	Luria Bertani
LVX	Levofloxacino
MEM	Meropenem
MH	Muller Hinton
MIC	Do inglês “Minimal Inhibitory Concentration”
Min	Minutos
mM	Milimolar
MRSA	Staphylococcus aureus resistente a Meticilina

Muc	Colônia Mucoide
mV	Milivolt
NAL	Ácido Nalidíxico
NIT	Nitrofurantoina
Nm	Nanômetro
NOR	Norfloxacina
Norm	Colônia com aspecto normal
NPs	Nanopartícula
°C	Graus Celsius
ORF	Do inglês "Open Reading Frame"
PBP	Do inglês "Protein Binding Penicillin"
R	Resistente
ROS	Do inglês "Reactive Oxygen Species"
RPM	Rotação Por Minuto
S	Sensibilidade
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TEM	Do inglês "Transmission Electron Microscopy"

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3	REVISÃO	17
3.1	RESISTENCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS	17
3.2	NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS	19
3.3	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	21
3.4	AGNPS NO AMBIENTE	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	28

1. INTRODUÇÃO

Há uma grande discussão sobre a resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais nos últimos anos, pois é um problema de saúde pública e de ocorrência mundial. As infecções causadas por microrganismos resistentes aos antimicrobianos são responsáveis por prolongar o tempo de internação dos pacientes acometidos, aumentando o custo dos tratamentos, elevando a taxa de morbidade e mortalidade. Além de ser um problema atual, estudos mostram a forma como essa situação poderá se agravar ainda mais nos próximos anos.

O desenvolvimento de novos antimicrobianos é urgente, já que as opções de tratamentos disponíveis não estão sendo mais efetivas. Dessa forma, muitos estudos estão sendo realizados para este fim e o campo da Nanotecnologia tem sido muito explorado.

A Nanotecnologia é um ramo da ciência que está em constante crescimento, principalmente no setor biomédico. Já foram descritos diversos nanomateriais com eficiente ação frente a patógenos, já que apresentam diversas características com atividade antimicrobiana. Dentre os nanomateriais mais estudados estão as nanopartículas, em especial, as nanopartículas de prata (AgNP). Essas nanopartículas apresentam amplo espectro de ação e já são empregadas em diversos produtos do cotidiano.

Apesar da eficiente atividade antimicrobiana das AgNPs é necessário que sejam conhecidas as limitações desse nanomaterial. Alguns estudos relataram a resistência bacteriana a íons de prata e AgNPs sintetizadas quimicamente, chamando a atenção para a liberação desse metal no ambiente, bem como a utilização frequente dessas nanopartículas em ambiente hospitalar.

Nosso grupo de pesquisa vem estudando nos últimos anos sobre a atividade antimicrobiana utilizando AgNPs e outros ativos, com diferentes estratégias para dificultar a resistência bacteriana. E agora nossa preocupação tem sido para o surgimento de resistência às AgNPs, que mediante ao seu uso mais constante, poderá ocorrer com maior frequência.

1 Diante disso, é necessário um maior entendimento acerca da seleção e
2 aquisição de resistência pelas bactérias frente às AgNPs, incluindo as
3 sintetizadas biologicamente, bem como os impactos dessa resistência aos
4 antimicrobianos de uso convencional.

5

6

1 **2. OBJETIVO**

2

3

4 2.1 Objetivo geral

5

6 Avaliar as alterações fenotípicas e genotípicas de bactérias Gram-
7 negativas frente a exposição prolongada a subdoses de nanopartículas de prata
8 biológicas.

9

10

11 2.2 Objetivo específico

12

13 Sintetizar nanopartículas de prata biologicamente utilizando *Fusarium*
14 *oxysporum*;

15 Avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata frente as
16 bactérias Gram-negativas;

17 Induzir a resistência em bactérias Gram negativas de isolados clínicos e
18 cepas padrão;

19 Avaliar a clonalidade das bactérias utilizadas antes e depois do teste de
20 indução;

21 Analisar o perfil de sensibilidade das bactérias antes e depois do teste de
22 indução.

23

24

25

26

3. REVISÃO

3.1 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

Em ambiente hospitalar, os antimicrobianos são as principais intervenções terapêuticas para o tratamento dos pacientes. Desde as primeiras utilizações desses medicamentos, houve relatos de resistência bacteriana em diversas bactérias de importância médica. Porém, a resistência microbiana, afeta não somente a área médica, mas também a área veterinária e a agrônômica (SFACIOTTE; VIGNOTO; WOSIACKI, 2014).

A resistência aos antimicrobianos é conhecida mundialmente, e infecções causadas por bactérias multirresistentes geram graves consequências, como o aumento do custo do tratamento dos pacientes e o tempo de internação. De acordo com estudos, atualmente as infecções causadas por bactérias multirresistentes resultam em torno de 700 mil mortes por ano, e é estimado que em 2050 este número suba para 10 milhões de mortes no mesmo período (O'NEILL, 2016; SMITH; COAST, 2013).

Quatro fatores principais vêm contribuindo para esse cenário: prescrição arbitrária de antimicrobianos; uso abusivo e inadequado desses fármacos; transmissão de microrganismos resistentes de um ambiente a outro; falta de sistemas de vigilância epidemiológica para os microrganismos multirresistentes (CDC, 2019; O'NEILL, 2016).

De modo geral, a resistência aos antimicrobianos pode acontecer por alteração na permeabilidade da superfície bacteriana, reduzindo a entrada de antimicrobiano na bactéria, alteração do alvo da droga na célula, inativação enzimática dos antimicrobianos, e expulsão da droga por sistemas de efluxo (bombas de efluxo) (REYGAERT, 2018).

Os beta-lactâmicos foram os primeiros antibacterianos a serem inseridos na prática clínica e a penicilina foi a primeira droga inserida no mercado. Após

1 casos de resistência em *Staphylococcus aureus*, iniciou-se o uso da metilina e
2 oxacilina, e também penicilinas semissintéticas, específicas para o tratamento
3 de infecções por estafilococos produtores de beta-lactamases. Com a introdução
4 dessas drogas, várias epidemias causadas por diferentes clones de
5 *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (Methicillin-resistant
6 *Staphylococcus aureus* - MRSA) ocorreram em diferentes regiões geográficas,
7 sendo esse, um importante patógeno em todo mundo. Com o aumento dos casos
8 de MRSA, a prescrição da vancomicina foi e continua sendo frequente. A
9 primeira resistência à vancomicina foi descoberta em *Enterococcus faecium*, na
10 França. Posteriormente, foi encontrada essa resistência em *Enterococcus*
11 *faecalis* e também em *S. aureus*. Outro importante mecanismo de resistência
12 aos beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamase de espectro estendido
13 (ESBL) por enterobactérias. As infecções causadas por bactérias produtoras
14 dessa enzima oferecem um grande desafio à terapia antibacteriana, pois as
15 ESBL inativam as penicilinas, cefalosporinas (exceto as da segunda geração) e
16 monobactâmicos, restringindo as opções de tratamento (LAGO; FUENTEFRIA;
17 FUENTEFRIA, 2010; MOELLERING, 2011).

18 Outro fator envolvido na resistência é a enzima *Klebsiella pneumoniae*
19 carbapenemase, a KPC. Essa enzima confere resistência aos carbapenêmicos,
20 além de inativar as penicilinas, cefalosporinas e os monobactâmicos. A enzima
21 KPC é um importante mecanismo de resistência no ambiente hospitalar, e seu
22 diagnóstico é importante no controle de sua disseminação e redução da
23 mortalidade relacionada às infecções por essas bactérias (DIENSTMANN et al.,
24 2010; REYGAERT, 2018).

25 A sensibilidade colateral, na qual a resistência a um antimicrobiano
26 aumenta a suscetibilidade a outras drogas, mostrou-se eficiente para evitar o
27 desenvolvimento de resistência já que pode, potencialmente, ser usada em
28 protocolos de manejo clínico de infecções bacterianas Gram negativas
29 (IMAMOVIC; SOMMER, 2013; PODNECKY et al., 2018). Assim, a aplicação de
30 ciclos de três ou quatro drogas pode aumentar a eficácia do tratamento quando
31 projetado de forma otimizada (IMAMOVIC; SOMMER, 2013).

32

1 3.2 Nanotecnologia e nanopartículas

2

3 A palavra nano é derivada do grego, que significa “anão” e o conceito de
4 Nanotecnologia foi dado por Richard Feynman em 1959. A nanociência pode ser
5 definida como a ciência que estuda os fenômenos e a manipulação dos materiais
6 em escala atômica, molecular e macromolecular, onde as suas propriedades
7 diferem-se em larga escala (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO
8 INDUSTRIAL, 2010; RICCARDI; SANTOS; GUASTALDI, 2015).

9 Diante do crescente desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos
10 convencionais, a Nanotecnologia foi um dos ramos da ciência que mais cresceu
11 e se desenvolveu nos últimos anos. Essa ciência envolve processos materiais e
12 produtos na escala nanométrica, oferecendo oportunidade para alterar o
13 tamanho e propriedades físico-químicas, potencializando sua funcionalidade e
14 reduzindo a concentração necessária para seu uso (AGÊNCIA BRASILEIRA DE
15 DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; LARA et al., 2010).

16 A escala “nano” é uma dimensão considerada muito pequena, já que 1
17 nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo do metro, e geralmente os materiais
18 de importância em Nanotecnologia estão entre 1 e 100 nm, tais como as
19 nanopartículas (NPs) (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO
20 INDUSTRIAL, 2010; DURÁN et al., 2015).

21 A transição para nanopartícula envolve o aumento da área de superfície
22 e mudanças nas propriedades. A ação antibacteriana depende da sua superfície
23 de contato, sendo que uma razão área de superfície/volume maior das NPs
24 permite uma gama de interações com moléculas orgânicas e inorgânicas
25 (HERNÁNDEZ-SIERRA et al., 2008; RICCARDI; SANTOS; GUASTALDI, 2015).

26 As NPs são usadas na medicina para diversos fins, como na terapia e
27 diagnóstico para o tratamento de câncer, diabetes, asma e alergia (ALKALADI;
28 ABDELAZIM; AFIFI, 2014; HALEY; FRENKEL, 2008; KENYON *et al.*, 2013).
29 Também possuem atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus,
30 mesmo aqueles resistentes a antimicrobianos convencionais (ELECHIGUERRA
31 *et al.*, 2005; JAIN; RIDKER, 2005; KIM *et al.*, 2008; MIRZAJANI *et al.*, 2011).

1 As NPs podem ser sintetizadas utilizando métodos físicos e químicos,
2 bem como extratos de plantas e microrganismos, que possuem capacidade de
3 reduzir íons metálicos para formar as NPs. A síntese utilizando materiais
4 ecologicamente corretos, como extratos de folhas de planta, bactérias e fungos,
5 ganhou enorme popularidade. Esse método de síntese avança sobre os métodos
6 físicos e químicos, pois não utiliza produtos químicos tóxicos, e a síntese é em
7 larga escala (ROY et al., 2013; SALAM et al., 2012).

8 Com o desenvolvimento e habilidade da produção e manipulação em
9 escalas nanométricas, surgiu, também, a necessidade de aplicação desses
10 novos materiais produzidos. Dessa forma, a Nanotecnologia passou a ser
11 estudada por novos ramos da ciência, como por exemplo na Biotecnologia
12 (NIKAM; RATNAPARKHIAND; CHAUDHARI, 2014; PINA et al., 2006).

13 Estão amplamente distribuídas em produtos presentes no nosso cotidiano
14 como produtos têxteis, calçados, eletrônicos, cosméticos e na área da saúde são
15 amplamente exploradas nos produtos médicos e farmacêuticos, e em materiais
16 de uso odontológico (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

17 O efeito bactericida das NPs depende dos diferentes parâmetros, como
18 tamanho, formato e carga das superfícies das partículas. Além disso, as NPs
19 podem apresentar diversas composições, tais como metais, lipídeo, proteínas,
20 polímeros, entre outros. É importante o conhecimento das propriedades desses
21 nanomateriais para direcionamento de sua aplicação, por exemplo como
22 antimicrobianos ou liberação controlada de fármacos (DURÁN et al., 2015;
23 KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

24 As NPs metálicas apresentam uma ampla aplicação na indústria, podendo
25 ser utilizados diferentes metais na sua produção. Metais como ouro e prata estão
26 entre os mais estudados quando comparados a outros metais. Além da utilização
27 na área médica, as NPs têm ganhado espaço na indústria de cosméticos, sendo
28 aplicadas em protetores solar por bloquearem raios UVA e UVB, protegendo a
29 pele dos danos (HERMAN; HERMAN, 2014).

30

31

1 3.3 Nanopartículas de prata

2

3 Os metais têm sido utilizados há séculos como agente bactericida ou
4 bacteriostático, já que metais como prata, ouro, cobre e zinco apresentam
5 diferentes propriedades e espectro de ação (GRUMEZESCU *et al.*, 2010;
6 KOWSHIK *et al.*, 2002).

7 A aplicação da prata é feita para purificação de água potável para
8 armazenar em recipientes de prata. E é conhecida há tempos sendo utilizada em
9 diversas aplicações, como joias, utensílios, moedas, fotografia, explosivos, entre
10 outras (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010;
11 DURÁN *et al.*, 2015). Apesar de ser por sua atividade antimicrobiana, as
12 aplicações médicas decresceram com o desenvolvimento dos antimicrobianos
13 tradicionais (LARA *et al.*, 2010).

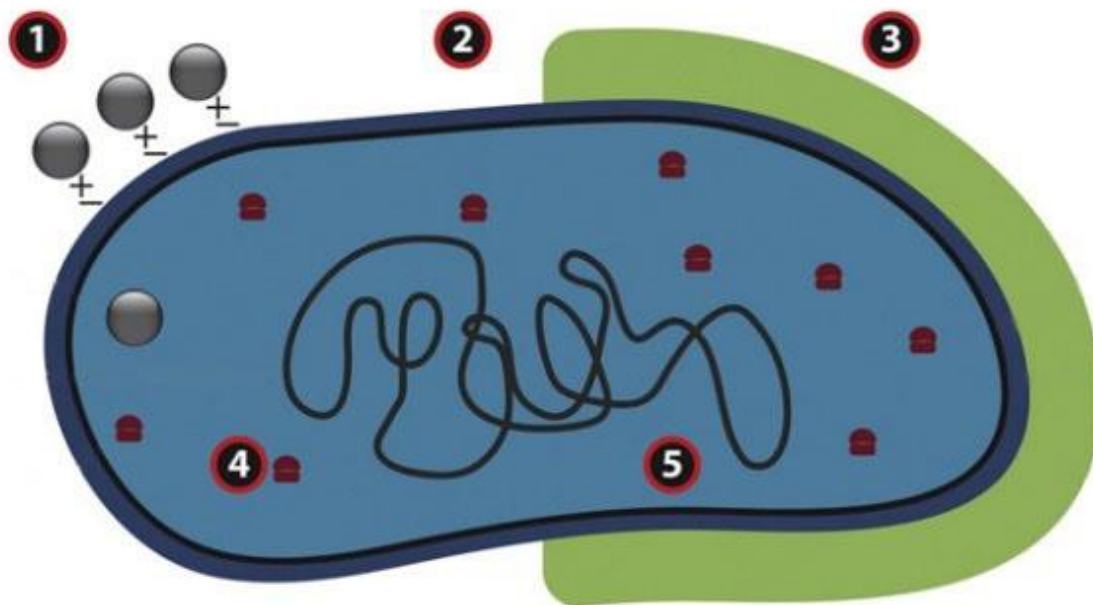
14 Com o avanço da Nanotecnologia a prata em escala nanométrica tem se
15 difundido em diversos setores por sua propriedade antimicrobiana. As
16 nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam efeito antimicrobiano mesmo em
17 baixas concentrações e estão sendo utilizadas em produtos de uso cotidiano,
18 como produtos têxteis, cosméticos, tintas, curativos, cateteres, equipamentos
19 odontológicos, mamadeiras, embalagens de comida, entre outros (AGÊNCIA
20 BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2010; CHEN;
21 SCHLUESENER, 2008; FERNANDES; FILGUEIRAS, 2002; MARCATO *et al.*,
22 2010).

23 O efeito antimicrobiano das AgNPs se estendem aos fungos, vírus e
24 bactérias (BIASI-GARBIN *et al.*, 2015; BOCATE *et al.*, 2019; DURÁN *et al.*, 2015;
25 FIGUEIREDO *et al.*, 2019; LARA *et al.*, 2010; SCANDORIEIRO *et al.*, 2016). O
26 seu uso frente as bactérias têm sido muito estudadas, pois apresentam ação
27 contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo as multirresistentes,
28 tais como *S. aureus* resistentes à meticilina, *S. epidermidis* e *E. coli* produtora da
29 enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e ESBL (ANSARI *et al.*,
30 2014; CARDOZO *et al.*, 2013; FIGUEIREDO *et al.*, 2019; SCANDORIEIRO *et al.*,
31 *et al.*, 2016).

1 As AgNPs são amplamente utilizadas em utensílios médicos, indústria e
2 produtos de consumo devido a sua propriedade. Porém, a toxicidade ambiental
3 e sua informação sobre o impacto nas bactérias dessa nanopartícula não é
4 elucidado (MCGILLICUDDY et al., 2017).

5 O mecanismo de ação das AgNPs não foi totalmente elucidado, porém
6 estudos mostram que elas possuem mais de um mecanismo de ação (Figura 1).
7 As AgNPs, em contato com a célula, liberam íons de prata que podem interagir
8 com estruturas celulares (DURÁN et al., 2015; MARCATO et al., 2010). Estudos
9 apontaram a interação das AgNPs com o DNA, levando a formação de radicais
10 livres, danificando proteínas e enzimas, desestabilizando a membrana celular,
11 afetando sua permeabilidade e o funcionamento da cadeia respiratória (DURÁN
12 et al., 2015; KIM et al., 2007; VISHNUPRIYA; CHAUDHARI; JAGANNATHAN,
13 2013; XU et al., 2012). Os múltiplos mecanismos de ação das AgNPs podem
14 explicar seu rápido mecanismos de ação (LOO; RUKAYADI; KUAN, 2018;
15 SCANDORIEIRO et al., 2016).

16



17

18

19 **Figura 1:** Mecanismo de ação antibacteriana de nanopartículas de prata proposto por
20 Durán e colaboradores (2015): 1 - atração eletrostática; 2 - produção de radicais livres,
21 mudanças na permeabilidade, perturbação da respiração, extravasamento de conteúdo
22 intracelular; 3 - modulação dos perfis de fosfotirosina das proteínas, envolvidos na

1 progressão do ciclo celular e na síntese de polissacarídeos capsulares; 4 - interação
2 com grupos tiol; inibição da síntese e função de proteínas; 5 - interação com moléculas
3 contendo fósforo (DNA).
4 Fonte: Durán et al., 2015 (Modificado).

5

6 A síntese de AgNPs pode ser feita por diversos processos, tais como
7 físicos, químicos e biológicos. Processos físicos e químicos em geral geram
8 resíduos tóxicos para o ambiente e o custo é mais alto. A síntese biológica,
9 conhecida como síntese verde gera menos danos ao ambiente, uma vez que
10 utiliza bactérias, fungos e plantas no seu processo e por esse fator tem sido
11 muito utilizada e estudada (DURÁN et al., 2011; SIDDIQI; HUSEN; RAO, 2018).

12 Os extratos de plantas têm sido muito utilizados na síntese de
13 nanopartículas, já que os fitoquímicos apresentam eficiente redução e
14 estabilização. Mallikarjuna e colaboradores (2012) utilizaram folhas de pimentas
15 como agente redutor e estabilizador na produção de AgNPs de tamanho entre 5
16 – 60 nm (MALLIKARJUNA et al., 2012).

17 Outra possibilidade para a síntese verde é o uso de bactérias. O uso
18 desses microrganismos é bastante promissor, já que estes apresentam um
19 crescimento rápido e alto metabolismo, além de ser de fácil manipulação gênica,
20 permitindo aprimoramentos no processo de síntese (OTARI et al., 2014).

21 Os fungos se apresentam como outra alternativa para a síntese verde de
22 nanopartículas, já que esses microrganismos apresentam uma melhor tolerância
23 a bioacumulação de metais e viabilidade de uma síntese em larga escala
24 econômica. *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum*
25 foram descritos na literatura como agentes redutores na síntese de
26 nanopartículas (DURÁN et al., 2005, 2015). O fungo *Fusarium oxysporum* foi
27 utilizado para a biossíntese de AgNPs e de acordo com os autores, a redução
28 dos íons metálicos de nitrato de prata acontecem através da ação da enzima
29 nitrato redutase e quinona transportadora de elétrons (DURÁN et al., 2005,
30 2015).

31

32

1 3.4 AgNPs no ambiente

2

3 A indústria da fotografia contribuiu significativamente para a emissão de
4 prata no ambiente, porém o advento da fotografia digital resultou num rápido
5 decréscimo da utilização da prata para esse fim (FABREGA et al., 2011;
6 MCGILLICUDDY et al., 2017).

7 Produtos contendo AgNPs de uso global podem expor tanto os indivíduos
8 quanto o ambiente à essas nanopartículas e essa exposição pode ocorrer em
9 diversas fases do processo de obtenção da nanopartícula, desde a síntese e
10 fabricação, distribuição, uso do produto final e descarte das AgNPs e seus
11 produtos (CUNNINGHAM; JOSHI, 2015; MCGILLICUDDY et al., 2017).

12 Estudos verificaram a especiação e a liberação de prata de produtos
13 comerciais. A liberação de prata de tecidos, dispositivos médicos, tintas e
14 máquinas de lavar comerciais varia de acordo com a forma e o seu método de
15 incorporação (GERANIO; HEUBERGER, 2009; MCGILLICUDDY et al., 2017).

16 De acordo com Kaweeteerawat e colaboradores (2017) uma acumulação
17 dose-dependente de espécies reativas de oxigênio (biótica) foi notada em *E. coli*
18 e *S. aureus*, sugerindo o rompimento da homeostase oxidativa induzida por
19 AgNP, sendo importante na mediação da toxicidade bacteriana
20 (KAWEETEERAWAT et al., 2017).

21 Nesse mesmo estudo, os autores verificaram o desenvolvimento de
22 resistência das bactérias frente a doses subletais de AgNP depois de sucessivas
23 seleções de células sobreviventes. Os antimicrobianos convencionais tiveram a
24 Concentração Inibitória Mínima (MIC) aumentadas para as cepas que tiveram
25 contato com as AgNP de *E. coli*, sendo a cepa selvagem com a MIC de 32 e a
26 cepa tratada 64 mg/L para penicilina, de 4 para 16 mg/L para cloranfenicol e de
27 16 para 32 mg/L para amoxicilina com ácido clavulânico (KAWEETEERAWAT et
28 al., 2017).

29 A exposição ao AgNP indicou que os AgNPs podem induzir danos
30 químicos ao DNA plasmidial. Os dados sugerem a possibilidade de que a
31 exposição aos AgNPs também desencadeie uma adaptação de bactérias por

1 meio de danos no DNA e subsequente mutação genética (KAWEETEERAWAT
2 et al., 2017).

3 Apesar das diversas aplicações e vantagens das AgNPs frente as
4 bactérias, já foram reportadas, por diversos autores, a resistência a essas
5 nanopartículas, levantando uma preocupação sobre sua utilização (DAKAL et
6 al., 2016; FINLEY et al., 2015; MULLER, 2018).

7 O mecanismo de resistência a íons de prata já é conhecido, sendo
8 mediado por bloqueio da entrada dos íons desse metal na célula, seja por
9 alteração da permeabilidade ou sequestro dos íons, ou por bomba de efluxo,
10 responsável por expulsar o metal de dentro da bactéria (KEDZIORA et al., 2018;
11 PANÁČEK et al., 2018; RANDALL et al., 2015).

12 Já foram descritos mecanismos endógenos e exógenos de resistência a
13 prata. O mecanismo endógeno gera mutações em dois pontos, nos genes *opmR*
14 e *cusS*, levando a perda de porinas (OmpC/F) e expressão de sistemas de efluxo
15 (sistema CusCFBA) como mostrado (RANDALL et al., 2015). A resistência
16 exógena foi descrita primariamente em *Salmonella Typhimurium*, em 1975, e se
17 dá através das proteínas Sil, responsáveis pelo efluxo de íons da prata de dentro
18 da célula. Essa resistência é plasmidial e a região responsável por abrigar 9
19 genes codificadores de proteínas Sil, reunidos em três unidades de transcrição
20 (*silRS*, *silE* e *silCFBAGP*). Esses genes já foram descritos em *Enterobacter*,
21 *Klebsiella*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e em Gram positivas como *S.*
22 *aureus* (FINLEY et al., 2015; RANDALL et al., 2015).

23 Ainda não há um consenso da contaminação no ambiente, bem como, o
24 potencial efeito adverso nos humanos e outros animais devido ao amplo uso das
25 AgNPs (KAWEETEERAWAT et al., 2017).

26 A síntese, produção e consumo de produtos incorporados com AgNP são
27 possíveis rotas de contaminação ambiental. De fato, as AgNPs foram
28 encontradas acumuladas em solo e em ecossistemas aquáticos e as bactérias
29 ambientais podem ser expostas as AgNPs nessas circunstancias
30 (KAWEETEERAWAT et al., 2017).

1 Desse modo, há a necessidade da atenção quando ao uso das AgNPs
2 bem como a liberação dessas partículas no ambiente, no intuito de controle do
3 desenvolvimento de resistência frente as essas nanopartículas. É necessário
4 que o uso das NPs seja feito de forma estratégica, evitando a disseminação de
5 genes resistência as AgNPs e aumento desse problema.

6

1 **4. MATERIAIS E MÉTODOS**
2

3 A metodologia, os resultados e a discussão foram apresentados na forma
4 de artigo científico. A formatação do artigo foi feita seguindo as normas da revista
5 *Journal of Nanoparticle Research*, na qual esse foi submetido.

6

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Cartilha sobre Nanotecnologia**. [s.l: s.n.].
- ALKALADI, A.; ABDELAZIM, A.; AFIFI, M. Antidiabetic Activity of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2015–2023, 2014.
- ANSARI, M. A. et al. Gum arabic capped-silver nanoparticles inhibit biofilm formation by multi-drug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 688–699, 2014.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Effect of eugenol against *Streptococcus agalactiae* silver nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- BOCATE, K. P. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, n. September 2018, p. 79–86, 2019.
- CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, p. 12, 2013.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. 2019.
- CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008.
- CUNNINGHAM, S.; JOSHI, L. **Assessment of exposure of marine and freshwater model organisms to metallic nanoparticles**. [s.l: s.n.].
- DAKAL, T. C. et al. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–17, 2016.
- DIENSTMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

- 1 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by
2 several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 7, p.
3 1–7, 2005.
- 4 DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular
5 metal nanoparticles by peptides , bacteria , fungi , and plants. **Appl Microbiol**
6 **Biotechnol**, p. 1609–1624, 2011.
- 7 DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on
8 antimicrobial activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and**
9 **Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2015.
- 10 ELECHIGUERRA, J. L. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.
11 **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, p. 6, 2005.
- 12 FABREGA, J. et al. Silver nanoparticles : Behaviour and effects in the aquatic
13 environment. **Environment International**, v. 37, n. 2, p. 517–531, 2011.
- 14 FERNANDES, M. F. M.; FILGUEIRAS, C. A. L. Um panorama da
15 nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Quimica Nova**, v. 25, n. 4,
16 p. 689–695, 2002.
- 17 FIGUEIREDO, E. et al. New Approach For Simvastatin As An Antibacterial :
18 Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug-
19 Resistant Bacteria. **International Journal of nan**, 2019.
- 20 FINLEY, P. J. et al. Unprecedented Silver-Resistance in clinically isolated
21 Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and Wound Management.
22 **Antimicrob. Agents Chemother.**, n. May, 2015.
- 23 GERANIO, L.; HEUBERGER, M. The Behavior of Silver Nanotextiles during
24 Washing. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 21, p. 8113–8118,
25 2009.
- 26 GRUMEZESCU, A. et al. In vitro assay of the antimicrobial activity of Fe₃O₄
27 and CoFe₂O₄ / oleic acid – core/shell on clinical isolates of bacterial and fungal
28 strains. **Optoelectronics and Advance Materials - rapid communication**, v.
29 4, n. 11, p. 1798–1801, 2010.
- 30 HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment.

- 1 **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p.
2 57–64, 2008.
- 3 HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as antimicrobial agents: their
4 toxicity and mechanisms of action. **Journal of Nanoscience and**
5 **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946–957, 2014.
- 6 HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. The antimicrobial sensitivity of
7 *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold.
8 **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 237–
9 240, 2008.
- 10 IMAMOVIC, L.; SOMMER, M. O. A. Use of Collateral Sensitivity Networks to
11 Design Drug Cycling Protocols That Avoid Resistance Development. v. 5, n.
12 204, p. 1–10, 2013.
- 13 JAIN, M. K.; RIDKER, P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical
14 evidence and basic mechanisms. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 12,
15 p. 977–987, 2005.
- 16 KAWETEERAWAT, C. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria
17 mediated by silver nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental**
18 **Health, Part A**, v. 00, n. 00, p. 1–14, 2017.
- 19 KEDZIORA, A. et al. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver
20 in Nanoforms as Antibacterial Agents. **International Journal of Molecular**
21 **Sciences**, 2018.
- 22 KENYON, N. J. et al. Self-Assembling Nanoparticles Containing
23 Dexamethasone as a Novel Therapy in Allergic Airways Inflammation. **PLoS**
24 **ONE**, v. 8, n. 10, p. e77730, 2013.
- 25 KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and
26 toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.
- 27 KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, v.
28 3, p. 95–101, 2007.
- 29 KIM, K. J. et al. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes.
30 **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1482–1484, 2008.

- 1 KOWSHIK, M. et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-
2 tolerant yeast strain MKY3. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 95–100, 2002.
- 3 LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing
4 enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da**
5 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.
- 6 LARA, H. H. et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-
7 resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26,
8 n. 4, p. 615–621, 2010.
- 9 LOO, Y. Y.; RUKAYADI, Y.; KUAN, C. H. In Vitro Antimicrobial Activity of Green
10 Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne
11 Pathogens. v. 9, n. July, p. 1–7, 2018.
- 12 MALLIKARJUNA, K. et al. Phytochemical fabrication and characterization of
13 silver nanoparticles by using Pepper leaf broth. **ARABIAN JOURNAL OF**
14 **CHEMISTRY**, p. 1–5, 2012.
- 15 MARCATO, P. D. et al. Potential Use of Silver Nanoparticles on Pathogenic
16 Bacteria, their Toxicity and Possible Mechanisms of Action. **Journal Of The**
17 **Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949–959, 2010.
- 18 MCGILLICUDDY, E. et al. Silver nanoparticles in the environment : Sources ,
19 detection and ecotoxicology. **Science of the Total Environment**, v. 575, p.
20 231–246, 2017.
- 21 MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on
22 *Staphylococcus aureus*. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 5, p. 542–549,
23 2011.
- 24 MOELLERING, R. C. MRSA: the first half century. **Journal of Antimicrobial**
25 **Chemotherapy**, n. October 2011, p. 4–11, 2011.
- 26 MULLER, M. Bacterial Silver Resistance Gained by Cooperative Interspecies
27 Redox Behavior. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. May, 2018.
- 28 NIKAM, A.; RATNAPARKHIAND, M.; CHAUDHARI, S. Nanoparticles - An
29 overview. **International Journal of Research and Development in Pharmacy**
30 **and Life Sciences**, v. 1, n. 2, p. 32–39, 2014.

- 1 O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally : final report and
2 recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, n. May, p. 1–80,
3 2016.
- 4 OTARI, S. V et al. Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria
5 and its antimicrobial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and**
6 **Biomolecular Spectroscopy**, 2014.
- 7 PANÁČEK, A. et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to
8 overcome it. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. January, 2018.
- 9 PINA, K. V. et al. Nanotecnologia e Nanobiotecnologia: esado da arte,
10 perspectivas de inovação e investimentos. **Revista Gestão Industrial**, p. 115–
11 125, 2006.
- 12 PODNECKY, N. L. et al. Conserved collateral antibiotic susceptibility networks
13 in diverse clinical strains of *Escherichia coli*. **Nature Communications**, n. 2018,
14 2018.
- 15 RANDALL, C. P. et al. Silver resistance in Gram-negative bacteria : a dissection
16 of endogenous and exogenous mechanisms. **Journal of Antimicrobial**
17 **Chemotherapy**, p. 1–10, 2015.
- 18 REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of
19 bacteria. v. 4, n. April, p. 482–501, 2018.
- 20 RICCARDI, C. DOS S.; SANTOS, M. L. DOS; GUASTALDI, A. C. **Engineered**
21 **Nanomaterials Nanotoxicology Issues, Nanosafety and Regulatory Affairs**.
22 [s.l: s.n.].
- 23 ROY, N. et al. Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to
24 overcome toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 3,
25 p. 807–812, 2013.
- 26 SALAM, H. A. et al. Plants : Green Route for Nanoparticle Synthesis.
27 **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 85–90,
28 2012.
- 29 SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive Effect of Oregano Essential
30 Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial

- 1 Strains. **Frontiers in Microbiology**, n. August, 2016.
- 2 SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de
3 resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do
4 Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência**
5 **Veterinária e Saúde Pública**, p. 29–38, 2014.
- 6 SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A.; RAO, R. A. K. A review on biosynthesis of silver
7 nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**,
8 2018.
- 9 SMITH, R.; COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. v. 1493, n.
10 March, p. 1–5, 2013.
- 11 VISHNUPRIYA, S.; CHAUDHARI, K.; JAGANNATHAN, R. Single-Cell
12 Investigations of Silver Nanoparticle – Bacteria Interactions. **Particle & Particle**
13 **Systems Characterization**, p. 1056–1062, 2013.
- 14 XU, H. et al. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of
15 silver nanoparticles on *Escherichia coli*. p. 45–53, 2012.
- 16

1 Resistance to silver nanoparticles: genotypic and phenotypic analysis in
2 *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains

3
4 Figueiredo, E. P¹; Nishio, E. K¹; Kobayahi, R. K. T¹; Durán, N. E. C²; Seabra, A.
5 B³; Vespero, E. C⁴; Perugini M, R, E⁵; Nakamura, C. V⁶; Nakazato, G^{1*}.

6
7
8 ¹Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná,
9 Brazil.

10 ²Chemical Institute, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

11 ³Center for Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, São
12 Paulo, São Paulo, Brazil

13 ⁴Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

14 ⁵Universitary hospital of State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

15 ⁶Health Sciences Center, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

16
17
18
19
20
21 ***Correspondence author:** Gerson Nakazato, Department of Microbiology,
22 Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Campus
23 Universitário, CEP 86055-990, Londrina, PR, Brazil, Phone: +55 (43) 3371-
24 4396, Fax: +55 (43) 3371-4788, CP 6001, e-mail: gnakazato@uel.br.

25
26
27
28
29

1 **ABSTRACT**

2 Infections caused by microorganisms resistant to antimicrobials are responsible
3 for increasing the hospitalization length of affected patients, increasing the costs
4 of treatments, and the rate of morbidity and mortality. In our study, we evaluated
5 phenotypical and genotypic alteration in Gram negative bacterial strains against
6 prolonged underdoses exposure to silver nanoparticles (AgNP_{bio}). The spherical
7 AgNP_{bio} with average size of 67.69 nm was synthesized biologically by *Fusarium*
8 *oxysporum*. After prolonged exposure, it was possible to observe alteration in
9 minimal inhibitory concentration in seven bacterial strains (62.5-125 µM to
10 above 1,000 µM). After bacterial assay induction, three bacterial strains showed
11 alteration in collateral sensitivity and cross-resistance in response to
12 conventional antimicrobials. The clonality of wild and their induced bacterial
13 strains showed 100% similarity by ERIC-PCR technique. Our results showed a
14 necessary attention in prolonged exposure of AgNP_{bio} against bacterial strains.

15

16 **KEYWORD:** Nanoparticles; Nanotechnology; Antimicrobial Resistance;
17 Collateral Sensitivity; Cross-Resistance.

1 INTRODUCTION

2

3 There has been a great deal of discussion about bacterial resistance to
4 conventional antimicrobials in recent years, since it is a public health problem
5 occurring worldwide. Infections caused by microorganisms resistant to
6 antimicrobials are responsible for increasing the length of hospitalization of
7 affected patients, the cost of treatments, and also increase the rate of morbidity
8 and mortality. In addition to being a current problem, studies demonstrate how
9 this situation could become even worse in the coming years (O'Neill 2016; CDC
10 2019).

11 Metals have been used since ancient times as antibacterial agents and
12 present different properties and spectra of action. Among the metals, silver is
13 one of the most commonly used due to its efficiency as an antimicrobial and its
14 low toxicity, being impregnated in utensils and materials used in medicine
15 (Mohanraj and Chen 2006; Durán et al. 2015).

16 With the advent of nanotechnology in the medical area, silver
17 nanoparticles (AgNP) have become widely studied for their antimicrobial action,
18 including against multidrug-resistant bacteria (Scandorieiro et al. 2016;
19 Figueiredo et al. 2019). AgNP are interesting when compared to silver ions due
20 to their small size and high superficial area, which, in turn, improve their ability
21 to react with multiple molecules. This feature leads to an ultra-large surface
22 area per volume, where a large proportion of atoms are in immediate contact
23 with the environment and readily available for reactions (Hernández-Sierra et al.
24 2008; Riccardi et al. 2015).

25 Antibacterial action of silver has been known for many centuries. In
26 various forms (metallic silver, silver salt and colloidal silver) its antibacterial
27 activity was maintained during this period, however, some studies bring
28 inconclusive results on the development of bacterial resistance to AgNP (Dakal
29 et al. 2016; Muller 2018; Panáček et al. 2018).

30 Silver nanoparticle (AgNP) is a promising nanomaterial in medical and
31 biotechnological applications due to its great antimicrobial efficiency (Durán et
32 al. 2015; Mcgillicuddy et al. 2017; Panáček et al. 2018). AgNPs have high

1 antibacterial activity in concentrations that are not cytotoxic to the human cell
2 and have activity even against those strains of multi-resistant bacteria
3 (Scandorieiro et al. 2016; Panáček et al. 2018; Figueiredo et al. 2019).

4 Despite the promising antimicrobial potential of AgNPs, it is too early to
5 replace traditional antimicrobials in local and systemic infections to them, since
6 the potential development of bacteria resistant to AgNPs must be considered
7 (Panáček et al. 2018). The wide use of AgNP still does not have a consensus
8 on contamination of the environment as well as potential adverse effects on
9 humans (Kaweeteerawat et al. 2017).

10 Therefore, it is necessary to know the impacts caused by the repeated
11 exposure of AgNPs to bacteria. In the present study, the objective was to
12 induce resistance in Gram-negative bacteria strains to biologically produced
13 silver nanoparticles in order to evaluate phenotypic changes resulting from
14 prolonged exposure to silver nanoparticles.

15

16

17

1 **METHODOLOGY**

2

3 **Bacterial strains**

4

5 Standard bacterial strains used in this study were *Escherichia coli* DH5 α ,
6 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031.
7 Clinical isolates strains used were *Klebsiella pneumoniae* 10212, *Klebsiella*
8 *pneumoniae* 71661, *Klebsiella pneumoniae* 49375, *Enterobacter aerogenes*
9 93318, *Enterobacter cloacae* 48615, belonging to bacterial collections from
10 Laboratory of Basic and Applied Bacteriology and University Hospital of the
11 State University of Londrina, *Escherichia coli* IC83 isolated from a patient with
12 urinary tract infection and *Pseudomonas aeruginosa* P3400 was donate by
13 Adolfo Lutz Institute-Presidente Prudente-SP, Brazil. Bacterial strains were
14 stored in Brain Heart Infusion broth (BHI) with glycerol 20% (Difco®) at -80 °C
15 until time of use.

16

17

18 **Synthesis and characterization of silver nanoparticles**

19

20 Silver nanoparticles were synthesized biologically as described previously
21 (Durán et al. 2005) and has been patented (Patent, 2006, PI 0605681-4A2;
22 <http://www.inpi.gov.br>). *Fusarium oxysporum* was grown in malt agar (Difco®)
23 contained 0.5% yeast extract, by 7 days at 30 °C. Then, 10 g of fungus biomass
24 was weighed, transferred in 100 ml of sterile distilled water and incubated with
25 constant agitation (150 rpm), during 72 h at 30 °C. Subsequently, biomass was
26 recovered by vacuum filtration and added to the supernatant AgNO₃ to a final
27 concentration 10 mM. System was incubated in a dark environment during 15
28 days to 28 °C.

29

30 After synthesis, AgNP_{bio} was submitted a step of washing by
centrifugation (27,000g, 4 °C for 30 min) and incubation in ultrasonic bath (for

1 30 min). Both steps were repeated for three times. To quantify Ag, we
 2 performed Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer EDX-7000.
 3 Nanoparticles diameter was determined by photon correlation spectroscopy
 4 using ZetaSizer NanoZS (Malvern) and the same instrument was used to
 5 perform zeta potential. Transmission electron microscopy (TEM) (JEOL JEM-
 6 1400 Electron Microscope) was performed to observed shape and size of
 7 AgNP_{bio}.

8

9 **Resistance induction bacterial assay**

10

11 Strains submitted to induction (Table 1) was grown previously in agar
 12 Muller-Hinton (MH), transferred for a microtube containing 1 ml of MH broth and
 13 treated with AgNP_{bio}. Bacterial in contact with AgNP_{bio} was incubated for 24 h in
 14 37°C. Control positive (bacterial and MH) and negative (only MH) was
 15 performed. Initial concentration of AgNP_{bio} in induction assay was 20 µM. Each
 16 3 days, concentration of AgNP_{bio} in contact with bacteria was increased in 10
 17 µM and 10 µl of culture was transferred for a new microtube containing MH
 18 broth. Maximum concentration tested was 300µM. To confirm susceptibility
 19 before and after induce assay of AgNP_{bio}, Minimal Inhibitory Concentration
 20 (MIC) for all strains was performed.

21

22

Bacterial species	Clinical isolates	Standard strains
<i>Escherichia coli</i>	IC83	DH5α
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	71661, 10212, 49375	ATCC 10031
<i>Enterobacter aerogenes</i>	93318	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	48615	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P3400	ATCC 9027

1 **Table 1:** Bacterial strains performed to resistance induction bacterial assays.

2

3 **Minimal inhibitory concentration determination**

4

5 We determined the MIC before and after bacterial induction assay
6 through broth microdilution assay, in 96 wells plate (Corning®) as recommended
7 by Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines (CLSI 2015). Different
8 AgNP_{bio} concentrations (7.8 µM to 1,000 µM) were tested. Bacteria previously
9 cultured on MH agar were diluted to obtained 1.5×10^8 CFU ml⁻¹ (Colony
10 Forming Units) according 0.5 McFarland scale. Bacterial suspension was
11 diluted in MH broth (1:100), placed in 96 wells plate to a density of 5.0×10^5
12 CFU ml⁻¹. Test was incubated at 37 °C for 24 h and results were observed
13 through turbidity. Bacterial considered resistant were those capable of growing
14 at a concentration of 1,000 µM after resistance induction bacterial assay
15 (Brauner et al. 2016).

16

17 **ERIC-PCR**

18

19 Bacterial strains before and after induction assay were grown in Luria
20 Bertani broth (LB) (Difco R, Sparks, MD) at 37 °C for 24 h. For the Entobacterial
21 Repetitive Intergenic Consensus Sequence Polymerase Chain Reaction (ERIC-
22 PCR) assays, DNA samples were extracted using an extraction Pure Link®
23 Genomic DNA Mini Kit as recommended by manufacturer (Invitrogen®).

24 A template DNA was used to amplify repetitive elements from bacterial
25 before and after induction assay and clonality of the bacterial strains induced
26 was determined by the homology relationship among fragments amplified by
27 ERIC-PCR (Versalovic et al. 1991). Gel analysis was carried out through
28 BioNumerics software, version 7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Laten,
29 Belgium). Similarities in amplicon profile were compared using a DICE
30 coefficient at 1% tolerance and 0.5% optimization. A dendrogram was

1 constructed with unweighted-pair group method with arithmetic mean clustering
2 method and considered clonality 80% similarity (Mclellan et al. 2003).

3

4 **Antimicrobial susceptibility testing**

5

6 Antimicrobial susceptibility testing was determined by Disk diffusion agar
7 according Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2018). Antimicrobials
8 used in this study included several classes as B-lactams: 30 µg of cefotaxime
9 (CTX), 30 µg of ceftazidime (CAZ), 30 µg of cefepim (FEP) 30 µg of aztreonam
10 (ATM), 30 µg of ceftiofur (FOX), 30 µg of cefuroxime (CXM), 30 µg of cefalotin
11 (CAS), 30 µg of ceftazidime (CAZ), 30 µg of amikacin (AMC); 10 µg ampicillin
12 (AMP), 10 µg imipenem (IPM), 10 µg meropenem (MEM) and 10 µg ertapenem
13 (ETP); 20/10 µg of amoxicillin-clavulanic acid (AMC); Quinolones: 5 µg of
14 ciprofloxacin (CIP), levofloxacin (LVX), 10 µg of norfloxacin (NOR), and 30 µg
15 nalidixic acid (NAL); Sulfonamides: 1.25/23.75 µg of trimethoprim-
16 sulfamethoxazole (SXT); Aminoglycosides: 10 µg of gentamicin (GEN);
17 Phenicol - 30 µg of chloramphenicol (CHL); Nitrofurans: 300 µg of
18 nitrofurantoin (NIT) and Fosfomycins: 200 µg of fosfomicin (FOT) (Oxoid Ltd.,
19 Basingstoke, Hants, United Kingdom).

20 **RESULTS**

21

22 **Silver nanoparticles characterization**

23

24 The mean diameter of AgNP_{bio} size and its mean potential zeta value
25 was 67.69 nm (Figure 1) and – 18.77 mV (Figure 2) respectively. Spherical
26 nanoparticles were observed by TEM (Figure 3). According quantification made
27 by EDX silver concentration in the solution of AgNP_{bio} after purification and
28 washing was 6mM.

29

30 **Resistance induction bacterial assay**

1 After AgNP_{bio} resistance induction assay was possible to observe the
 2 increase of MIC for 7 bacterial strains (Table 2). We observed no increase in
 3 MIC to AgNP_{bio} to bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* and
 4 *Enterobacter aerogenes* species. All *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Enterobacter*
 5 *cloacae* strains tested showed a MIC grater than 1000 μ M before resistance
 6 induction assay. After induction, *K. pneumoniae* 10212 showed two types of
 7 different colonies, a colony as the wild strain (10212 norm) and a colony with
 8 mucoid aspect (10212 muc).

Bacterial strains	MIC before test	MIC after test
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 10212*	125 μ M	>1000 μ M
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 71661	125 μ M	>1000 μ M
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 49375	125 μ M	>1000 μ M
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC10031	125 μ M	125 μ M
<i>Enterobacter cloacae</i> 48615	125 μ M	>1000 μ M
<i>Enterobacter aerogenes</i> 93318	125 μ M	62.5 μ M
<i>Escherichia coli</i> IC83	125 μ M	>1000 μ M
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	125 μ M	>1000 μ M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA3400	62.5 μ M	62.5 μ M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	62.5 μ M	62.5 μ M

9

10 **Table 2:** Minimal inhibitory concentration (MIC) of bacterial strains before and
 11 after resistance induction assay. *Both colonies (norm and muc) showed same
 12 MIC after induction assay.

13

14 Minimal inhibitory concentration determination

15

16 We determined the MIC before and after resistance induction bacterial
 17 assay. MIC of bacterial strains of *E. coli* DH5 α , *E. coli* IC83, *K. pneumoniae*
 18 10212, *K. pneumoniae* 71661 and *E. cloacae* 48615 before resistance induction
 19 assay was 125 μ M and after increase for more than 1,000 μ M (Table 2).

1 For bacterial *K. pneumoniae* ATCC10031, *E. aerogenes* 93318 MIC
2 before resistance induction assay was 125 μ M and after induction, MIC was 125
3 μ M and 62.5 μ M respectively. *P. aeruginosa* PA3400 and *P. aeruginosa*
4 ATCC9027, MIC before and after resistance induction assay was 62.5 μ M,
5 showing no alteration in MIC by the test.

6

7 **ERIC-PCR**

8

9 We performed ERIC-PCR for 3 bacteria to confirm similarity between
10 bacterial strains before and after resistance induction assay. The analysis
11 (Figure 4) showed 100% of similarity between wild and induced bacterial
12 strains. *K. pneumoniae* 10212 norm and *K. pneumoniae* 10212 muc showed
13 100% of similarity, indicating that the strains, despite the colony difference was
14 the same bacterial strain.

15

16 **Antimicrobial susceptibility testing**

17

18 As show in Table 3, bacterial strains available present difference in
19 profile of sensitivity and resistance. After induction assay, *E. coli* DH5 α showed
20 alteration in sensitivity profile in two antimicrobials when compared with wild
21 strain. *Klebsiella pneumoniae* 49375 after induction showed alteration in profile
22 of 5 antimicrobials.

23 Data obtained in antimicrobial susceptibility testing demonstrated
24 alteration on *K. pneumoniae* 10212 norm sensibility profile when compared with
25 wild strain. There was change in sensibility and resistance for 6 antimicrobials in
26 *K. pneumoniae* 10212 muc when compared with wild strain, that showed
27 alteration in 8 antimicrobials.

28

29

Bacterial strains	S - R	S - I	R - S	R - I	I - S	I - R
49375 ind	CAS, NIT	CZ, IPM	AMC			
DH5a ind	CAS	AMC				
10212 norm		CTX		CAZ	LVX, MEM	NAL, FOT
10212 muc	CTX, IPM, FOX				CIP, LVX	ETP

1

2 **Table 3:** Antimicrobials alteration in antimicrobial disk diffusion test before and
3 after bacterial induction assay. *S - R – alteration sensitive to resistant; S - I –
4 alteration sensitive to intermediate; R - S – alteration resistant to sensitive; R - I
5 – alteration resistant to intermediate; I - S – alteration intermediate to sensitive; I
6 - R – alteration intermediate to resistant. CAS – cefalotin; NIT – nitrofurantoin;
7 CTX – cefotaxime; IPM – imipenem; FOX – ceftiofloxacin; AMC – amikacin; CAZ –
8 cefazolin; LVX – levofloxacin; MEM – meropenem; CIP – ciprofloxacin; NAL -
9 nalidixic acid; FOT – fosfomicin; ETP – ertapenem.

10

11

1 DISCUSSION

2

3 Present research showed antibacterial activity of AgNP_{bio} synthesized
4 biologically with a MIC of 125 µM in Gram negative bacterial strains. A similar
5 results using AgNP_{bio} synthesized by *Fusarium oxysporum* against resistant and
6 standards Gram negative bacterial strains was obtained previously
7 (Scandorieiro et al. 2016; Figueiredo et al. 2019). These studies confirm
8 susceptibility of AgNP_{bio} against bacterial strains used in our study.

9 Chemical and physical characteristics of silver nanoparticles influence
10 their antibacterial activity and studies reported great efficacy against
11 microorganism with different sizes of AgNP. Antimicrobial activity increases
12 when the size decreases since smaller particles have a wide contact surface in
13 the cells. AgNP also presents different morphology and stabilizing agent (Chen
14 and Schluesener 2008; Marambio-Jones and Hoek 2010; Durán et al. 2015). In
15 our study, AgNP_{bio} was used in a spherical shape, confirmed by TEM and a size
16 of the 67.69 nm. The size of AgNP_{bio} is larger than the results in other studies,
17 but the zeta potential and antimicrobial activity are similar to those described
18 previously (Scandorieiro et al. 2016; Figueiredo et al. 2019).

19 Silver nanoparticle mechanism of action is constantly studied but exact
20 cause of antibacterial activity is still unknown. Studies reported nanoparticles
21 interact to cell by different ways showing the importance of cell-NP contact to
22 AgNP action. AgNP mechanism of action are based in DNA interaction, free
23 radical generation, ROS formation and interaction with sulfur-containing
24 proteins and enzymes (Kim et al. 2007; Xu et al. 2012; Kurvet et al. 2013;
25 Vishnupriya et al. 2013; Durán et al. 2015)

26 Resistance induction bacterial assay was performed as described
27 previously with modification (Randall et al. 2015). After test 7 bacterial strains
28 showed a MIC >1,000µM and we considered resistant to AgNP_{bio}. Studies
29 showed a similar result after contact between bacteria and AgNP for a long time
30 of exposure, corroborating with results present in this study (Graves et al. 2015;
31 Randall et al. 2015; Kedziora et al. 2018; Panáček et al. 2018).

1 Bacterial strains showed increase in MIC after days in contact with
2 AgNP_{bio}, such as *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* and
3 *Escherichia coli* standard and clinical isolates. On the other hand, some strains
4 of bacteria, such as standard bacterial strains *K. pneumoniae* ATCC10031 and
5 clinical isolates of *Enterobacter cloacae* 93318 showed no increase in MIC after
6 repeated exposure to AgNP_{bio} (Panáček et al. 2018).

7 *Pseudomonas aeruginosa* both standard and clinical isolated bacterial
8 strains demonstrated no increase in MIC after repetitive contact with AgNP_{bio}.
9 Differently of our study, Panacek and collaborators (2018) showed after
10 repeated exposures to AgNP led to the development of resistance in
11 *Pseudomonas aeruginosa* (Panáček et al. 2018)

12 Mechanism of resistance to Ag⁺ can occurs by blocking the entry of metal
13 ions into the cell due to the change of permeability of the cellular membrane,
14 and by extracellular sequestration of ions that bind to polysaccharides or by
15 detoxification of ions entering the cytoplasm (active efflux, enzymatic
16 conversion or intracellular sequestration of silver ions by binding to proteins
17 (Kedziora et al. 2018).

18 According authors, resistance to AgNP after exposure for repetitive days
19 occurs rapidly and become of exogenous and endogenous mechanisms.
20 Exogenous mechanism was first described in *S. Typhimurium* isolated from a
21 hospital (Massachusetts, EUA) in 1975. This mechanism was associates by Sil
22 protein, responsible for silver ions efflux in bacterial cell and is located in
23 bacterial membrane cell (McHugh et al. 1975; Randall et al. 2015). The *sil*
24 operon, as the genes were called, comprise nine Open Reading Frames
25 (ORFs), seven structural genes (*silE*, *silC*, *silF*, *silB*, *silA*, ORF105 and *silP*) and
26 two encode a putative two-component regulatory circuit (*silR* and *silS*) (Gupta et
27 al. 1999; Silver 2003; Randall et al. 2015).

28 Endogenous mechanisms occur mutation has been reported in Gram-
29 negative bacteria under laboratory condition. Author suggests genes *ompR* and
30 *cusS* results in loss of porin (OmpC/F) and efflux system expression
31 (CusCFBA) (Randall et al. 2015).

1 Panacek and collaborators (2018) studied resistance to AgNP against *E.*
2 *coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. After repetitive contact, both strains
3 became resistant to AgNP with a formation of a precipitate and aggregation in
4 culture and showed that protein responsible for the resistance to AgNP is
5 flagellin. Besides, authors showed absence of genetic alterations in resistant
6 strains (Panáček et al. 2018).

7 Although bacterial resistance to antimicrobials has been widely
8 discussed in the literature, the possible development of resistance to silver
9 nanoparticles has not been fully explored (Panáček et al. 2018).

10 According ERIC-PCR *E. coli* DH5 α , *K. pneumoniae* 49375 and *K.*
11 *pneumoniae* 10212 bacterial strains showed 100% similarity between before
12 and after induction assay. It was possible to observe that strains with different
13 aspects of *K. pneumoniae* 10212 (muc and norm) showed 100% similarity,
14 demonstrating that the phenotypic change occurred after repeated exposure to
15 AgNP_{bio}. This result reveals the absence of contamination during the test,
16 confirming that bacteria acquired the resistance to AgNP_{bio}. The analysis of
17 DNA sequencing (data not shown) is being performed to prove this similarity
18 and to identify genetic alterations.

19 Some studies have already explored the collateral resistance to
20 conventional antimicrobials (Imamovic and Sommer 2013; Podnecky et al.
21 2018). In the present study, it was possible to observe changes in the sensitivity
22 and resistance profile to conventional antimicrobials when in prolonged
23 exposure to AgNP_{bio}.

24 *E. coli* DH5 α strain showed, after induction, changes in two antimicrobials
25 from different classes: amikacin, which is an aminoglycoside and cephalothin,
26 which is a cephalosporin. Mechanism of action of amikacin is by inhibition of
27 protein synthesis by binding to the ribosomal 30S (Ramirez and Tolmasky
28 2017). Resistance to amikacin is not very common as seen in the literature,
29 however it is known that mechanism may occurs by alteration of the target site
30 in the ribosomes, change in permeability and enzymatic modification of the drug
31 (Harbarth et al. 1998; Ramirez and Tolmasky 2017). After induction test, *E. coli*

1 DH5 α strain showed alteration of sensitive to intermediate for amikacin (CLSI
2 2018).

3 Cephalothin is a 1st generation cephalosporin and its mechanism of
4 action is based on the inhibition of bacterial cell wall synthesis through binding
5 to proteins binding penicillin (PBPs). Mechanism of resistance to these drugs is
6 through enzymatic inactivation, efflux pump, and alteration of the target (PBP).
7 After the induction test, *E. coli* DH5 α strain showed alteration in the agar
8 diffusion disk for this antimicrobial, showing resistance.

9 Mechanisms of collateral resistance involved in these changes may be
10 linked to cell permeability, the efflux pump and loss of porin since when it
11 became resistant to AgNP_{bio}, it also became resistant to conventional
12 antimicrobials (Durán et al. 2015; Randall et al. 2015).

13 It was possible to observe difference in the profile of resistance and
14 sensitivity to antimicrobials of the two strains of *K. pneumoniae* 10212 induced
15 (norm and muc). For the bacterium *K. pneumoniae* 10212 norm, after induction
16 it showed changes when compared to the wild. For antimicrobials: nalidixic acid,
17 fosfomicin and levofloxacin, after induction, the bacteria changed from
18 intermediate to resistant halo (CLSI 2018). For nitrofurantoin, profile was
19 changed from sensitive to a resistant halo. The sensitive cefoxitin antimicrobial
20 for intermediate and for resistant ceftazidime for intermediate.

21 When compared to the wild strain, *K. pneumoniae* 10212 muc showed a
22 change in the sensitivity profile of cefoxitin, meropenem, imipenem and
23 nitrofurantoin, going from sensitive to resistant. Nitrofurantoin are reduction
24 within the bacterial cell by flavoproteins for various reactive intermediates that
25 attack ribosomal proteins, DNA and interfere with respiratory chain bacterial
26 (Gardiner et al. 2019).

27 According to CLSI, ciprofloxacin and levofloxacin antimicrobials showed
28 changes in the inhibition zone in the bacterium *K. pneumoniae* 10212 muc
29 when compared to the wild strain, going from intermediate to sensitive. These
30 antimicrobials belong to quinolone class and have an action in inhibiting
31 bacterial DNA gyrase and topoisomerase (Pham et al. 2019).

1 For the antimicrobials ertapenem and fosfomycin, halo of inhibition in the
2 strain of *K. pneumoniae* 10212 muc changed to resistant, while in the wild strain
3 it was presented as an intermediate.

4 Induced strain of *K. pneumoniae* 49375 when compared with the wild
5 strain showed changes in the antimicrobials cephalothin, cefazolin, amikacin,
6 and imipenem. After the induction, the sensitivity profile of cephalothin, changed
7 from sensitive to resistant. For cefazolin and imipenem there was a change
8 from sensitive to intermediate and for antimicrobials amikacin, after induction,
9 they changed from resistant to sensitive.

10 As well as the induced *E. coli* DH5 α bacteria, *K. pneumoniae* 49375
11 induced altered the cephalothin antimicrobial, both becoming resistant to this
12 antimicrobial. *K. pneumoniae* 49375 induced, unlike the other bacteria studied,
13 demonstrated sensitivity to amikacin after induction. Amikacin is of the
14 aminoglycoside class, acting on the bacterial ribosome. The resistance
15 mechanism of bacteria against this antimicrobial is through alteration of the
16 target, alteration of permeability and enzymatic alteration of the drug (Ramirez
17 and Tolmasky 2017).

18 In view of these results, it was possible to observe changes in the
19 responses of bacteria to AgNP_{bio} and other conventional antimicrobials. Some
20 authors demonstrated sensibility collateral and cross-resistance (Imamovic and
21 Sommer 2013; Podnecky et al. 2018) and according Podnecky and
22 collaborators, analyses show resistance mechanism are mediated, in particular
23 by efflux-related mutation (Podnecky et al. 2018). As described by previously
24 studies, AgNP may be mediated by efflux systems and loss of porins (Finley et
25 al. 2015; Randall et al. 2015; Kedziora et al. 2018). Both mechanisms may be
26 related to changes in the response to antimicrobials as well since it prevents an
27 entry of the drug or generates an expulsion of it within the cell.

28 Therefore, use of nanoparticles need to be controlled, since repeated
29 contact of bacteria with AgNPs leads to the development of resistance,
30 therapeutic failure and as consequence increase in mortality of patients affected
31 by infections (Gunawan et al. 2013).

1 Interactions between compounds can be a possible alternative to control
2 development of resistance to AgNP_{bio}. Synergistic, additive, or antagonistic
3 effect may be effective against bacterial resistance according studies (Chin and
4 Weitzman 1997; Scandorieiro et al. 2016; Figueiredo et al. 2019).

6 CONCLUSION

8 AgNPs have already been successfully applied to various biomedical and
9 antimicrobial technologies and products used in everyday life. Besides,
10 environment toxicity and their information of bacterial impact of this nanoparticle
11 is not elucidated (Kaweeteerawat et al. 2017).

12 In conclusion, in our study was possible to observe impact of repetitive
13 contact between bacterial and AgNP_{bio}, developing resistance both against
14 nanoparticles and conventional antimicrobials.

15 It is necessary more studies to understand exactly mechanisms involved
16 in response of bacterial before contact with AgNP_{bio} in order to avoid problems
17 as increase in antimicrobial resistance, with consequence impact human health
18 by increase in hospital internment and worsening of infections.

19

20

21

1 Reference

2

3 Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ (2016) Distinguishing between
4 resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev*
5 *Microbiol* 14:320–330. doi: 10.1038/nrmicro.2016.34

6 CDC (2019) Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019

7 Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: A nanoparticle in medical
8 application. *Toxicol Lett* 176:1–12. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004

9 Chin NX, Weitzman I (1997) In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering
10 agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida*
11 species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*
12 41:850–852

13 CLSI C and LSI (2015) M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial
14 Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved
15 Standard—Tenth Edition

16 CLSI C and LSI (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility
17 testing

18 Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V (2016) Mechanistic Basis of
19 Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol* 7:1–17. doi:
20 10.3389/fmicb.2016.01831

21 Durán N, Durán M, de Jesus MB, et al (2015) Silver nanoparticles: a new view
22 on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*
23 *Nanotechnology, Biol Med* 12:789–799. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.016

24 Durán N, Marcato PD, Alves OL, et al (2005) Mechanistic aspects of
25 biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains.
26 *J Nanobiotechnology* 7:1–7. doi: 10.1186/1477-3155-3-8

27 Figueiredo E, Ribeiro J, Nishio E, et al (2019) New Approach For Simvastatin
28 As An Antibacterial : Synergistic Effect With Bio-Synthesized Silver
29 Nanoparticles Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Int J nan*

30 Finley PJ, Norton R, Austin C, et al (2015) Unprecedented Silver-Resistance in
31 clinically isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and
32 Wound Management. *Antimicrob Agents Chemother*. doi:
33 10.1128/AAC.00026-15

34 Gardiner BJ, Stewardson AJ, Abbott IJ, Peleg AY (2019) Nitrofurantoin and
35 fosfomycin for resistant urinary tract infections : old drugs for emerging
36 problems. *Australian Prescr* 42:14–19

37 Graves JL, Tajkarimi M, Cunningham Q, et al (2015) Rapid evolution of silver
38 nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front Genet* 5:1–13. doi:

- 1 10.3389/fgene.2015.00042
- 2 Gunawan C, Teoh WY, Marquis CP, Amal R (2013) Induced Adaptation of
3 *Bacillus* sp . to Antimicrobial Nanosilver. 1–7. doi: 10.1002/sml.201300761
- 4 Gupta a, Matsui K, Lo JF, Silver S (1999) Molecular basis for resistance to
5 silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* 5:183–188. doi: 10.1038/5545
- 6 Harbarth S, Rohner P, Edith S (1998) Gram-negative bloodstream isolates in a
7 university hospital between 1989 and 1994. *Clin Microbiol Infect* 3–8
- 8 Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Cruz Pena DC, et al (2008) The antimicrobial
9 sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide,
10 and gold. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 4:237–240. doi:
11 10.1016/j.nano.2008.04.005
- 12 Imamovic L, Sommer MOA (2013) Use of Collateral Sensitivity Networks to
13 Design Drug Cycling Protocols That Avoid Resistance Development. 5:1–
14 10
- 15 Kaweeteerawat C, Ubol PN, Sangmuang S, Maniratanachote R (2017)
16 Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria mediated by silver
17 nanoparticles. *J Toxicol Environ Heal Part A* 00:1–14. doi:
18 10.1080/15287394.2017.1376727
- 19 Kedziora A, Speruda M, Krzyzewska E, et al (2018) Similarities and Differences
20 between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int J*
21 *Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19020444
- 22 Kim JS, Kuk E, Yu N, et al (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles.
23 *Nanomedicine* 3:95–101. doi: 10.1016/j.nano.2006.12.001
- 24 Kurvet I, Kahru A, Bondarenko O, et al (2013) Particle-Cell Contact Enhances
25 Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. 8:. doi:
26 10.1371/journal.pone.0064060
- 27 Marambio-Jones C, Hoek EM V. (2010) A review of the antibacterial effects of
28 silver nanomaterials and potential implications for human health and the
29 environment. *J Nanopart Res* 1531–1551. doi: 10.1007/s11051-010-9900-y
- 30 Mcgillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, et al (2017) Silver nanoparticles in the
31 environment : Sources , detection and ecotoxicology. *Sci Total Environ*
32 575:231–246. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.041
- 33 McHugh GL, Hopkins CC, Moellering RC, Swartz MN (1975) *Salmonella*
34 *typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin.
35 *Lancet*
- 36 Mclellan SL, Daniels AD, Salmore AK (2003) Genetic Characterization of
37 *Escherichia coli* Populations from Host Sources of Fecal Pollution by Using
38 DNA Fingerprinting †. 69:2587–2594. doi: 10.1128/AEM.69.5.2587

- 1 Mohanraj VJ, Chen Y (2006) Nanoparticles – A Review. Trop J Pharm Res
2 5:561–573
- 3 Muller M (2018) Bacterial Silver Resistance Gained by Cooperative Interspecies
4 Redox Behavior. Antimicrob Agents Chemother. doi: 10.1128/AAC.00672-
5 18
- 6 O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally : final report and
7 recommendations. Rev Antimicrob Resist 1–80
- 8 Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, et al (2018) Bacterial resistance to silver
9 nanoparticles and how to overcome it. Nat Nanotechnol 13:. doi:
10 10.1038/s41565-017-0013-y
- 11 Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT (2019) Quinolone antibiotics. Med
12 Chem Commun 1719–1739. doi: 10.1039/c9md00120d
- 13 Podnecky NL, Fredheim EGA, Kloos J, et al (2018) Conserved collateral
14 antibiotic susceptibility networks in diverse clinical strains of [i]Escherichia
15 coli[/i]. Nat Commun. doi: 10.1038/s41467-018-06143-y
- 16 Ramirez MS, Tolmasky ME (2017) Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects
17 for Inhibition. Molecules. doi: 10.3390/molecules22122267
- 18 Randall CP, Gupta A, Jackson N, et al (2015) Silver resistance in Gram-
19 negative bacteria : a dissection of endogenous and exogenous
20 mechanisms. J Antimicrob Chemother 1–10. doi: 10.1093/jac/dku523
- 21 Riccardi C dos S, Santos ML dos, Guastaldi AC (2015) Engineered
22 Nanomaterials Nanotoxicology Issues, Nanosafety and Regulatory Affairs
- 23 Scandorieiro S, Camargo LC De, Lancheros CAC, et al (2016) Synergistic and
24 additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles
25 against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. Front Microbiol. doi:
26 10.3389/fmicb.2016.00760
- 27 Silver S (2003) Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and
28 misuses of silver compounds. FEMS Microbiol Rev 27:341–353. doi:
29 10.1016/S0168-6445(03)00047-0
- 30 Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA
31 sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial
32 genomes. Nucleic Acids Res 19:6823–6831
- 33 Vishnupriya S, Chaudhari K, Jagannathan R (2013) Single-Cell Investigations of
34 Silver Nanoparticle – Bacteria Interactions. Part Part Syst Charact 1056–
35 1062. doi: 10.1002/ppsc.201300165
- 36 Xu H, Qu F, Xu H, et al (2012) Role of reactive oxygen species in the
37 antibacterial mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. 45–53.
38 doi: 10.1007/s10534-011-9482-x

