



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

DAVID NATTAN DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EM HIDROGEL DE *ZOOGLOEA* SP. FRENTE
A ISOLADOS CLÍNICOS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS
RESISTENTES**

Recife
2025

DAVID NATTAN DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EM HIDROGEL DE *ZOOGLAEA* SP. FRENTE
A ISOLADOS CLÍNICOS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS
RESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário
Ferro Cavalcanti

Coorientador: Prof. Dr. Luís André de
Almeida Campos

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Oliveira, David Nattan de.

Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas de prata incorporadas em hidrogel de *Zoogloea* sp. frente a isolados clínicos de bactérias gram-positivas resistentes / David Nattan de Oliveira. - Recife, 2025.
47 : il., tab.

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavallanti

Coorientador(a): Luís André de Almeida Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Prata. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Hidrogel. 4. Nanoestruturas. 5. Antibióticos. 6. Infecções de pele. I. Cavallanti, Isabella Macário Ferro. (Orientação). II. Campos, Luís André de Almeida. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

DAVID NATTAN DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
INCORPORADAS EM HIDROGEL DE *ZOOGLLOEA* SP. FRENTE
A ISOLADOS CLÍNICOS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS
RESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
UFPE / Centro Acadêmico de Vitória – CAV / Núcleo de enfermagem

Profa. Dra. Gabriela Souto Vieira de Mello
UFPE / Departamento da Medicina Tropical

Prof. Dr. Danilo Ramos Cavalcanti
UPE / ICB

AGRADECIMENTOS

Cada desafio superado e cada conquista ao longo dessa jornada foram possíveis graças ao apoio, carinho e orientação de pessoas extraordinárias que estiveram ao meu lado.

Agradeço imensamente aos meus orientadores, a professora Isabella Macário e o professor Luís André, verdadeiros guias nessa jornada, tanto na vida científica como pessoal. Vocês me ajudaram a enxergar potencial onde eu só via limitações e me mostraram que a ciência é construída com disciplina e calma, obrigado por todos momentos vividos e que vamos viver.

A todos meus professores, que com tanta dedicação e paciência transmitiram mais do que conhecimento, transmitiram valores e amor pela educação.

Muito obrigado aos meus pesquisadores excepcionais do maior grupo de pesquisa do mundo, o MicroNAT, pessoas com quem dividi dias e noites de trabalho, desafios e descobertas. Ao Instituto Keizo Asami (iLIKA-UFPE), onde pude desenvolver minha pesquisa e este trabalho, e a todos os técnicos que me recebiam/recebem de braços abertos para oferecer ajudar. Além disso, agradeço a FACEPE, órgão de fomento da minha bolsa como PIBIC, o qual contribuiu para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Edna e Graciliano, minha fonte de força e inspiração. Vocês me ensinaram o valor do esforço, da resiliência e da honestidade. Foram vocês que me acolheram nos momentos de incerteza e celebraram comigo cada pequena vitória. Cada conselho, sacrifício e demonstração de amor ao longo dessa caminhada foram fundamentais para eu chegar até aqui. Além deles, ao meu irmão Patrick e a minha irmã Anne, companheiros de vida e amigos incondicionais. Vocês estiveram comigo em cada etapa dessa jornada, e sou grato por tê-los ao meu lado, torcendo sempre. O mesmo vale para todos os membros da minha família, meus apoiadores e que celebram cada passo meu, entendendo o quão importantes eles são, meu muito obrigado!

Bianca, Caio e Clara, meu quarteto inseparável, que sempre me deram forças e me viram em meus piores momentos, mas sempre me abraçando e me acolhendo, não sei o que seria de mim sem vocês. Vocês foram a minha rede de apoio nos dias difíceis e a minha alegria nos momentos de celebração. As longas conversas, risadas, estudos em grupo e desabafos tornaram essa caminhada muito

mais leve e significativa.

Agradeço aqueles que estão comigo dentro e fora do laboratório. Primeiro minha mãe científica, minha companheira e confidente, a que está comigo para tudo, Hanne, cada pedaço do pesquisador que me tornei tem uma parte sua, você foi e é muito importante para minha construção como cientista. Também a uma das minhas melhores amigas, minha companheira interiorana, Andrezza, seu afeto e cuidado comigo, além do esforço e dedicação, fizeram com que a trajetória ficasse mais leve e feliz. Ao meu grupinho perfeito, Maria, Pedro e Lara, com quem posso dividir a vida dentro e fora do laboratório, que me aguentaram e me aguentam nesse processo, me ajudando e apoiando, sem vocês a vida seria chata e mais complicada, sou muito sortudo por ter vocês ao meu lado. Agradeço também a João Pedro, meu melhor amigo, meu confidente, a pessoa mais incrível com quem posso dividir a vida, os momentos de tristeza e alegria, ele tornou esse fim de caminhada leve e me tranquilizou sempre que precisei.

E a Deus minha eterna gratidão. Nos momentos em que me senti perdido, ele me deu luz e conforto. Sinto que cada conquista foi por conta de seu cuidado em minha vida. Esta vitória não é apenas minha, é nossa. Obrigado por acreditarem em mim e por caminharem ao meu lado. A todos, meu muito obrigado, a vida é linda e vale a pena ao lado de todos vocês.

Epígrafe

The beyhive is buzzing!

Oliveira, D. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de nanopartículas de prata incorporadas em hidrogel de *Zoogloea* sp. frente a isolados clínicos de bactérias gram-positivas resistentes.** 2024. 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um desafio significativo para a saúde pública, especialmente quando associadas a bactérias multidroga-resistentes (MDR) e produtoras de biofilme. Dentro desse contexto desafiador, duas espécies de bactérias Gram-positivas se destacam como uma ameaça de saúde pública: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Ambas causam infecções de pele, de feridas e de tecidos moles e apresentam cepas MDR e a capacidade de formar biofilme. Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como as nanopartículas de prata (AgNPs) veiculadas em hidrogel de *Zoogloea* sp., emerge como uma alternativa promissora. Nesse sentido, o presente estudo buscou investigar o potencial de ação antibacteriana e antibiofilme de AgNPs isoladas e incorporadas em hidrogel de celulose bacteriana. Para isso, as nanopartículas e o hidrogel foram obtidos e caracterizados por meio de análises físico-químicas e morfológicas. Foram realizados ensaios microbiológicos, que incluíram a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), através da microdiluição em caldo e inoculação em placa por meio da metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), e a curva de morte para compreender o tempo de ação bactericida das nanopartículas isoladas e quando estão incorporadas no hidrogel. Além disso, foi avaliada a capacidade de inibição e erradicação do biofilme por meio da determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) e da concentração de erradicação mínima do biofilme (CEMB) usando a metodologia do cristal violeta. Como resultados, o hidrogel apresentou uma rede microfibrilar tridimensional característica da celulose bacteriana e as AgNPs apresentaram forma de bastonete, oval e triângulo, além de tamanho de partícula de 478 nm, potencial zeta de $32,75 \pm 1,84$ mV e mobilidade $2,56 \pm 0,14$ μ S/V/cm. Os valores de CIM e CBM variaram de 6,25 a 50 μ g/mL para a AgNPs-C250 e AgNPs-C250-gel e entre 12,5 e 50 μ g/mL para o AgNO₃ e AgNO₃-gel para as cepas testadas. De acordo com o ensaio de curva de morte AgNPs-C250 e AgNPs-C250-gel mostraram uma redução da população após 6h de exposição as AgNPs-C250 e após 9h de exposição ao AgNPs-C250-gel. Já os resultados do CIMB variaram entre 0,78 a 50 μ g/mL e do CEMB entre 1,56 a >100 μ g/mL para os produtos testados. Dessa forma, os resultados revelaram uma eficácia superior das AgNPs em relação ao AgNO₃ frente a maioria das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, destacando a maior atividade das nanopartículas. Além disso, a incorporação dessas estruturas no hidrogel de celulose bacteriana demonstrou resultados similares para atividade bacteriana, no entanto apresentou um maior potencial antibiofilme, apresentando-se como formulação promissora para tratamento de infecções causadas por *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Palavras-chave: Prata. Resistência antimicrobiana. Nanoestruturas. Hidrogel. Antibióticos.

Oliveira, D. N. Evaluation of antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles incorporated in *Zoogloea* sp. hydrogel against clinical isolates of resistant gram-positive bacteria. 2024. 46 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Healthcare-Associated Infections (HAIs) represent a significant challenge for public health, especially when associated with multidrug-resistant (MDR) and biofilm-producing bacteria. Within this challenging context, two Gram-positive bacterial species stand out as public health threats: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Both cause skin, wound, and soft tissue infections and exhibit MDR strains with the ability to form biofilms. Therefore, the development of new therapeutic approaches, such as silver nanoparticles (AgNPs) carried in *Zoogloea* sp. hydrogel, emerges as a promising alternative. This study aimed to investigate the antibacterial and antibiofilm potential of isolated AgNPs and those incorporated into bacterial cellulose hydrogel. The nanoparticles and hydrogel were obtained and characterized through physicochemical and morphological analyses. Microbiological assays were conducted, including the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) through broth microdilution and plate inoculation based on the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) methodology, as well as kill curve analysis to understand the bactericidal action time of the isolated nanoparticles and those incorporated in the hydrogel. Additionally, biofilm inhibition and eradication capacity were assessed by determining the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) and the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) using the crystal violet methodology. The results showed that the hydrogel presented a characteristic three-dimensional microfibrillar network of bacterial cellulose, and the AgNPs exhibited rod, oval, and triangular shapes, with a particle size of 478 nm, zeta potential of 32.75 ± 1.84 mV, and mobility of 2.56 ± 0.14 μ S/V/cm. The MIC and MBC values ranged from 6.25 to 50 μ g/mL for AgNPs-C250 and AgNPs-C250-gel and between 12.5 and 50 μ g/mL for AgNO₃ and AgNO₃-gel for the tested strains. According to the kill curve assay, AgNPs-C250 and AgNPs-C250-gel showed a population reduction after 6h of exposure to AgNPs-C250 and after 9h to AgNPs-C250-gel. The MBIC results ranged from 0.78 to 50 μ g/mL, and MBEC values varied from 1.56 to >100 μ g/mL for the tested products. Thus, the results revealed a superior efficacy of AgNPs compared to AgNO₃ against most strains of *S. aureus* and *S. epidermidis*, highlighting the higher activity of nanoparticles. Moreover, the incorporation of these structures into bacterial cellulose hydrogel demonstrated similar antibacterial activity but showed greater antibiofilm potential, presenting itself as a promising formulation for the treatment of infections caused by *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Keywords: Silver. Antimicrobial Resistance. Nanostructures. Hydrogel. Antibiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios da montagem do biofilme	17
Figura 2 – Mecanismos de ação de nanopartículas metálicas	18
Figura 3 – Eletromicrografias de transmissão das nanopartículas de prata	26
Figura 4 – FTIR das nanopartículas de prata	27
Figura 5 – Eletromicrografias de varredura das nanofibras de hidrogel de celulose bacteriana	29
Figura 6 – Ensaio de curva de morte de <i>Staphylococcus aureus</i> após tratamento com as AgNPs-C250 incorporadas no hidrogel.	32
Figura 7 – Ensaio de curva de morte de <i>Staphylococcus epidermidis</i> após tratamento com as AgNPs-C250 incorporadas no hidrogel.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Provas diferenciais dos gêneros Catalase positivos	15
Tabela 2 – Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> de maior importância clínica	15
Tabela 3 – Caracterização do tamanho, potencial zeta e mobilidade das AgNPs	25
Tabela 4 – Atividade antibacteriana do AgNO ₃ , da AgNPs-C250, do AgNO ₃ -gel e da AgNPs-C250-gel frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Tabela 5 – Atividade antibacteriana do AgNO ₃ , da AgNPs-C250, do AgNO ₃ -gel e da AgNPs-C250-gel frente a cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	30
Tabela 6 – Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> .	34
Tabela 7 – Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	34
Tabela 8 – Atividade antibiofilme de AgNO ₃ , AgNPs-C250, AgNO ₃ -gel e AgNPs-C250-gel frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Tabela 9 – Atividade antibiofilme de AgNO ₃ , AgNPs-C250, AgNO ₃ -gel e AgNPs-C250-gel frente a cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
Agr	<i>Accessory gene regulator</i>
AMH	Ágar Mueller-Hinton
CB	Celulose bacteriana
CBM	Concentração bactericida mínima
CEMB	Concentração de erradicação mínima do biofilme
CH	Quitosana
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima do biofilme
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	Caldo Mueller-Hinton
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HAIs	<i>Healthcare-Associated Infections</i>
IRAS	Infecções relacionadas a assistência em saúde
KBr	Brometo de potássio
MBC	<i>Minimum bactericidal concentration</i>
MBEC	<i>Minimum biofilm eradication concentration</i>
MBIC	<i>Minimum biofilm inhibitory concentration</i>
MDR	Multidroga-resistente
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
QS	<i>Quorum sensing</i>
TSB	Caldo triptona de soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1	AS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)	13
1.2	O GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	14
1.2.1	Aspectos gerais	14
1.2.2	Resistencia Bacteriana e Produção de Biofilmes	16
1.3	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	17
1.4	HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	METODOLOGIA	21
3.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPs E DO HIDROGEL CONTENDO AS AGNPs	21
3.2	INCORPORAÇÃO DAS AGNPs NO GEL DE CELULOSE BACTERIANA	21
3.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AGNPs E AGNPs-GEL	22
3.4	AVALIAÇÃO DA CURVA DE MORTE	22
3.5	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS BACTERIANOS	23
3.6	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	23
3.7	AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DO BIOFILME	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPs E DO HIDROGEL	25
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	29
4.3	AVALIAÇÃO DA CURVA DE MORTE	32
4.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOFILME	34
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	35
5	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A	39
	APÊNDICE B	40
	APÊNDICE C	41

1 Introdução

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são infecções adquiridas durante o processo de cuidado em um hospital ou outra unidade prestadora de assistência à saúde e que não estavam presentes ou em incubação na admissão do paciente. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada 100 pacientes hospitalizados, sete em países desenvolvidos e dez em países em desenvolvimento irão adquirir uma infecção associada a ambientes hospitalares onerando os serviços de saúde (Andrade *et al.*, 2021; Alrebish *et al.*, 2023).

As IRAS causam cerca de 40.000 mortes por ano com uma taxa de incidência de infecções que pode chegar a 25% nos países em desenvolvimento e 5 – 15% em países desenvolvidos (Lemiech-Mirowska *et al.*, 2021). Em casos de IRAS, além do aumento do tempo médio de permanência de internação, que, segundo estudos, pode triplicar quando comparado ao tempo normal, e do aumento dos custos diretos no tratamento destes pacientes, também há o aparecimento de maiores taxas de morbidade e mortalidade (Serra-Burriel *et al.*, 2020).

As IRAS configuram-se como um problema crescente, especialmente quando são causadas por bactérias multidroga-resistentes (MDR) e produtoras de biofilme. Segundo a OMS, cerca de 2.000 pessoas no mundo são levadas a óbito diariamente em decorrência de infecções resistentes, podendo chegar até 10 milhões de mortes por ano em 2050 (Lobie *et al.*, 2021). Além da resistência bacteriana, as IRAS estão diretamente relacionadas à presença de biofilme bacteriano que proporcionam colonização com maior estabilidade estrutural e longevidade, promovem uma barreira protetora impermeável frente ao ambiente, a tolerância e/ou resistência aos antibióticos e a persistência das infecções causando impacto negativo nos setores médico, aumento da hospitalização, sofrimento do paciente e redução da qualidade de vida (Alrebish *et al.*, 2023; Daffinee *et al.*, 2023).

Nesse contexto, as IRAS, como infecções de pele, de feridas e de tecidos moles, causadas por bactérias resistentes aos antibióticos e produtoras de biofilme, em especial, por cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, tornam-se desafiadoras para a ciência, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar estas infecções que contribuem para as taxas elevadas morbidade e mortalidade (Haliman *et al.*, 2022; Perez *et al.*, 2023).

S. aureus e *S. epidermidis* são bactérias que compõem a microbiota da pele, além disso elas são grandes responsáveis por infecções em feridas de pele. No entanto, seus mecanismos de resistência e sobrevivência dificultam as estratégias terapêuticas (Schilcher, Horswill, 2020). Os fatores de virulência expressos pelo *S. epidermidis* são poucos quando comparado com o *S. aureus*. Entretanto, ambos têm fatores que podem ter um papel duplo no comensalismo e na infecção, como proteases e lipases. Dessa forma, os altos níveis de genes de resistência a antibióticos e patogenicidade dessas bactérias dificultam o atendimento ao paciente e acarretam consequências negativas a infecção (Severn, Horswill, 2023).

Diante deste fato, torna-se promissor o desenvolvimento de abordagens terapêuticas utilizando nanoestruturas, como as nanopartículas de prata (AgNPs), para o tratamento destas infecções nosocomiais causadas por *S. aureus* e *S. epidermidis* (Ford, Hurford, Cassat, 2021; da Cunha *et al.*, 2023). As AgNPs têm se tornado um frequente alvo de estudo por parte da comunidade científica devido às suas variadas atividades biológicas, especialmente devido às propriedades antimicrobianas, apresentando resultados promissores, até mesmo frente a cepas MDR (Pannerselva *et al.*, 2021). Com isso, as AgNPs demonstram ser viáveis para tratamento de infecções bacterianas por *Staphylococcus* spp., contudo para tratar infecções associadas às feridas torna-se necessário um veículo para incorporação das AgNPs (Da Cunha *et al.*, 2023; Zeng *et al.*, 2023).

Nesse sentido, um hidrogel formado por celulose bacteriana (CB) produzido por *Zoogloea* sp. a partir do melaço da cana-de-açúcar tem sido testado em diferentes áreas médicas configurando-se como abordagem terapêutica promissora devido a presença de açúcares polimerizados estáveis que possibilitam a ausência de toxicidade, biocompatibilidade e eficiência no remodelamento tecidual (Silva *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2023; Correia *et al.*, 2024). Este hidrogel apresenta propriedades adequadas para aplicações biomédicas como alto grau de pureza, biodegradabilidade, elasticidade, flexibilidade, alta porosidade e propriedade de retenção de água (Chen *et al.*, 2022; Correia *et al.*, 2024).

Assim, a utilização de nanopartículas de prata incorporadas em hidrogel constituído de biopolímero de CB apresenta-se como inovador e promissor para tratar infecções bacterianas resistentes com produção de biofilme em feridas causadas por cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Dessa forma, visamos avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme das AgNPs isoladas e incorporadas em hidrogel de

celulose bacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 AS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM SAÚDE (IRAS)

As IRAS são complicações adquiridas durante o atendimento em unidades de saúde, como hospitais, e que não estavam presentes no período de admissão do paciente (Alrebish *et al.*, 2023). Elas contribuem para aproximadamente 40.000 óbitos anuais e aumentam o tempo médio de hospitalização, elevando os custos do tratamento e estão associadas a níveis mais altos de morbidade e mortalidade (Serra-Burriel *et al.*, 2020; Osme *et al.*, 2022).

Além da resistência aos antimicrobianos, as IRAS estão fortemente vinculadas às bactérias formadoras de biofilmes que favorecem a colonização por meio de maior estabilidade estrutural e durabilidade. Esses biofilmes criam uma barreira protetora contra o ambiente externo, aumentam a tolerância aos antibióticos e contribuem para a persistência das infecções. Neste cenário, é comum a colonização e formação de biofilmes por esses microrganismos em cateteres que são dispositivos essenciais na assistência médica. Como resultado, há um impacto negativo significativo no setor de saúde, incluindo maior tempo de hospitalização, sofrimento dos pacientes e redução da qualidade de vida (Alrebish *et al.*, 2023; Daffinee *et al.*, 2023, Lotfinejad *et al.*, 2024).

Nesse cenário, as IRAS provocadas por bactérias MDR e formadoras de biofilme representam um grande desafio, uma vez que mais de 2,8 milhões de infecções por cepas resistentes a antimicrobianos ocorrem a cada ano e mais de 35.000 pacientes morrem como resultado. Além disso, os mecanismos de resistência dificultam o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, contribuindo significativamente para as altas taxas de morbidade e mortalidade associadas (Haliman *et al.*, 2022; Perez *et al.*, 2023; Flynn; Guarner, 2023).

1.2 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

1.2.1 Aspectos Gerais

As bactérias do gênero *Staphylococcus* emergem como uma preocupação para a comunidade científica devido à aquisição de resistência a diversas classes de antibióticos, bem como à capacidade de formar biofilme (John, 2020; Santos *et al.*, 2023). As cepas estafilocócicas são cocos Gram-positivos caracterizadas por serem catalase positiva, se diferenciando a partir do teste de coagulase, podendo ser positivo ou negativo, e também por meio de outros testes como DNase, manitol, PYR e o teste de resistência a novobiocina (Tabela 1) (Chessa *et al.*, 2016; Anvisa, 2020).

Tabela 1 - Provas diferenciais dos gêneros Catalase positivos

Gênero	Motilidade	NaCl 5%	Oxidase	Aeróbio estrito	Tétrade
<i>Staphylococcus</i>	-	+	-	não	variável
<i>Planococcus</i>	+	+	-	+	variável
<i>Micrococcus</i>	-	+	+	+	+
<i>Stomatococcus</i>	-	-	-	não	variável

Fonte: Anvisa, 2020

Dentre essas bactérias, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* são reconhecidamente um dos dois principais agentes causadores de infecções hospitalares relacionadas ao uso de cateteres e dispositivos hospitalares, apresentando grande relevância clínica (Chessa *et al.*, 2016). Assim, na chave de identificação bioquímica eles se diferenciam pela coagulase, na qual a *S. aureus* é positiva e *S. epidermidis* é negativa (Tabela 2). Ademais, a *S. epidermidis* apresenta sensibilidade a novobiocina, se diferenciando das demais bactérias do gênero (Chessa *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Identificação das espécies de *Staphylococcus* de maior importância clínica

Gênero	DNase	PYR	Novobiocina	Ureia	Polimixina
<i>S. aureus</i>	+	-	sensível	variável	resistente
<i>S. epidermidis</i>	-	-	sensível	+	resistente
<i>S. lugdunensis</i>	-	+	sensível	variável	variável
<i>S. haemolyticus</i>	-	+	sensível	-	sensível
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	resistente	+	sensível

<i>S. schleiferi</i>	-	+	sensível	-	sensível
<i>S. intermedius</i>	+	+	sensível	+	sensível
<i>S. hyicus</i>	+	-	sensível	variável	resistente

Fonte: Anvisa, 2020

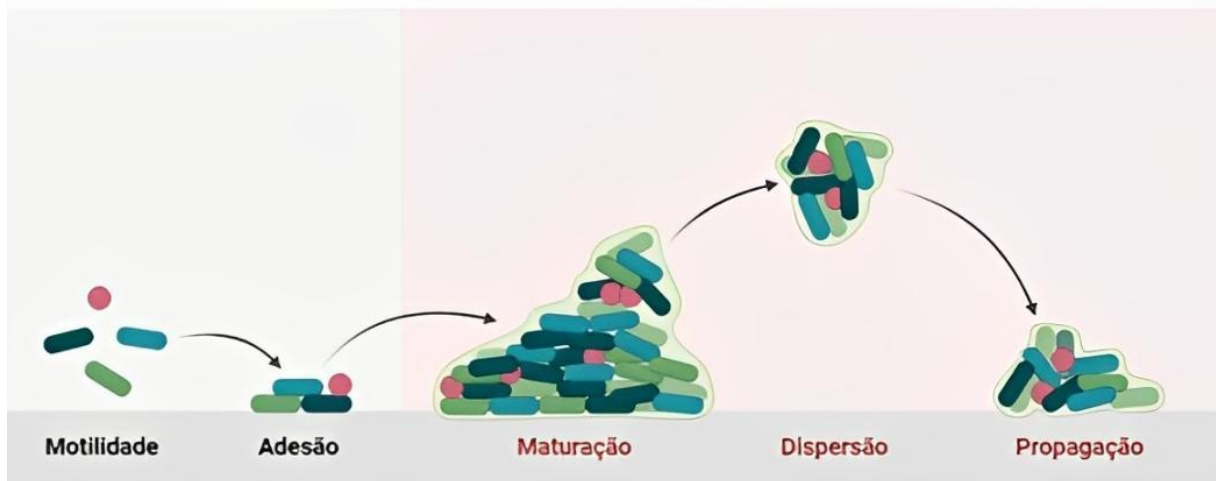
1.2.2 Resistência Bacteriana e Produção de Biofilmes

A resistência aos antibióticos ocorre de formas distintas. Há a resistência intrínseca, decorrente da ausência ou presença de determinadas estruturas nas bactérias, o que torna os antibióticos ineficazes, e existe a resistência adquirida, que pode surgir por meio de mutações em genes cromossômicos ou pela transferência horizontal de genes presentes em cromossomos ou plasmídeos (Huemer *et al.*, 2020).

No âmbito da saúde, nota-se que as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* com perfil de resistência são patógenos nosocomiais frequentes. Nessa perspectiva da resistência bacteriana, pode-se destacar genes como o *Mec A*, presente num cassete genético complexo, o SCCmec, sendo o principal a garantir resistência a antibióticos beta-lactâmicos. Além dos diferentes mecanismos de resistência, como a redução da permeabilidade da membrana celular, sistemas de efluxo e a produção de β -lactamases, uma enzima que catalisa a hidrólise de vários antibióticos β -lactâmicos. Assim, as taxas de resistência da infecção por *Staphylococcus* MDR estão cada vez maiores, consolidando as infecções por este gênero como um grave problema de saúde pública (Guo *et al.*, 2020; John, 2020; Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

Ademais, a capacidade de produção de biofilme também é um desafio para o tratamento dessas infecções, pois este fator de virulência garante a persistência das bactérias nos sítios infecciosos e dificulta o tratamento ao impedir a ação dos antibióticos devido a matriz complexa de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos dos biofilmes (Santos *et al.*, 2023). O processo de formação dos biofilmes é complexo com estágios distintos, iniciando com a fixação primária de células a uma superfície, acúmulo de células em múltiplas camadas e maturação da estrutura do biofilme, descolamento de células do biofilme e sua dispersão (Figura 1).

Figura 1 - Estágios da montagem do biofilme.



Fonte: autoria própria

O biofilme bacteriano pode se estabelecer e perdurar por um longo tempo, mesmo com a carência de alguns nutrientes (Oliveira *et al.*, 2021). Portanto, os biofilmes tornam-se um mecanismo de adaptação que permite a permanência dessas bactérias em estilos de vidas alternativos, como cateteres ou superfícies hospitalares, permitindo um combate a métodos de tratamento ou até mesmo ao sistema imunológico do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2022).

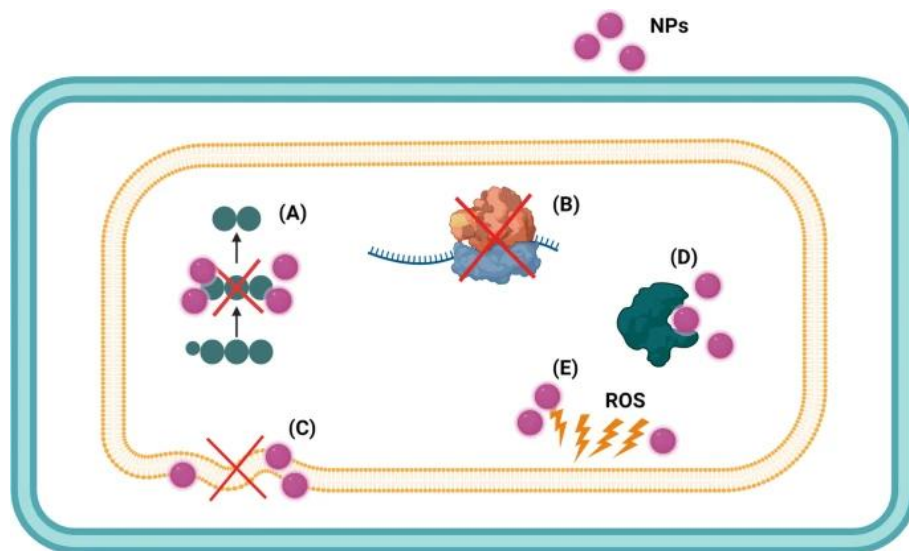
Dentre os patógenos produtores de biofilmes do gênero *Staphylococcus*, as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentam alta relevância clínica, uma vez que são comumente encontrados em cateteres e equipamentos hospitalares de pacientes internados. Além disso, sua capacidade de resistência a medicamentos e de formação do biofilme garantem a esses agentes uma atuação massiva nas IRAS (Oliveira *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2022). Nesse cenário, o tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes e produtoras de biofilme é um desafio, tornando necessárias novas abordagens terapêuticas (Razdan *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2023).

1.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPs)

As nanopartículas metálicas vêm se tornando uma alternativa para combater as bactérias MDR e, dentre as nanoestruturas metálicas, pode-se destacar as AgNPs que se tornaram um alvo crescente de pesquisas na comunidade científica devido às suas múltiplas atividades biológicas, principalmente as antimicrobianas frente a cepas MDR (Pannerselva *et al.*, 2021; Agreles; Cavalcanti; Cavalcanti, 2022).

As AgNPs apresentam diversos mecanismos de ação devido a liberação de íons de prata que inibem a ação de diversas enzimas da glicólise, da pentose fosfato e da cadeia transportadora de elétrons, além de agirem no sistema de defesa do estresse oxidativo (Heine *et al.*, 2024). Verifica-se também que as AgNPs podem alterar a membrana celular das bactérias, destruir os ácidos nucleicos e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além de atuar na regulação da expressão gênica dos biofilmes, na promoção do estresse oxidativo e no desequilíbrio eletrolítico (Mazur *et al.*, 2020).

Figura 2 - Mecanismos de ação de nanopartículas metálicas.



(A) Alteração na atividade de vias metabólicas; (B) expressão gênica; (C) indução de alterações de membrana; (D) inibição de enzimas e proteínas; (E) formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Fonte: Agreles; Cavalcanti; Cavalcanti, 2022

Diante desse contexto, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas com o uso de nanoestruturas, como as nanopartículas de prata, surge como uma estratégia promissora para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *S. aureus* e *S. epidermidis* (Ford, Hurford, Cassat, 2021; da Cunha *et al.*, 2023). Com isso, as AgNPs demonstram ser viáveis para tratamento de infecções bacterianas por *Staphylococcus* spp., contudo para tratar infecções superficiais, como de feridas infectadas, torna-se necessário um veículo para incorporação das AgNPs, como hidrogéis (Wang *et al.*, 2023).

1.4 HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA

Os hidrogéis são redes poliméricas reticuladas com poros entre as cadeias poliméricas apresentando uma conformação tridimensional específica que permite a adesão de compostos devido aos grupos hidroxila que compõem sua superfície (Fasiku *et al.*, 2021; Correia *et al.*, 2024). Nesse sentido, ele apresenta uma estrutura amplamente utilizada como materiais biomiméticos e sistemas de liberação de medicamentos (Wang *et al.*, 2023). Estudos mostram que os hidrogéis podem atuar liberando o agente incorporado, bem como pode impedir as interações entre as bactérias e a superfície por meio de uma modificação de superfície de modo a limitar a formação de biofilmes (Chen *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Nesse cenário, destaca-se um hidrogel formado por celulose bacteriana (CB), produzido por *Zoogloea* sp. a partir do melaço de cana-de-açúcar, que tem sido amplamente testado em diferentes áreas médicas, configurando-se como uma abordagem terapêutica promissora. Sua eficácia deve-se à presença de açúcares polimerizados estáveis, que garantem ausência de toxicidade e biocompatibilidade (Zeng *et al.*, 2023; Correia *et al.*, 2024). Esse hidrogel apresenta propriedades ideais para aplicações biomédicas, como elevado grau de pureza, biodegradabilidade, elasticidade, flexibilidade, alta porosidade e capacidade de retenção de água (Gupta *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a incorporação de nanopartículas de prata em hidrogéis de biopolímero de CB surge como uma abordagem inovadora e promissora para o tratamento de infecções bacterianas resistentes associadas à formação de biofilmes, especialmente causadas por cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. *Staphylococcus* sp.

Dessa forma, adcionar o objetib do trabalho

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme das AgNPs isoladas e incorporadas em hidrogel de celulose bacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* MDR.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química das nanopartículas de prata através do tamanho de partícula, potencial zeta, mobilidade, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e análises morfológicas por microscopia eletrônica de transmissão;
- Realizar análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de celulose bacteriana;
- Incorporar as nanopartículas de prata (AgNPs) em hidrogel de celulose bacteriana;
- Avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de prata e do hidrogel de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata em isolados clínicos resistentes de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- Avaliar a curva de morte bacteriana das nanopartículas de prata e do hidrogel de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata em isolados clínicos resistentes de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- Determinar a produção de biofilme pelos isolados clínicos resistentes de *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- Avaliar a atividade antibiofilme de nanopartículas de prata e do hidrogel de celulose bacteriana contendo nanopartículas de prata em isolados clínicos resistentes de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

3 METODOLOGIA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPs E DO HIDROGEL CONTENDO AS AGNPs

As AgNPs foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e carga superficial através de mobilidade eletroforética utilizando metodologias estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa (Campos *et al.*, 2024). Para análise morfológica das nanopartículas, as formulações foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1:10 v/v, foram depositadas em stubs e mantidas em dessecador à temperatura ambiente por 24 horas. Após a secagem, houve a metalização utilizando metalizador (FINE COAT, ION SPUTTER JFC-1100), e em seguida, observadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET) FEI Tecnai20 G2 de 200 kV (Rivero-buceta *et al.*, 2020).

Para análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, os espectros de FTIR das amostras foram obtidas a partir da mistura das amostras liofilizadas em pó de brometo de potássio (KBr) e medida espectrofotômetro de transformação de Fourier. As amostras foram escaneadas de 4000 a 400 cm^{-1} , obtendo-se os espectros com resolução de 4 cm^{-1} (Rivero-buceta *et al.*, 2020)

A Microscopia eletrônica de varredura por canhão de emissão de campo (FEG-SEM) foi usada para determinar as características morfológicas do hidrogel em um MIRA3 (TESCAN, Brno, República Tcheca) com uma aceleração de 15 kV e uma distância de trabalho de 10 mm com ampliação de 100 kx. Para essas análises, as amostras foram fixadas em tubos de alumínio e revestidas com uma fina camada de ouro antes de serem submetidas ao FEG-SEM (Correia *et al.*, 2024).

3.2 INCORPORAÇÃO DAS AGNPs NO GEL DE CELULOSE BACTERIANA

O biopolímero de celulose bacteriana, é um exopolissacarídeos, extraído a partir do melaço da cana de açúcar (Zeng *et al.*, 2023). Ele foi produzido na estação experimental de cana-de-açúcar de Carpina, pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O gel de biopolímero celulósico foi fornecido pela POLISA Biopolímeros para a Saúde Ltda.

As nanopartículas de prata foram preparadas através da metodologia descrita por Freire *et al.*, (2015) pelo grupo Compostos Híbridos e Coloides liderado pelo Prof.

Dr. André Galembeck e cedidas para realização deste estudo.

Após a síntese das nanopartículas, 1mL da solução coloidal das AgNPs foi incorporado a 1mL de gel de celulose bacteriana.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS AGNPS E AGNPS-GEL

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2024). Inicialmente, o caldo Mueller-Hinton (CMH) foi adicionado em placas de microdiluição. Em seguida, os produtos a serem avaliados, o nitrato de prata (AgNO_3), as AgNPs-C250 e o hidrogel contendo as AgNPs (AgNPs-C250-gel) e hidrogel contendo o AgNO_3 (AgNO₃-gel) foram adicionadas através de diluição seriada. Foram utilizadas cepas MDRs de hemoculturas. As suspensões bacterianas foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de McFarland, e em seguida, depositadas nos poços. Posteriormente, as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h e após a incubação foi realizada a leitura por espectrofotometria no comprimento de onda de 620 nm. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir mais de 90% do crescimento microbiano. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota da amostra dos poços em que não houve crescimento foi inoculada em ágar Mueller-Hinton (AMH) e as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Após este período, a CBM foi determinada como a menor concentração que não há crescimento microbiano (CLSI, 2024).

3.4 AVALIAÇÃO DA CURVA DE MORTE

A curva de morte das bactérias após o tratamento com AgNPs e AgNPs no hidrogel foi realizada utilizando um procedimento descrito por Correia *et al.*, 2024. As curvas *time-kill* foram determinadas utilizando a concentração referente ao CIM das nanopartículas de prata. Cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram semeadas em AMH e incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, os inóculos bacterianos foram ajustados na concentração de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. As amostras foram incubadas a 37°C por 24h e alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 0, 3, 6, 9, 12 e

24h e semeadas em AMH, pela técnica de *pour-plate*, após diluições seriadas em solução salina estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. O resultado foi expresso em log₁₀ das Unidades Formadoras de Colônias por mL (log₁₀ UFC/mL). A atividade bactericida foi determinada quando houve uma diminuição $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL correspondente à inibição de 99,9% do crescimento e o efeito bacteriostático foi avaliado a partir de uma diminuição $\leq 2 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com a curva de crescimento controle (Correia *et al.*, 2024).

3.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados clínicos bacterianos produtores de biofilme foram identificados através do método do cristal violeta segundo Correia *et al.* (2024). Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição e posteriormente foram adicionadas as suspensões bacterianas que foram incubadas a 35 °C por 48h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e realizadas lavagens com tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. Em seguida a análise do resultado foi realizada através do espectrofotômetro a 570 nm. As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de ODs dos biofilmes bacterianos, em comparação com valor da Densidade óptica do controle (OD_c): não aderente se $OD \leq OD_c$; fraca produção se $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$; produção moderada se $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$; ou forte produção se $4 \times OD_c < OD$ (Correia *et al.*, 2024).

3.6 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

A determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB) foi realizada segundo Correia *et al.* (2024). Inicialmente foi distribuído TSB + glicose em cada poço das placas de microdiluição com todas as cepas que apresentaram produção de biofilme moderada a forte. Em seguida, AgNO₃, AgNPs-C250, AgNPs-C250-gel e AgNO₃-gel foram adicionados através de diluição seriada e posteriormente as suspensões bacterianas. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após a incubação, foi realizado o método do cristal violeta para quantificação, previamente

descrito no item anterior. A CIMB foi determinada como a menor concentração capaz de inibir a formação do biofilme (Correia *et al.*, 2024).

3.7 AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DO BIOFILME

A determinação da Concentração de Erradicação Mínima do Biofilme (CEMB) foi realizada segundo Correia *et al.* (2024). Inicialmente, os inóculos bacterianos foram ajustados na densidade de 0,5 da escala de McFarland em TSB + glicose e distribuídos nas placas de microdiluição com todas as cepas que apresentaram produção de biofilme moderada a forte. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h para permitir a formação do biofilme. Após incubação o meio de cultura foi retirado e reposto um novo meio. Em seguida, AgNO_3 , AgNPs-C250, AgNPs-C250-gel e AgNO_3 -gel foram distribuídos nas microplacas por meio de diluição seriado e as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Após a incubação, foi realizado o método do cristal violeta para quantificação, previamente descrito no item anterior. A CEMB foi determinada como a menor concentração capaz de erradicar o biofilme formado (Correia *et al.*, 2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AGNPs E DO HIDROGEL

As AgNPs foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, potencial zeta e mobilidade (tabela 3).

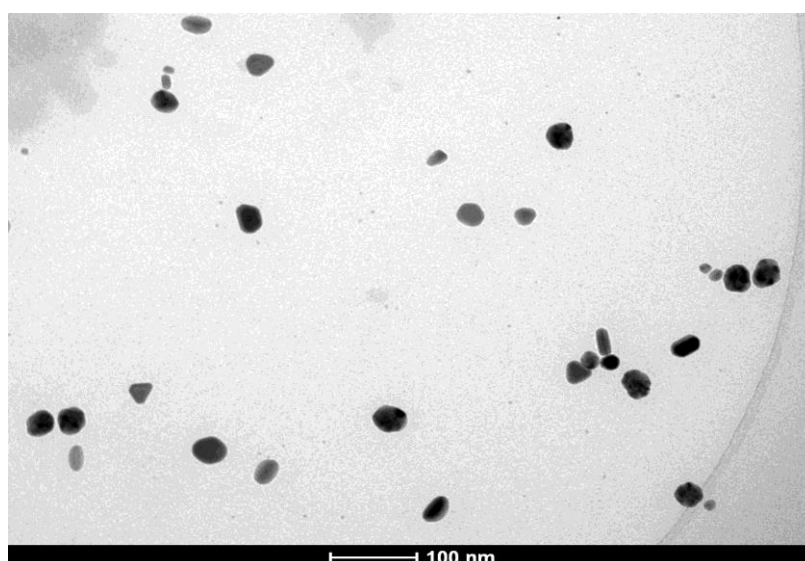
Tabela 3 – caracterização do tamanho, potencial zeta e mobilidade das AgNPs

Amostra	Ø (nm)	Potencial zeta (mV)	Mobilidade ($\mu\text{S}/\text{V}/\text{cm}$)
C250	478	+ 32,75 $\pm$ 1,84	2,56 $\pm$ 0,14

As AgNPs apresentaram um tamanho aproximado de 450 nm, potencial zeta variando entre +32 e +36 mV e mobilidade de 2,56 $\mu\text{S}/\text{V}/\text{cm}$. Essas características são favoráveis para garantir a eficácia das atividades antimicrobiana e antibiofilme, além de permitir que sua ação tópica seja mantida sem penetração na corrente sanguínea (Báez *et al.*, 2021).

As AgNPs foram analisadas por MET sendo possível observar três formatos predominantes: bastonete, oval e triângulo (figura 3).

Figura 3 - Eletromicrografias de transmissão das nanopartículas de prata.



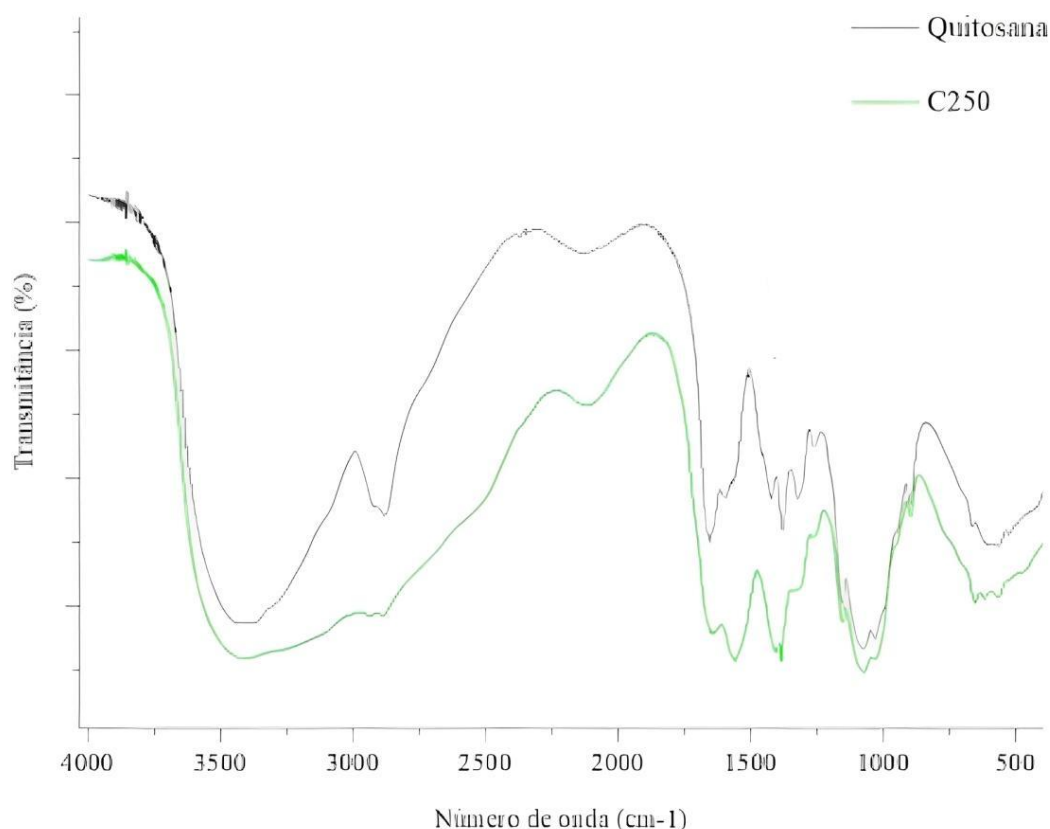
No geral, o tamanho, a forma e a carga superficial são fatores cruciais que influenciam os efeitos biológicos das nanopartículas. Quanto ao tamanho, partículas

menores possuem uma área de contato superficial ampliada, liberando maior quantidade de íons Ag^+ , sendo necessária análise da via de aplicação para evitar efeitos citotóxicos (Elbehiry *et al.*, 2019).

Além disso, um efeito que depende diretamente do tamanho e forma é a interação física com a superfície de diversas bactérias, que danificam as membranas e provocam alterações estruturais que levam à morte celular. Assim, geometrias isotrópicas, como partículas esféricas, demonstram alta eficácia devido à elevada relação superfície-volume, proporcionando maior reatividade (dos Santos *et al.*, 2021). Por fim, a carga positiva gera uma atração para componentes eletronegativos das membranas bacterianas, mesmo nesse estudo as AgNPs serem carregadas positivamente, demonstrado pelo potencial zeta, a quitosana (CH) possui aminas policatiônicas que também podem interagir com componentes carregados negativamente na superfície das células, levando à ruptura da membrana celular que associada a liberação dos íons de prata inibem o metabolismo celular e apresentam boa atividade antibacteriana (Hermosilla *et al.*, 2023).

Na análise por FTIR (figura 4), os espectros da quitosana (CH) e AgNPs-C250, na faixa de ~ 3400 a 3200 cm^{-1} apresenta o estiramento O-H e N-H, na qual para a CH a banda larga intensa ocorre devido às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila (O-H) e amina (N-H) e para a AgNPs apresenta redução da intensidade dessa banda, indicando a interação do grupo amino com a superfície das nanopartículas de prata. Essa diminuição é consistente com a formação de ligações coordenadas ou hidrogênio enfraquecido. A região $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ demonstra a amida I na qual a CH possui um pico moderado e para a AgNPs-C250 há uma redução ou possível deslocamento do pico, sugerindo a interação do grupo amina com a prata.

Figura 4 - FTIR das nanopartículas de prata.



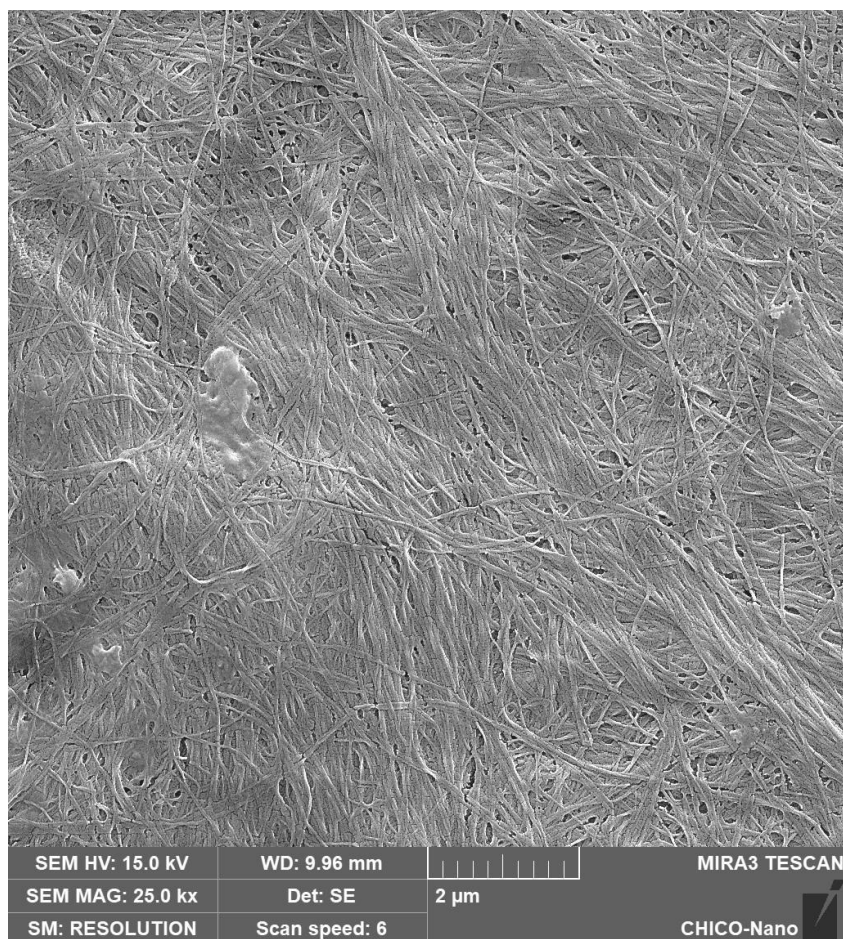
A Região $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ demonstra a amida II com deformação N-H, onde a CH possui um pico significativo esperado devido à deformação e a AgNPs tem uma redução da intensidade ou deslocamento associado à interação com a superfície da nanopartícula. Na Faixa $\sim 1400\text{-}1370 \text{ cm}^{-1}$ há uma deformação da C-H com a diminuição da intensidade desse pico que é um indicativo de interação entre a quitosana e a superfície da prata. A região $\sim 1080\text{-}1030 \text{ cm}^{-1}$ demonstra o estiramento C-O-C e C-O e a CH apresenta um pico acentuado devido à presença de ligações glicosídicas no polímero e no espectro das AgNPs observa-se a redução ou mudança na banda, a qual sugere interações eletrostáticas com as nanopartículas. Por fim, na região abaixo de 800 cm^{-1} , no espectro das AgNPs, há a presença de novos picos nessa faixa que são indicativos típicos da presença de nanopartículas metálicas (Ediyilyam *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

Além disso, o gráfico de FTIR (Figura 4) demonstra a presença de grupos aminas semelhantes ao da quitosana, que revestem as AgNPs reduzindo sua toxicidade e aumentando a biocompatibilidade, apresentando uma linha controle da própria quitosana e picos semelhantes a ela nas linhas das AgNPs (Mostafa *et al.*, 2022). Os espectros de FTIR da CH e AgNPs-C250 mostra claras interações entre a

quitosana e as nanopartículas de prata, evidenciadas pela redução na intensidade dos picos de O-H e N-H ($\sim 3400\text{ cm}^{-1}$), as mudanças nas bandas de $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$, indicando coordenação com a prata e os novos picos em regiões baixas (abaixo de 800 cm^{-1}) associados à presença metálica (Zhang *et al.*, 2023). Tais resultados demonstram que as AgNPS foram revestidas pela quitosana.

Os hidrogéis sem as formulações foram preparados e a caracterização morfológica foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin (Hitachi Ltd., Japan). As micrografias dos hidrogéis obtidas por MEV estão apresentadas na Figura 5. Pode-se observar na superfície dos géis a rede microfibrilar tridimensional característica da celulose bacteriana.

Figura 5 - Eletromicrografias de varredura das nanofibras de hidrogel de celulose bacteriana.



4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

AgNO_3 , AgNPs-C250, AgNO_3 -gel e AgNPs-C250-gel, com a concentração do gel de 0,25%, apresentaram CIM entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus*. AgNO_3 ,

AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel também apresentaram atividade bactericida com CBM que variaram de 25 a 50 µg/mL frente a cepas de *S. aureus* (tabela 4).

Tabela 4 - Atividade antibacteriana do AgNO₃, da AgNPs-C250, do AgNO₃-gel e da AgNPs-C250-gel frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Bactérias	AgNO ₃		AgNO ₃ -gel		AgNPs-C250		AgNPs-C250-gel	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL							
MRSA ATCC 33591	25	50	25	50	50	50	50	50
C047	25	50	25	50	25	50	25	50
C074	25	50	25	50	25	50	25	50
C128	25	50	25	50	25	50	25	50
C137	25	50	25	50	50	50	50	50

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; ATCC: American Type Culture Collection; C047, C074, C128 e C137: isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina; AgNO₃: nitrato de prata; AgNPs-C250: nanopartículas de prata; AgNPs-C250-gel: hidrogel contendo as AgNPs; AgNO₃-gel: hidrogel contendo o AgNO₃.

AgNO₃, AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel, com a concentração do gel de 0,25%, apresentaram CIM de 6,25 a 50 µg/mL frente a *S. epidermidis*. AgNO₃, AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel também apresentaram atividade bactericida com CBM que variaram de 25 a 50 µg/mL frente a cepas de *S. epidermidis* (tabela 5).

Tabela 5 - Atividade antibacteriana do AgNO₃, da AgNPs-C250, do AgNO₃-gel e da AgNPs-C250-gel frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

Bactérias	AgNO ₃		AgNO ₃ -gel		AgNPs-C250		AgNPs-C250-gel	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL							
ATCC 12228	25	50	25	50	25	50	25	50
C233	12,5	25	12,5	25	12,5	25	12,5	25
C266	12,5	25	12,5	25	6,25	25	6,25	25
C271	25	50	25	50	50	50	50	50
C281	12,5	25	12,5	25	12,5	25	12,5	25

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ATCC: American Type Culture Collection; C233, C266, C271, C281: isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina; AgNO₃: nitrato de prata; AgNPs-C250: nanopartículas de prata; AgNPs-C250-gel: hidrogel contendo as AgNPs; AgNO₃-gel: hidrogel contendo o AgNO₃.

A maioria das cepas presente nesse estudo mostraram sensibilidade à prata livre, assim como para as nanopartículas de prata isoladas e incorporadas no gel (tabela 4 e 5). Esses resultados corroboram o estudo de Chandrasekharan e colaboradores (2022), que determinaram o potencial antimicrobiano do AgNO₃ e das nanopartículas de prata frente às cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os pesquisadores observaram que os valores de CIM e CBM foram similares, com ação mais efetiva da AgNPs (10 a 90 µg/mL). Heine e colaboradores (2024) também determinaram CIM de AgNPs por meio de ensaios de difusão em ágar para cepas de *S. aureus* resistentes em torno de 25 µg/mL. Já Bhatia e pesquisadores (2021) encontraram a CIM tanto para a AgNPs como para o AgNO₃ frente a cepas de *S. aureus* e *E. coli* em torno de 19 µg/mL. Tais resultados, corroboram os valores de CIM do presente estudo, levando em consideração as variações nas características físico-químicas, como tamanho, forma e presença de frações superficiais, que afetam significativamente a atividade antibacteriana da nanopartícula. Assim, os resultados obtidos neste trabalho confirmam o potencial antibacteriano das AgNPs frente a bactérias Gram-positivas resistentes, especialmente, espécies do gênero *Staphylococcus*.

Neste estudo, observou-se que o hidrogel de celulose bacteriana sem as nanopartículas de prata não apresentou atividade antibacteriana. Estes achados foram notados em outros estudos, como o de Gupta e colaboradores (2016) ao investigarem a ação antibacteriana de íons de prata incorporados ao hidrogel de celulose bacteriana, em formulações de nanopartículas de prata incorporadas no hidrogel (CB-AgZ) e nitrato de prata incorporado no hidrogel (CB-AgNO₃). Os resultados indicaram que o hidrogel puro não apresentou atividade antimicrobiana, enquanto CB-AgZ e CB-AgNO₃ demonstraram eficácia contra as cepas de *S. aureus*. De forma complementar, Ao e colaboradores (2020) desenvolveram hidrogéis de CB, enriquecendo-os com cloreto de quitosana hidroxipropil trimetil amônio (HACC/CB). Nesse estudo, observou-se que o hidrogel de CB puro, novamente, não apresentou atividade antibacteriana frente a diversos microrganismos, como *S. aureus*. No

entanto, ao incorporar HACC à matriz de CB, houve uma atividade antimicrobiana significativa.

Tais estudos demonstram consistentemente que o hidrogel de celulose bacteriana isolado não possui propriedades antibióticas, no entanto, ele se destaca como uma matriz eficiente para a incorporação de moléculas com potencial antibacteriano. Nessa perspectiva, o hidrogel de CB apresenta-se como veículo promissor para entrega de nanoestruturas, valendo ressaltar que Pinto e colaboradores (2016) e Silva e colaboradores (2021) desenvolveram um estudo comprovando, por meio de diversos testes de toxicidade, a segurança do hidrogel desenvolvido pela *Zoogloea* sp. Assim, a incorporação de AgNPs neste hidrogel demonstra-se promissor para tratar infecções superficiais causadas por *S. aureus* e *S. epidermidis*.

4.3 AVALIAÇÃO DA CURVA DE MORTE

As curvas de morte para as cepas clínicas de *S. aureus* (C047) e *S. epidermidis* (C271) apresentaram padrões semelhantes de tempo de morte (Figura 6 e 7). Ambas as cepas apresentaram inibição do crescimento em comparação ao grupo controle. Para ambas, com a exposição às AgNPs-C250 houve uma redução após 6h de exposição e quando tratadas com AgNPs-C250+Gel apresentaram redução a partir de 9h. Após essas horas, o número de células bacterianas apresentou diminuição nas UFC conforme o passar do tempo, mantendo valores semelhantes para as AgNPs e AgNPs+Gel.

Figura 6 - Ensaio de curva de morte de *Staphylococcus aureus* após tratamento com as AgNPs-C250 incorporadas no hidrogel.

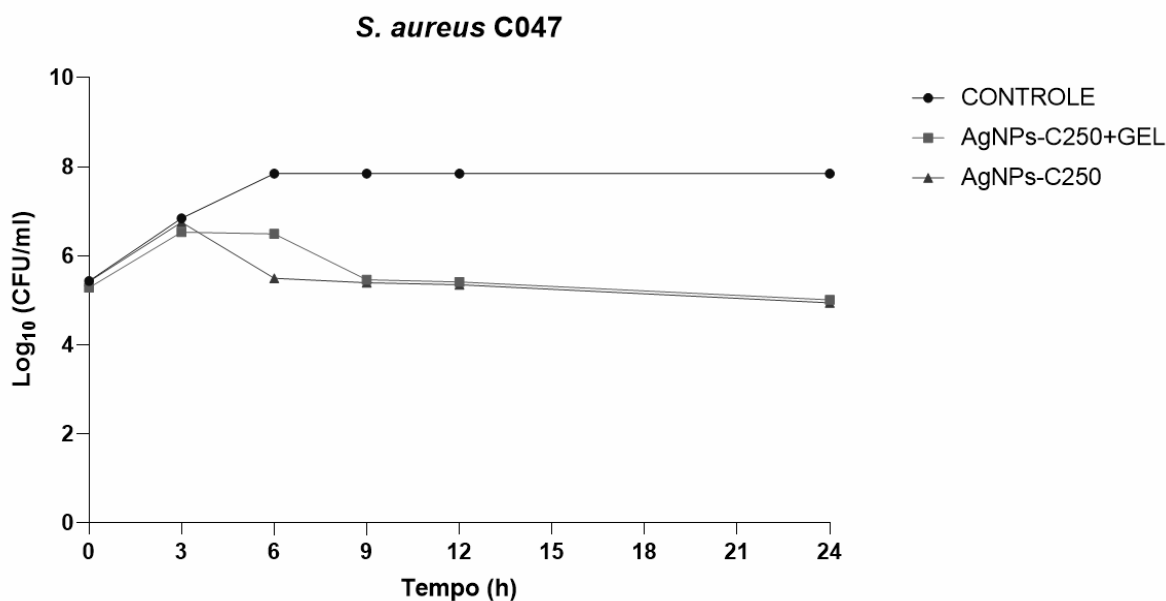
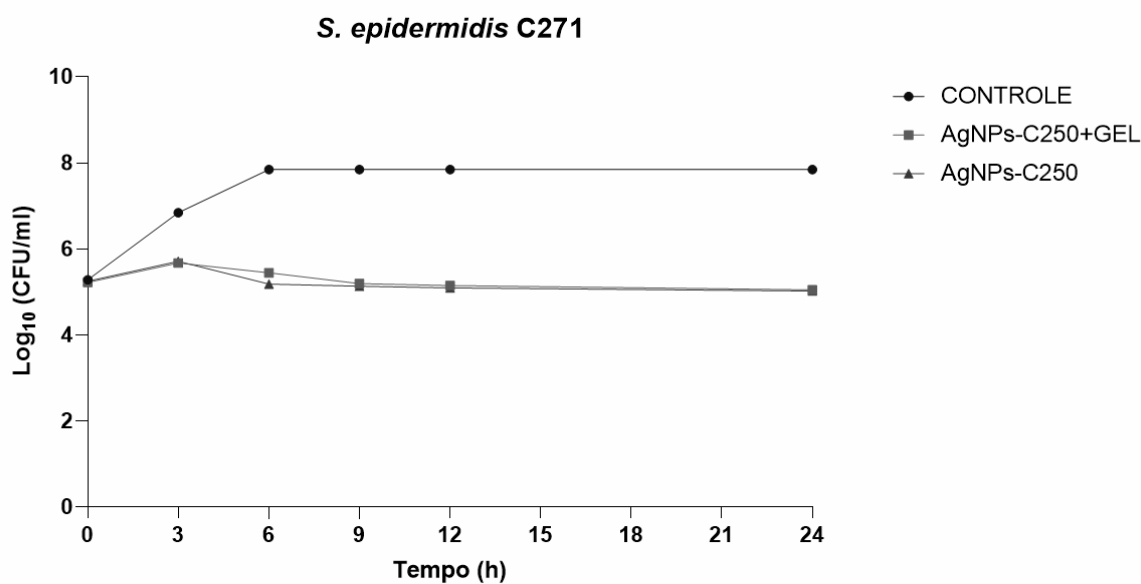


Figura 7 - Ensaio de curva de morte de *Staphylococcus epidermidis* após tratamento com as AgNPs-C250 incorporadas no hidrogel.



A atividade antibacteriana contra isolados clínicos de *S. aureus* e *S. epidermidis* também foi avaliada utilizando a curva de morte, além de ser possível avaliar o tempo de atividade das nanopartículas quando incorporadas no hidrogel. Avaliar a atividade antibacteriana por esse método é crucial para aumentar as probabilidades de uma terapia mais efetiva devido ao conhecimento da eficácia temporal do agente antimicrobiano em diferentes concentrações. Além disso, serve como base para estudos *in vivo*, pois o mesmo permite uma compreensão aprofundada do processo

de surgimento de resistência bacteriana dentro de uma população, fornecendo dados cruciais para o desenvolvimento de estratégias antimicrobianas mais eficazes (Rybak *et al.*, 2020; Rodriguez-Gascon *et al.*, 2021). Dessa forma, foi possível observar que a atividade de AgNPs-C250+Gel e AgNPs-C250 é semelhante e eficaz com o passar do tempo, observando que o hidrogel não interfere na ação das nanopartículas, nem exibe atividade antimicrobiana, mas controla a liberação e o efeito das AgNPs. Scandorieiro e colaboradores (2023) observaram a curva de morte de cepas de *S. aureus*. expostas a formulações de hidrogel contendo bioAgNPs e a sulfadiazina de prata (SS). Assim, notaram que as bactérias expostas ao hidrogel sem AgNPs apresentaram crescimento bacteriano e a atividade das AgNPs começou a partir das 2h, diferente da SS que erradicou as bactérias em menos de 2h. Dessa forma, foi possível notar a atividade antibacteriana utilizando a curva de morte, além de ser possível compreender a cinética bactericida das nanopartículas quando incorporadas no hidrogel.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOFILME

Como fator de virulência capaz de intensificar a resistência bactérias, espécies de *Staphylococcus* sp. apresentam elevada capacidade de produção de biofilmes, tornando-se uma preocupação no campo da saúde pública uma vez que eles podem estar presentes em cateteres de pacientes internados em hospitais, contribuindo para um mau prognóstico (Joshi, Singh, Mijakovic, 2020). Os biofilmes representam um mecanismo de adaptação para a sobrevivência de bactérias em ambientes adversos, permitindo que elas se estabeleçam em superfícies diversas, como cateteres e equipamentos hospitalares (Oliveira *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2022).

Na avaliação da produção de biofilme foi evidenciado que todas as cepas *S. aureus* e de *S. epidermidis* apresentaram forte ou moderada produção de biofilme (tabela 6 e 7).

Tabela 6 - Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Produção do biofilme
MRSA ATCC 33591	Forte
C047	Forte

MRSA								
ATCC 33591	25	3,125	6,25	>50	6,25	>100	1,56	50
C047	25	>100	25	1,56	25	>100	12,5	50
C074	25	25	25	>50	25	50	6,25	12,5
C128	25	25	12,5	50	25	25	12,5	12,5
C137	25	6,25	25	25	25	25	12,5	1,56

CIMB: Concentração Inibitória Mínima do Biofilme; CEMB: Concentração De Erradicação Mínima do Biofilme; MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; ATCC: American Type Culture Collection; C047, C074, C128 e C137: isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; AgNO₃: nitrato de prata; AgNPs-C250: nanopartículas de prata; AgNPs-C250-gel: hidrogel contendo as AgNPs; AgNO₃-gel: hidrogel contendo o AgNO₃.

AgNO₃, AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel apresentaram CIMB de 0,78 a 50 µg/mL frente às cepas de *S. epidermidis*. AgNO₃, AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel também apresentaram a CEMB que variaram de 25 a 50 µg/mL frente às cepas *S. epidermidis* (tabela 9).

Tabela 9 - Atividade antibiofilme de AgNO₃, AgNPs-C250, AgNO₃-gel e AgNPs-C250-gel frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

S. <i>epidermidis</i>	AgNO ₃		AgNO ₃ -gel		AgNPs-C250		AgNPs-C250-gel	
	CIMB	CEMB	CIMB	CEMB	CIMB	CEMB	CIMB	CEMB
	µg/mL							
ATCC 12228	12,5	50	3,125	25	25	50	6,25	25
C233	12,5	25	3,125	6,25	12,5	25	3,125	25
C266	12,5	25	6,25	25	6,25	25	3,125	50
C271	25	50	25	25	50	50	3,125	12,5
C281	25	25	1,56	6,25	12,5	25	6,25	25

CIMB: Concentração Inibitória Mínima do Biofilme; CEMB: Concentração De Erradicação Mínima do Biofilme; ATCC: American Type Culture Collection; C233, C266, C271, C281: isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina; AgNO₃: nitrato de prata; AgNPs-C250: nanopartículas de prata; AgNPs-C250-gel: hidrogel contendo as AgNPs; AgNO₃-gel: hidrogel contendo o AgNO₃.

Esse potencial antibiofilme das AgNPs já foi demonstrado em outros estudos, assim como nesta pesquisa. Nesse sentido, Swolana e colaboradores (2022) evidenciaram a ação de inibição e erradicação do biofilme estafilocócico em baixas

concentrações de AgNPs, como visualizada no presente estudo. Ademais dos Santos e colaboradores (2021) evidenciaram atividade antibiofilme das nanopartículas de prata (AgNP_1) e obtiveram concentrações de inibição em torno de 12,5 µg/mL frente a bactérias Gram-positivas.

O perfil promissor da atividade antibiofilme das AgNPs pode se justificar pela maior capacidade de penetração intracelular, podendo alterar vias enzimáticas e de transdução alterando diversos compostos bacterianos, e também pela capacidade de penetrar pelo poros e canais de água dos biofilmes que variam entre 50 e 500nm de diâmetro, além da carga positiva de superfície que interage eletrostaticamente com a superfície de carga negativa dos biofilmes (da Cunha *et al.*, 2023).

Assim como nos estudos de Correia e colaboradores (2024) o hidrogel não apresentou uma ação antimicrobiana, mas possui potencial antibiofilme, podendo ter sua ação potencializada quando carrega um fármaco ou uma nanoestrutura. O potencial antibiofilme destes hidrogéis possibilita o impedimento das interações bactérias-superfície que ocorre por meio de ligações específicas, pois o hidrogel causa uma modificação de superfície e impede a formação de biofilmes, além de também serem bons carreadores de medicamentos e nanosistemas, controlando a liberação e atividade dos fármacos (Chen *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Além disso, foi observada uma redução nas CIMB e CEMB das AgNPs e do AgNO₃ ao serem incorporados no hidrogel, evidenciando a potencialização na ação antibiofilme deste produto. Haidari e colaboradores (2021) demonstraram o potencial antibiofilme do hidrogel com AgNPs a partir de um ensaio de morte celular a partir de Micrografias 3D na qual o tratamento com o hidrogel-AgNPs resultou em uma diferença marcante em que a grande maioria das células de *S. aureus* foi morta, levando à ruptura grave dos biofilmes maduros. Além disso, Correia e colaboradores (2024) demonstraram resultados igualmente promissores ao utilizar a vancomicina incorporada no hidrogel e obtiveram redução dos valores de CIMB e CEMB frente a cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

5 CONCLUSÃO

As nanopartículas de prata (AgNPs) apresentaram potencial antibacteriano, e após a incorporação no hidrogel esta atividade foi mantida para as cepas testadas. A caracterização das nanopartículas apresentou resultados satisfatórios para um efeito antibacteriano eficaz. Os estudos de curva de morte demonstraram que as bactérias são eliminadas após o tratamento com as AgNPs-C250 em 6h e AgNPs-C250-gel no tempo 9 horas. Já na atividade antibiofilme, nota-se que as AgNPs incorporadas no hidrogel de celulose bacteriana apresentaram maior potencial de inibição da formação e erradicação de biofilmes. Por fim, torna-se evidente que as AgNPs-C250 e AgNPs-C250-gel são uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de infecções bacterianas resistentes causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

APÊNDICE A

ARTIGO: Nanostructures for Delivery of Flavonoids with Antibacterial Potential against *Klebsiella pneumoniae*

Revista: Antibiotics

Qualis: A3

Fator de Impacto: 4,6 (2023)

Link para acesso: <https://www.mdpi.com/2079-6382/13/9/844>



antibiotics



Review

Nanostructures for Delivery of Flavonoids with Antibacterial Potential against *Klebsiella pneumoniae*

Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo ^{1,2}, Lara Limeira de Oliveira ^{1,2}, David Nattan de Oliveira ¹, Karitas Farias Alves Lima ², Isabella Macário Ferro Cavalcanti ^{1,2,*} and Luís André de Almeida Campos ^{1,3}

¹ Ketozo Assaí Institute (ILKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife 50670-901, PE, Brazil; hanne.queiroz@ufpe.br (H.L.R.Q.M.); lara.limeira@ufpe.br (L.L.d.O.); david.dna@ufpe.br (D.N.d.O.); karitafarias@gmail.com (K.F.A.L.); laisandrea@ufpe.br (L.A.d.A.C.)

² Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão 50670-901, PE, Brazil

* Correspondence: isabella.cavalcanti@ufpe.br; Tel.: +55-81-985395821

Abstract: Flavonoids are secondary metabolites that exhibit remarkable biological activities, including antimicrobial properties against *Klebsiella pneumoniae*, a pathogen responsible for several serious nosocomial infections. However, oral administration of these compounds faces considerable challenges, such as low bioavailability and chemical instability. Thus, the encapsulation of flavonoids in nanosystems emerges as a promising strategy to mitigate these limitations, offering protection against degradation; greater solubility; and, in some cases, controlled and targeted release. Different types of nanocarriers, such as polymeric nanoparticles, liposomes, and polymeric micelles, among others, have shown potential to increase the antimicrobial efficacy of flavonoids by reducing the therapeutic dose required and minimizing side effects. In addition, advances in nanotechnology enable co-encapsulation with other therapeutic agents and the development of systems responsive to more specific stimuli, optimizing treatment. In this context, the present article provides an updated review of the literature on flavonoids and the main nanocarriers used for delivering flavonoids with antibacterial properties against *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: natural products; nanotechnology; Gram-negative bacteria



Citation: Macêdo, H.L.R.Q.; de Oliveira, L.L.; de Oliveira, D.N.; Lima, K.F.A.; Cavalcanti, I.M.F.; Campos, L.A.d.A. Nanostructures for Delivery of Flavonoids with Antibacterial Potential against *Klebsiella pneumoniae*. *Antibiotics* **2024**, *13*, 844. <https://doi.org/10.3390/antib13090844>

Academic Editor: Marc Maurice

Received: 6 August 2024

Revised: 31 August 2024

Accepted: 4 September 2024

Published: 5 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium belonging to the order Enterobacterales, commonly found in the human intestinal microbiota and frequently isolated from various environments, including aquatic bodies, food sources, and sewage systems [1–3]. *K. pneumoniae* can exist as symbionts, conditional pathogens, or outright pathogens, implicated in a range of infections such as urinary tract infections, liver abscesses, bacteremia, and pneumonia [4–8]. Notably, it is recognized as a nosocomial opportunist, particularly affecting debilitated and immunocompromised patients. Its rapid dissemination within hospital settings underscores its significance as a hospital-acquired pathogen, contributing to considerable morbidity and mortality among hospitalized individuals [9,10].

In addition to these infections, *Klebsiella pneumoniae* is known for its capacity to develop resistance to antimicrobials, particularly exacerbated by the excessive and inappropriate use of antibiotics. The rising rates of bacterial resistance in *K. pneumoniae* present a global concern, as therapeutic regimens become less effective and the negative prognosis of patients increases significantly [3,11]. One of the primary antibiotic classes used to treat resistant strains of *K. pneumoniae* is carbapenems, given that a substantial proportion of resistant strains harbor a chromosomal β -lactamase gene, rendering penicillins such as ampicillin and amoxicillin ineffective [3,12]. However, there is currently a significant increase in the prevalence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) isolates, and infections caused by these strains are a global public health concern [13].

APÊNDICE B

Artigo: Synthesis of polymeric nanoparticles by double emulsion and pH-driven: encapsulation of antibiotics and natural products for combating *Escherichia coli* infections

Revista: Applied Microbiology and Biotechnology

Qualis: A2

Fator de Impacto: 4,9 (2023)

Link para acesso: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-024-13114-5>

Applied Microbiology and Biotechnology (2024) 108:351
<https://doi.org/10.1007/s00253-024-13114-5>

MINI-REVIEW



Synthesis of polymeric nanoparticles by double emulsion and pH-driven: encapsulation of antibiotics and natural products for combating *Escherichia coli* infections

Luis André de Almeida Campos¹ · Jaqueline Barbosa de Souza¹ · Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo¹ · Joyce Cordeiro Borges¹ · David Nattan de Oliveira¹ · Isabella Macário Ferro Cavalcanti^{1,2}

Received: 28 December 2023 / Revised: 13 March 2024 / Accepted: 19 March 2024
 © The Author(s) 2024

Abstract

The design, development, and obtaining of nanostructured materials, such as polymeric nanoparticles, have garnered interest due to loading therapeutic agents and its broad applicability. Polymeric nanoparticle synthesis employs advanced techniques such as the double emulsion approach and the pH-driven method, allowing the efficient incorporation of active compounds into these matrices. These loading methods ensure compound stability within the polymeric structure and enable control of the release of therapeutic agents. The ability of loaded polymeric nanoparticles to transport and release therapeutic agents on target manner represents a significant advancement in the quest for effective therapeutic solutions. Amid escalating concerns regarding antimicrobial resistance, interventions using polymeric nanostructures stand out for the possibility of carrying antimicrobial agents and enhancing antibacterial action against antibiotic-resistant bacteria, making a new therapeutic approach or complement to conventional treatments. In this sense, the capability of these polymeric nanoparticles to act against *Escherichia coli* underscores their relevance in controlling bacterial infections. This mini-review provides a comprehensive synthesis of promising techniques for loading therapeutic agents into polymeric nanoparticles highlighting methodologies and their implications, addressing prospects of combating bacterial infections caused by *E. coli*.

Key points

- The double emulsion method provides control over size and release of bioactives.
- The pH-driven method improves the solubility, stability, and release of active.
- The methods increase the antibacterial action of those encapsulated in PNPs.

Keywords Antimicrobial efficacy · *Escherichia coli* · Nanostructures · Polymer matrices · Therapeutic delivery

Introduction

Drug carrier systems present advantages such as reduced toxicity of drug, increased therapeutic efficacy, improved physical and chemical stability of bioactives, and promoted the controlled release of drugs; among the drug transport

systems, the main ones are micelles, liposomes, solid lipid nanoparticles, and polymeric nanoparticles (PNPs) (Zielińska et al. 2020; Bhardwaj and Jangde 2023). The encapsulation of natural products and other molecules with biological properties, including conventional antibiotics in PNP, is promising and advantageous strategy. The PNPs are nanocarriers applied orally, nasally, intravenously, intradermally, and intramuscularly, and can be obtained by various techniques that include polymeric precipitation, formation of emulsions, and pH change (Dai et al. 2019; Nwabuike et al. 2022).

Furthermore, in obtaining PNPs, a diversity of synthetic, protein, and saccharide polymers can be used and encapsulate proteins, RNA, DNA, oils, extracts, and a diversity of isolated molecules, protecting therapeutic agents from

✉ Isabella Macário Ferro Cavalcanti
isabella.cavalcanti@ufpe.br

¹ Keizo Asami Institute (iLIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, Recife, PE 123550670-901, Brazil

² Laboratory of Microbiology and Immunology, Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

APÊNDICE C

Capítulo de livro: Potencial antibacteriano e antibiofilme de tobramicina e ácido úsnico frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*

Livro: Pesquisas em Temas de Ciências Biológica

Editora: RFB Editora

Link de acesso: <https://www.rfbeditora.com/capitulo-2024/ff3bfb14-d0c7-44fa-a76d-962ceb3a8a70>

CAPÍTULO 10

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME
DE TOBRAMICINA E ÁCIDO ÚSNICO FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* E
*Acinetobacter baumannii***

*ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM POTENTIAL OF
TOBRAMYCIN AND USNIC ACID AGAINST CLINICAL
ISOLATES OF *Pseudomonas aeruginosa* AND *Acinetobacter
baumannii**

Rhaldney Kaio Silva Galvão¹

Maria Anndressa Alves Agreles²

David Nattan de Oliveira³

Luís André de Almeida Campos⁴

Isabella Macário Ferro Cavalcanti⁵

DOI: 10.46898/rfb.ff3bfb14-d0c7-44fa-a76d-962ceb3a8a70

REFERÊNCIAS

- ADIL, M. *et al.* Efficient green silver nanoparticles-antibiotic combinations against antibiotic-resistant bacteria. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 115, 17 out. 2023.
- AGRELES, M. A. A.; Cavalcanti, I. D. L.; Cavalcanti, I. M. F. Synergism between metallic nanoparticles and antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 11, p. 3973–3984, jun. 2022.
- ALREBISH, Saleh A. *et al.* Epidemiology of Healthcare-Associated Infections and Adherence to the HAI Prevention Strategies. In: **Healthcare**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. p. 63.
- ANDRADE, H. G. G. *et al.* Patient safety and health care related infections: a review of the literature. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 4357–4365, 2021.
- AO, H. *et al.* Engineering quaternized chitosan in the 3D bacterial cellulose structure for antibacterial wound dressings. **Polymer Testing**, v. 86, p. 106490, jun. 2020.
- BHATIA, D.; Mittal, A.; Malik, D. K. Antimicrobial potential and *in vitro* cytotoxicity study of polyvinyl pyrrolidone-stabilised silver nanoparticles synthesised from *Lysinibacillus boronitolerans*. **IET Nanobiotechnology**, v. 15, n. 4, p. 427–440, jun. 2021.
- CAMPOS, L. A. A. *et al.* Anti-staphylococcal, antibiofilm and trypanocidal activities of CrataBL encapsulated into liposomes: Lectin with potential against infectious diseases. **Microbial Pathogenesis**, v. 196, p. 107007, 1 nov. 2024.
- CHANDRASEKHARAN, S.; CHINNASAMY, G.; BHATNAGAR, S. Sustainable phyto-fabrication of silver nanoparticles using *Gmelina arborea* exhibit antimicrobial and biofilm inhibition activity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 156, 7 jan. 2022.
- CHEN, C. *et al.* Stasis leg ulcers: Venous system revises by triggered angiography non-contrast enhanced sequence magnetic resonance imaging. **Diagnostics**, v. 10, n. 9, p. 707, 2020.
- CHEN, X. *et al.* Antibacterial coatings on orthopedic implants. **Materials Today Bio**, v. 19, p. 100586, abr. 2023.
- CHESSA, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146668, 26 jan. 2016.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34rd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

CORREIA, A. A. V. *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Potential of Bacterial Cellulose Hydrogel Containing Vancomycin against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Biology**, v. 13, n. 5, p. 354, 17 maio 2024.

DA CUNHA, K. F. *et al.* Silver nanoparticles (AgNPs) in the control of *Staphylococcus spp.* **Letters in Applied Microbiology**, v. 76, n. 1, p. ovac032, 2023.

DAFFINEE, K. E. *et al.* Staphylococcal Biofilm: Penetration and bioavailability of vancomycin with or without rifampin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 115947, 2023.

DOS SANTOS, E. M. P. *et al.* Silver nanoparticles–chitosan composites activity against resistant bacteria: tolerance and biofilm inhibition. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 23, n. 8, p. 196, ago. 2021.

EDIYILYAM, S. *et al.* Synthesis, Characterization and Physicochemical Properties of Biogenic Silver Nanoparticle-Encapsulated Chitosan Bionanocomposites. **Polymers**, v. 14, n. 3, p. 463, 24 jan. 2022.

ELBEHIRY, A. *et al.* Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus* -induced mastitis and the potential toxicity in rats. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 4, p. e00698, abr. 2019.

FASIKU, V. O. *et al.* Chitosan-Based Hydrogel for the Dual Delivery of Antimicrobial Agents Against Bacterial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm-Infected Wounds. **ACS Omega**, v. 6, n. 34, p. 21994–22010, 31 ago. 2021.

FLYNN, C. E.; Guarner, J. Emerging Antimicrobial Resistance. **Modern Pathology**, v. 36, n. 9, p. 100249, set. 2023.

FORD, C. A.; HURFORD, I. M.; CASSAT, J. E. Antivirulence strategies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a mini review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 632706, 2021.

FREIRE, P. L. L. *et al.* Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 2, p. 183-187, 2015.

GUO, H. *et al.* Biofilm and Small Colony Variants—An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1241, 22 jan. 2022.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 107, 17 mar. 2020.

GUPTA, A., LOW, W. L., RADECKA, I., BRITLAND, S. T., MOHD AMIN, M. C. I., & MARTIN, C. (2016). Characterization and in vitro antimicrobial activity of silver-loaded biosynthetic bacterial cellulose hydrogels. *Journal of Microencapsulation*, 33 (8), 725–734.

HAIDARI, H. *et al.* Eradication of Mature Bacterial Biofilms with Concurrent Improvement in Chronic Wound Healing Using Silver Nanoparticle Hydrogel Treatment. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1182, 8 set. 2021.

HALIMAN, C *et al.* Multidrug Resistance and Extensively Drug-Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus haemolyticus*. **Microbiology Indonesia**, v. 16, n. 2, p. 15- 23, 2022.

HEINE, N. *et al.* Anti-biofilm properties of laser-synthesized, ultrapure silver–gold-alloy nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 3405, 10 fev. 2024.

HERMOSILLA, E. *et al.* Synthesis of Antimicrobial Chitosan-Silver Nanoparticles Mediated by Reusable Chitosan Fungal Beads. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2318, 24 jan. 2023.

HUEMER, M. *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, p. e51034, 3 dez. 2020.

JOHN JR, J. The treatment of resistant staphylococcal infections. **F1000Research**, v. 9, p. 150, 26 fev. 2020.

JOSHI, A. S.; SINGH, P.; MIJAKOVIC, I. Interactions of Gold and Silver Nanoparticles with Bacterial Biofilms: Molecular Interactions behind Inhibition and Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7658, 16 out. 2020.

LEMIECH-MIROWSKA, E. *et al.* Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 28, n. 3, p. 361–366, 16 set. 2021.

LOBIE, T. A. *et al.* Antimicrobial resistance: A challenge awaiting the post-COVID-19 era. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 111, p. 322–325, out. 2021.

LOTFINEJAD, N. *et al.* Systematic scoping review of automated systems for the surveillance of healthcare-associated bloodstream infections related to intravascular catheters. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 13, n. 1, p. 25, 28 fev. 2024.

MAZUR, P. *et al.* Synergistic ROS-Associated Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles and Gentamicin Against *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 3551–3562, maio 2020.

MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 22 jul. 2022.

MOSTAFA, E. M. *et al.* Chitosan Silver and Gold Nanoparticle Formation Using Endophytic Fungi as Powerful Antimicrobial and Anti-Biofilm Potentialities. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 668, 16 maio 2022.

OLIVEIRA, F. *et al.* Fighting *Staphylococcus epidermidis* Biofilm-Associated Infections: Can Iron Be the Key to Success? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 798563, 30 nov. 2021.

PANNERSELVAM, B. *et al.* In vitro cytotoxicity and antibacterial activity of optimized silver nanoparticles against wound infectious bacteria and their morphological studies. **Journal of Cluster Science**, v. 32, p. 63-76, 2021.

PEREZ, A. D. *et al.* Attachment and optimization of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to a 3D printed lattice. **Journal of Microbiological Methods**, v. 204, p. 106644, 2023.

PETERS, A. *et al.* Impact of environmental hygiene interventions on healthcare-associated infections and patient colonization: a systematic review. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 11, n. 1, p. 38, dez. 2022.

PINTO, F. C. M. *et al.* Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic

effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses.

Carbohydrate Polymers, v. 137, p. 556–560, fev. 2016.

RAZDAN, K. *et al.* Pharmaceutical strategies for the treatment of bacterial biofilms in chronic wounds. **Drug Discovery Today**, 2022.

RIVERO-BUCETA, V. *et al.* Anti-staphylococcal hydrogels based on bacterial cellulose and the antimicrobial biopolyester poly(3-hydroxy-acetylthioalkanoate-co-3-hydroxyalkanoate). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1869–1879, nov. 2020.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; SOLINÍS, M. Á.; ISLA, A. The Role of PK/PD Analysis in the Development and Evaluation of Antimicrobials. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 833, 3 jun. 2021.

RYBAK, M. J. *et al.* Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 77, n. 11, p. 835–864, 19 maio 2020.

SANTOS, P. R. *et al.* Resistance profile and biofilm production of *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus sp.*, and *Streptococcus spp.* from dairy farms in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1217–1229, jun. 2023.

SCANDORIEIRO, S. *et al.* Hydrogel-Containing Biogenic Silver Nanoparticles: Antibacterial Action, Evaluation of Wound Healing, and Bioaccumulation in Wistar Rats. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1815, 15 jul. 2023.

SERRA-BURRIEL, M. *et al.* Impact of multi-drug resistant bacteria on economic and clinical outcomes of healthcare-associated infections in adults: Systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 15, n. 1, p. e0227139, 2020.

SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 97-111, 2023.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. e00026-19, 19 ago. 2020.

SILVA, L. G. *et al.* Bacterial cellulose an effective material in the treatment of chronic venous ulcers of the lower limbs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 7, p. 79, jul. 2021.

SWOLANA, D. *et al.* Antibiofilm Effect of Silver Nanoparticles in Changing the Biofilm-Related Gene Expression of *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9257, 17 ago. 2022.

WANG, M. *et al.* Recent Progress in antibacterial hydrogel coatings for targeting biofilm to prevent orthopedic implant-associated infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1343202, 22 dez. 2023.

ZENG, A. *et al.* Functional bacterial cellulose nanofibrils with silver nanoparticles and its antibacterial application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 235, p. 123739, 2023.

ZHANG, Z. *et al.* 2-Pyridinecarboxaldehyde-Modified Chitosan–Silver Complexes: Optimized Preparation, Characterization, and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 28, n. 19, p. 6777, 23 set. 2023.