



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
BIOMEDICINA

JEFERSON RICARDO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
CURCUMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS COM QUITOSANA FRENTE A *ESCHERICHIA COLI***

JEFERSON RICARDO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
CURCUMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS COM QUITOSANA FRENTE A *ESCHERICHIA COLI***

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^a. Dra. Isabella
Macário Ferro Cavalcanti.

Coorientadora: Msc. Jaqueline Barbosa
de Souza.

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

Silva, Jeferson Ricardo Da.

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE CURCUMINA
ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA
FRENTE A ESCHERICHIA COLI / Jeferson Ricardo Da Silva. - Recife, 2024.**

37

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador(a): Jaqueline Barbosa Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Nanotecnologia. 2. Cancer colorretal. 3. Escherichia coli pKs-positiva. 4. Colibactina. I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro . (Orientação). II. Souza, Jaqueline Barbosa . (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

JEFERSON RICARDO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
CURCUMINA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS COM QUITOSANA FRENTE A *ESCHERICHIA COLI***

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

Orientador: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Coorientador: Prof. Msc. Jaqueline Barbosa Souza
Faculdade da Escada (FAESC)

Msc. Alessandra Silva Araújo
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Daniel Charles dos Santos Macêdo.
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho ao meu filho, Pedro Ricardo do Nascimento Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Isabella Macário, que abriu as portas do laboratório em um dos momentos mais difíceis da minha vida e acreditou no meu potencial e permitiu aprender através das vivências e orientações recebida, lições que levarei para toda a vida.

A Msc. Jaqueline Barbosa, os meus mais sinceros agradecimentos por toda paciência e por sempre acreditar, quando muitas vezes pensei em desistir. Nunca esquecerei toda ajuda e ensinamentos durante essa trajetória acadêmica.

Agradeço principalmente ao meu filho, que foi minha força motriz, a minha base, meu principal alicerce durante esta jornada acadêmica, onde eu descobrir o que significa amor de verdade. A Adrilaine agradeço por toda paciência e compreensão, e por todo cuidado que teve com nosso filho, onde Pedro não poderia escolher uma Mãe melhor do que você.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Iniciação Científica concedida entre os anos de 2022-2023.

Aos professores que durante todos esses anos de graduação tive oportunidade de aprender com seus ensinamentos, em especial a professoras Dra. Késia Xisto e Dra. Rejane Neves que despertaram o desejo do estudo da microbiologia dentro de mim.

Agradeço a todos que fazem parte do grupo de pesquisa MicroNat, onde posso afirmar que tenho aprendido cada dia mais com cada um de vocês. Agradeço a Alessandra, Mylena, Maria Agreles, Ana Alice, Davi, David, Pedro, Andreza, Larinha, Zion, Luis Eduardo, Kaio e ao nosso Pós Doc. Luis André.

Aos meus irmãos e amigos mais próximos meus sinceros agradecimentos pois cada um de vocês fizeram da minha caminhada acadêmica mais leve.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento”

Platão.

SILVA, Jeferson Ricardo **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de curcumina encapsulada em lipossomas revestidos com quitosana frente a *Escherichia coli***. 2024. p. 37. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) ainda representa uma preocupação global em saúde, demandando pesquisa contínua sobre sua origem e potenciais fatores de risco. Estudos recentes destacaram o possível papel da *Escherichia coli* pKs-positiva e colibactina no desenvolvimento do CCR. Assim, a comunidade científica busca alternativas, especialmente em produtos naturais, dotados de espectro de ação contra esse microrganismo, sendo a curcumina uma das mais estudadas com esse propósito, em virtude dos seus metabólitos secundários os quais possuem propriedades antibacteriana e antitumoral. Contudo, desafios de biodisponibilidade são associados à curcumina, especialmente em virtude da sua baixa solubilidade em água, o que dificulta sua aplicação na terapêutica dessa doença. Nesse contexto, os lipossomas emergem como nanocarreadores promissores para superar tal limitação, e, a possibilidade de revestí-los com quitosana pode possibilitar sua administração por via oral. Portanto, o presente estudo teve por objetivo formular, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana de lipossomas contendo curcumina (Cur) e revestidos com quitosana (Lipo-Cur-Qui) contra cepas de *E. coli*. Os lipossomas foram preparados por hidratação do filme lipídico, seguida por sonicação, e posteriormente revestidos com quitosana. Foram realizadas análises de tamanho de partícula (\varnothing), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ), pH e eficiência de encapsulação (%EE). Além disso, ensaios foram conduzidos para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos lipossomas frente a diferentes cepas de *E. coli* (ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407). Os resultados mostraram que os Lipo-Cur-Qui apresentaram características adequadas, com \varnothing de $142,0 \pm 2,2$ nm, PDI de 0,386, ζ de $+15,0 \pm 0,6$, pH de 5,1 e %EE de $97,2 \pm 0,6\%$. A CIM e CBM do lipossoma frente a *E. coli* ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407 foram iguais, registrando 62,5 µg/mL, enquanto a curcumina livre variou de 125 a 1000 µg/mL. Esses resultados evidenciam que os lipossomas desenvolvidos são promissores para futuras aplicações na terapia antibacteriana, especialmente para administração oral, oferecendo um tamanho de partícula abaixo de 205 nm, carga positiva e alta eficiência de encapsulação da CUR. Além disso, este revelou-se eficaz no combate às cepas de *E. coli* testadas, com CIM e CBM superiores à curcumina livre. A administração oral desses lipossomas, facilitada pelo revestimento com quitosana, pode ser uma opção viável para aprimorar a terapia antibacteriana, evitando procedimentos invasivos e permitindo a liberação controlada do fármaco no trato gastrointestinal. A alta eficiência de encapsulação pode contribuir para reduzir efeitos adversos associados a terapias convencionais, minimizando a toxicidade sistêmica. Entretanto, estudos adicionais em modelos *in vivo* são necessários para validar a eficácia e segurança antes da potencial aplicação clínica.

Palavras-chave: Nanocarreadores. *Escherichia coli* pKs-positiva. Colibactina. Terapia antibacteriana.

SILVA, Jeferson Ricardo **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme de curcumina encapsulada em lipossomas revestidos com quitosana frente a *Escherichia coli***. 2024. p. 37. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) remains a global health concern, necessitating ongoing research into its origins and potential risk factors. Recent studies have highlighted the potential role of *Escherichia coli* pks-positive and colibactin in CRC development. Consequently, the scientific community is exploring alternatives, particularly in natural products with a spectrum of action against this microorganism, and curcumin stands out as one of the most studied for this purpose due to its secondary metabolites possessing antibacterial and antitumor properties. However, challenges related to curcumin's bioavailability, particularly its low water solubility, hinder its therapeutic application for this disease. In this context, liposomes emerge as promising nanocarriers to overcome such limitations, and the possibility of coating them with chitosan may enable oral administration. Therefore, this study aimed to formulate, characterize, and evaluate the antibacterial activity of liposomes containing curcumin (Cur) and coated with chitosan (Lipo-Cur-Qui) against *E. coli* strains. Liposomes were prepared by lipid film hydration, followed by sonication, and subsequently coated with chitosan. Particle size (\varnothing), polydispersity index (PDI), zeta potential (ζ), pH, and encapsulation efficiency (%EE) were analyzed. Additionally, assays were conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of liposomes against different *E. coli* strains (ATCC 25922, NCTC 13846, and H10407). Results demonstrated that Lipo-Cur-Qui exhibited suitable characteristics, with \varnothing of 142.0 ± 2.2 nm, PDI of 0.386, ζ of $+15.0 \pm 0.6$, pH of 5.1, and %EE of $97.2 \pm 0.6\%$. The MIC and MBC of the liposome against *E. coli* ATCC 25922, NCTC 13846, and H10407 were consistent at 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while free curcumin ranged from 125 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These findings indicate that the developed liposomes hold promise for future applications in antibacterial therapy, especially for oral administration, offering a particle size below 205 nm, positive charge, and high CUR encapsulation efficiency. Moreover, it proved effective against tested *E. coli* strains, with MIC and MBC exceeding those of free curcumin. Oral administration of these liposomes, facilitated by chitosan coating, may be a viable option to enhance antibacterial therapy, avoiding invasive procedures and enabling controlled drug release in the gastrointestinal tract. The high encapsulation efficiency may contribute to reducing adverse effects associated with conventional therapies, minimizing systemic toxicity. However, further studies in *in vivo* models are necessary to validate efficacy and safety before potential clinical application.

Keywords: Nanocarriers. *Escherichia coli* pKs-positive. Colibactin. Antibacterial therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Relação do Cancer Colorretal frente a microbiota intestinal	12
2.1.1 Câncer Colorretal.....	12
2.1.2 Microbiota Intestinal.....	13
2.2 <i>Escherichia coli</i>	14
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> Pks+.....	15
2.3 Curcumina.....	16
2.3.1 Mecanismo de ação da curcumina.....	17
2.4 Nanotecnologia farmacêutica.....	18
2.4.1 Lipossoma.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Preparação dos lipossomas revestidos com quitosana contendo curcumina.....	22
4.2 Caracterização dos lipossomas.....	22
4.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de Lipo-CUR-QUI.....	22
4.4 Avaliação da atividade antibiofilme de Lipo-CUR-Qui.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Caracterização físico-química.....	24
5.2 Atividade Antibacteriana.....	25
5.3 Atividade Antibiofilme.....	27
6. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

Considerando a relevância global do câncer colorretal (CCR), que emerge como uma das principais neoplasias malignas em todo o mundo, é necessário que sejam exploradas novas abordagens de caráter inovador para seu tratamento. De acordo com os dados mais recentes, publicados em 2018 pela a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, foram realizados cerca de 1,8 milhões de novos diagnósticos de CCR em todo mundo, sendo este classificado como o terceiro tipo mais prevalente. No Brasil, o contexto não é diferente, pois, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a previsão é de que no triênio 2023-2025 serão diagnosticados cerca de 46 mil casos novos de câncer colorretal, correspondendo a cerca de 10% do total de tumores diagnosticados no Brasil (Stewart *et al.*, 2020; Weiderpass *et al.*, 2020; Wild *et al.*, 2020; Inca, 2024).

Além do impacto considerável para a saúde pública, o tratamento do CCR é oneroso. Nesse sentido, o Ministério da Saúde do Brasil indica que os gastos variam significativamente de acordo com o estadiamento da doença, chegando a valores que oscilam entre R\$ 4.033,24 no estágio I, e podendo atingir até R\$ 78.970,21 nos estágios II e III, quando são necessárias a incorporação de abordagens como quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (OO, 2016). Assim, além do ônus financeiro para os sistemas de saúde, a condição impacta negativamente a qualidade de vida dos pacientes, isso porque à medida que a doença progride, as terapias adotadas frequentemente acarretam efeitos colaterais significativos (Uyl-de groot *et al.*, 2018; Mcgeechan *et al.*, 2021).

Apesar dessa neoplasia ter característica multifatorial, envolvendo desde fatores genéticos até ambientais, estudos recentes têm ressaltada a associação entre a bactéria *Escherichia coli* – um dos microrganismos da microbiota intestinal, e o desenvolvimento do CCR, evidenciado por estudos que identificaram a sua presença em biópsias de pacientes previamente diagnosticados, os quais apresentaram taxas de até 64%, enquanto que esses valores chegam apenas a 20% em indivíduos saudáveis (Kosaril *et al.*, 2020; Julie *et al.*, 2021).

A relação do potencial carcinogênico dessa bactéria está devido ao desenvolvimento de um fator de virulência, a produção da genotoxina colibactina, a qual induz danos ao epitélio e, posteriormente, proliferação celular, fatores estes que podem contribuir tanto para iniciação, quanto para a progressão do CCR (Mirzaei *et al.*, 2020). Diante desses achados, a comunidade científica tem direcionado esforços para desenvolver terapias

alternativas que visem à erradicação desse microrganismo, buscando abordagens não convencionais, podendo esta ser obtidas através do uso de produtos naturais, como a curcumina (Antoniou *et al.*, 2021).

A curcumina (CUR), um composto encontrado no rizoma da *Curcuma longa*, apresenta propriedades bioativas relevantes, que, além das já conhecidas como as anti-inflamatórias e antioxidantes, estudos tem indicado o potencial antibacteriano, especialmente frente à *E. coli*, uma das bactérias amplamente estudadas dada a sua prevalência e variedade de cepas patogênicas associadas a diferentes condições clínicas (Islam *et al.*, 2024).

Nesse contexto, estudos indicam que a CUR pode desenvolver sua atividade inibitória frente esse microrganismo através da interferência na integridade da membrana celular bacteriana, além de inibir a expressão de genes responsáveis pela virulência bacteriana, ademais, esta também inibe a formação do biofilme bacteriano – uma das formas de resistências da *E. coli* para promover aderência e multiplicação, que contribui para a resistência aos antibióticos e promove persistência da infecção (Shin *et al.*, 2023).

No entanto, esta possui atividade limitada devido à suas características físico-químicas, como baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e estabilidade E, considerando as limitações do emprego da CUR em sua forma livre, a encapsulação em sistemas de liberação controlada (SLCs) é relatada como uma forma de sobrepor essas limitações, dentre os nanocarreadores capazes de veicular esses fármacos, os lipossomas se destacam (Zhou *et al.*, 2021).

Os lipossomas são vesículas de formato esférico compostos por uma ou mais bicamada lipídica de natureza anfipática, que possuem a capacidade de encapsular e transportar moléculas de natureza hidrofílica ou hidrofóbica, e controlar sua liberação (Antoniou *et al.*, 2021). Porém, sua susceptibilidade ao pH ácido estomacal e a degradação fisiológica, limitam sua aplicação por via oral, uma vez que há a possibilidade de extravasamento de fármacos (Zhou *et al.*, 2021).

Em vista disto, para reverter as limitações da administração dos lipossomas por via oral, polímeros foram investigados para esses fins, sendo a quitosana uma das mais explorada (Mohammed *et al.*, 2021). Isso se deve, principalmente, as propriedades de biocompatibilidade, biodegradáveis e mucoadesão, fator esse que prolonga a retenção no trato gastrointestinal, promovendo assim um aumento da

penetração e permeabilidade na camada de muco, além de aumentar a distribuição do fármaco nas células bacterianas (Hasan *et al.*, 2020). Assim, o presente estudo teve por objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da curcumina encapsulada em lipossomas revestidos com quitosana frente a *Escherichia coli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

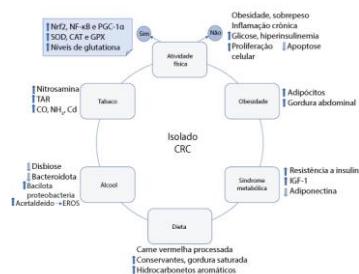
2.1 Câncer Colorretal: Impactos e Interações com a Microbiota Intestinal

2.1.1 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o segundo câncer mais comum nas mulheres e o terceiro mais comum nos homens, sendo o terceiro mais comum em todo mundo e a segunda principal causa de mortalidade relacionada ao câncer (Li *et al.*, 2021; Shin *et al.*, 2023). Em todo o mundo, este continua a ser uma causa significativa de mortes relacionadas com a doença. Apesar de existir formas de diagnosticar esta doença de forma precoce, menos de metade dos casos são detectados nas fases iniciais, acarretando dificuldades para manejo clínico (Patel *et al.*, 2022).

Este é caracterizado por uma variedade de mutações genéticas ou somáticas, resultando em uma condição complexa e heterogênea. O tipo esporádico é primariamente influenciado por vários fatores ambientais e de estilo de vida, incluindo atividade física, obesidade/síndrome metabólica, padrões alimentares, bem como o consumo de substâncias como álcool ou tabaco, e exposição à poluição (Figura 1) (Caballero-Avendaño *et al.*, 2023).

Figura 1. Principais fatores de risco que estão associados ao câncer colorretal.



Fonte: Caballeros-Avendaño; Ramirez-Garcia; Ricón-Sánchez; 2023.

Na década de 1960, Gilbertson, um cirurgião americano que fez importantes contribuições para a compreensão do câncer colorretal e suas etapas de desenvolvimento do CCR, propôs a ideia de que essa patologia poderia ter origem em lesões intermediárias no cólon. Pesquisas subsequentes revelaram a presença de adenocarcinoma em pólipos adenomatosos, conhecidos como “adenomas”, sugerindo uma progressão potencial de pôlipo para câncer. No início da década de 1990, Fearon e Vogelstein estabeleceram ainda mais o CCR como uma doença genética, destacando a sequência de mutações genéticas específicas que contribuem para o desenvolvimento do carcinoma a partir de pólipos (Fearon; Vogelstein, 1990; Sullivan *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, houve um declínio na sua ocorrência, principalmente devido à crescente adoção do rastreamento do CCR e da polipectomia colonoscópica entre adultos mais velhos, bem como a escolhas positivas de estilo de vida. Por outro lado, tem havido um aumento global no diagnóstico em indivíduos mais jovens, também conhecido como câncer de início precoce (Si *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022).

A taxa de sobrevida estimada em 5 anos para pacientes com câncer colorretal metastático (CCRm) é de aproximadamente 15%. É importante destacar que cerca de 33% dos indivíduos diagnosticados com CCR apresentam metástases no momento do diagnóstico ou irão desenvolvê-las durante o período de acompanhamento (Morris *et al.*, 2023; Leowattana *et al.*, 2023). E, considerando tais características, existe uma necessidade emergente e significativa de encontrar novas abordagens terapêuticas que considerem sua etiologia multifatorial, considerando que o câncer ainda persiste como um desafio de saúde global (Zigulska *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2021).

2.1.2 Microbiota intestinal

Dentro do sistema digestivo humano, coexiste uma vasta comunidade de mais de 1000 espécies e 10^{14} microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas desempenhando funções vitais na manutenção de um equilíbrio fisiológico saudável (Souza *et al.*, 2022). Várias pesquisas revelaram o impacto significativo do microbioma intestinal no hospedeiro, particularmente em relação ao desenvolvimento de adenoma e sua progressão para carcinoma (Quaglio *et al.*, 2022). Por outro lado, uma microbiota saudável está associada a um risco reduzido de adenoma avançado. Acredita-se que vários fatores, incluindo

obesidade, dieta rica em gordura, tabagismo e consumo frequente de álcool, influenciam a composição da microbiota intestinal e contribuem potencialmente para a carcinogênese do cólon (Rebersek *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022; Qu *et al.*, 2023).

A fisiopatologia molecular é um campo de estudo que investiga a relação entre fatores de risco e marcadores genéticos, incidência e progressão tumoral, uma vez que já é comprovado vários distúrbios genéticos a indução e desenvolvimento do CCR (Islam *et al.*, 2022). No entanto, avanços recentes analisaram o papel do microbioma intestinal, através do desenvolvimento de novas tecnologias, como, sequenciamento do 16S rRNA permitiram a descoberta de diversos microrganismos associados ao CCR, além disso, estudos como os de metabolômica e metagenômica onde foram descritos os efeitos destes microrganismos e sua relação com a indução, progressão e desenvolvimento tumoral (Kim *et al.*, 2022).

O microambiente neoplásico é muito influenciado pelas bactérias, tornando-as um componente crucial. A microbiota intestinal, repleta de bactérias, é frequentemente referida como o “órgão esquecido” devido ao seu impacto em numerosos processos fisiológicos no corpo humano (Yuan *et al.*, 2023). Quando se trata de CCR, existem características distintas associadas a alterações na microbiota intestinal. Por exemplo, pacientes com adenomas apresentam níveis significativamente mais elevados de *Bilophilia*, *Desulfovibrio*, *Corynebacterium* e *Phascolarctobacterium* na matéria fecal. (Zhao *et al.*, 2021). No entanto, uma cepa específica de *Escherichia coli* pks+, é mais comumente encontrada em indivíduos com CCR devido à presença da ilha de patogenicidade pks. Esta ilha codifica um grupo de enzimas responsáveis pela síntese da colibactina (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2020)

2.2 *Escherichia coli*

Durante o ano de 1884, Theodor Escherich fez uma descoberta significativa ao isolar um organismo comensal predominante que residia no trato gastrointestinal. Este microrganismo, mais tarde conhecido como *Escherichia coli*, foi inicialmente referido como *Bacillus coli communis*, um termo derivado do latim que representava com precisão a sua presença comum no cólon. Uma das características mais relevantes observadas na época foi a facilidade de cultivo em vários substratos, fator que, posteriormente, se mostrou

significativo para o desenvolvimento de diversos estudos no campo da ciência que tinham por base o estudo da mesma (Yu *et al.*, 2021).

A amostra inicial, meticulosamente registrada em 1885, foi identificada com base em sua colônia e estrutura celular únicas, bem como em sua capacidade de fermentar glicose, produzir ácido láctico e coagular leite. Em 1919, a bactéria foi reclassificada para homenagear o seu descobridor original, e os anos seguintes testemunharam a expansão das características definidoras que distinguem a *E. coli* de outras espécies que habitam o trato gastrointestinal (Cobó-Simon *et al.*, 2023).

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, e, embora a maioria das cepas sejam inofensivas, algumas possuem fatores de virulência e apresentam patogênicidade. Entre estas, a *E. coli* enterohemorrágica é reconhecida como a principal causa de doenças de origem alimentar. Subgrupos adicionais incluem *E. coli* enterotoxigênica, enteroaggregativa, enteroinvasiva e enteropatogênica (Ratshiligan *et al.*, 2022). As cepas de *E. coli* são normalmente categorizadas nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D. Os grupos B2 e D são conhecidos por sua propensão a causar infecções extraintestinais e são considerados de natureza mais invasiva, além do mais a cepa produtora de colibactina, *E. coli* pks+ pertence ao grupo filogenético B2 (Yoon *et al.*, 2022).

2.2.1 *Escherichia coli* pks+

O envolvimento de *E. coli* do grupo filogenético B2 no CCR é atribuído à presença de uma ilha genômica conhecida como policetídeo sintetase (pks). Esta ilha codifica a síntese de colibactina, uma genotoxina que causa danos ao DNA, parada do ciclo celular, mutações e instabilidade cromossômica em células eucarióticas. Descobriu-se que várias espécies bacterianas, incluindo cepas genotóxicas de *E. coli*, são mais abundantes nas fezes e biópsias de pacientes com CCR (Pleguezuelos-Manzano *et al.*, 2020).

Estas carregam um operon peptídeo sintetase não ribossômico híbrido de 54 kb responsável pela produção da genotoxina colibactina. Dentro da ilha pks genômica de 54 kb, há um total de sete unidades transcricionais, que podem ser classificadas em quatro elementos policistrônicos e três elementos monocistrônicos onde são todas orientadas na mesma direção, exceto um policistron específico que é contra-orientado. Este policistron

específico contém a panteteiniltransferase (PPTase) conhecida como clbA, bem como o ativador transcracional semelhante ao LuxR chamado clbR.(Faïs *et al.*, 2018)

Estes dois elementos são responsáveis por promover a expressão do gene pks a jusante. A ilha pks consiste em um total de 19 genes clb, variando de clbA a clbS. Esses genes codificam os componentes necessários para a produção, transporte e ativação da colibactina. Isso inclui as principais policetídeos sintases (PKSs), peptídeos sintases não ribossômicos (NRPSs) e NRPS-PKSs híbridos. Desta forma, estas enzimas agem semelhante a uma “linha de montagem” enzimática para a produção da colibactina (Strakova *et al.*, 2021; Faïs *et al.*, 2018). Essas cepas pks+ de *E. coli* estão presentes em uma proporção significativa de indivíduos, incluindo aproximadamente 20% dos indivíduos saudáveis, 40% daqueles com doença inflamatória intestinal e 60% dos indivíduos com polipose adenomatosa familiar e CCR (Iyadorai *et al.*, 2020). O impacto citotóxico da colibactina nos enterócitos do hospedeiro foi demonstrado através de experiências *in vitro*. Esta genotoxina altera a via de sinalização Wnt, modificando as proteínas Wnt e impedindo a degradação da β-catenina, consequentemente, o dano ao DNA ocorre através da formação de quebras na fita dupla e da geração de espécies reativas de oxigênio. Esta sequência de eventos resulta numa interrupção temporária do ciclo celular entre as fases G2-M, levando à morte celular (Souza *et al.*, 2024)

A descoberta da colibactina, um composto genotóxico capaz de interagir com o DNA eucariótico e causar quebras de fita dupla, foi feita em 2006 na cepa IHE3034a de meningite por *E. coli* (Nougayrède *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2021). A produção de colibactina leva à ocorrência de quebras na cadeia dupla do DNA em locais específicos que se alinham com os hotspots de mutação somática encontrados no genoma do CCR. Recentes estudos revelaram padrões de mutações no CCR, indicando um mecanismo mutacional direto causado pela exposição prévia a bactérias que produzem colibactina (Liu *et al.*, 2021). Além disso, experimentos envolvendo a colonização de camundongos com essa cepa demonstraram uma associação direta entre a produção de colibactina e o desenvolvimento de câncer de cólon (Oliero *et al.*, 2021).

Estudos realizados em laboratório revelaram que pks+ *E. coli* pode levar à megalocitose, uma condição caracterizada por um aumento no tamanho das células e do núcleo sem sofrer mitose. Além disso, descobriu-se que essas bactérias causam quebras na fita dupla do DNA e induzem a parada da fase G2 do ciclo celular (Dougherty *et al.*, 2022).

Células renais embrionárias humanas (HEK) são comumente utilizadas em estudos de citotoxicidade no campo da biologia celular devido às suas capacidades consistentes de crescimento e transfeção. Notavelmente, ensaios experimentais de citotoxicidade conduzidos em células HEK cultivadas demonstraram o papel significativo desempenhado pela codificação pks na colonização, inflamação e progressão do câncer (Tariq *et al.*, 2022). Em um estudo de Vezante *et al.* (2021), observou-se que a colonização da mucosa intestinal por CoPEC foi mais prevalente em pacientes com câncer colorretal (CCR) em estágio III ou IV em comparação com aqueles com CCR em estágio I. Estes achados sugerem uma associação potencial entre a colonização da *E. coli* produtora de colibactina e a agressividade do câncer.

2.3 Curcumina

Os fitoterápicos oferecem inúmeras vantagens em comparação com os medicamentos convencionais, incluindo efeitos secundários mínimos, baixa toxicidade a longo prazo e biodisponibilidade variável. A cúrcuma, também conhecida pelo seu nome científico *Curcuma longa*, é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional há milhares de anos, com registros que remontam a 6.000 anos a.C. na Índia e sua introdução na China por volta de 700 d.C. Se trata de um composto químico amarelo-laranja que foi isolada com sucesso pela primeira vez em 1815 por Milobedaska e Lampe, embora tenha sido somente em 1910 que sua estrutura química foi determinada e sua síntese tornou-se possível (Figura 2). Vale ressaltar que a mesma possui uma baixa solubilidade em água, o que pode apresentar desafios significativos em relação à sua biodisponibilidade e aplicação terapêutica (Yang *et al.*, 2024).

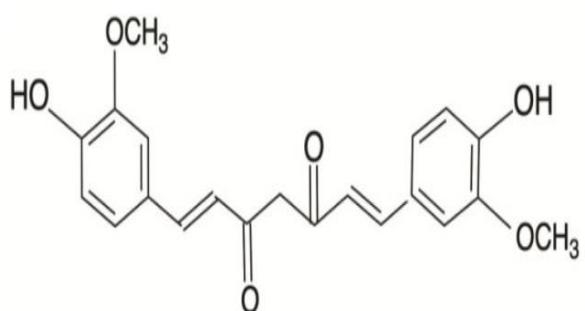


Figura 2. Estrutura química da Curcumina

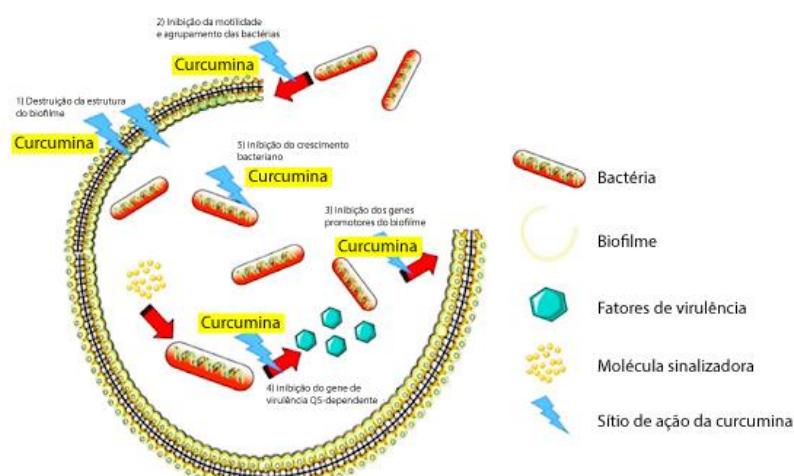
Fonte: American Chemical Society, 2005.

A CUR, frequentemente derivada de polifenóis, é reconhecida por sua capacidade de combater o estresse oxidativo e a inflamação em condições como hiperlipidemia, síndrome metabólica, artrite e depressão. Além disso, nas últimas décadas, tem sido cada vez mais reconhecida sua eficácia como agente antibacteriano. Estudos têm mostrado seu potencial inibitório frente a uma variedade de cepas bacterianas, sugerindo que a CUR pode ser útil no tratamento de infecções bacterianas. Essa ampliação de seu espectro terapêutico reforça ainda mais seu papel como um agente multifuncional na medicina (Islam *et al.*, 2024).

2.3.1 Mecanismo de ação da curcumina

A CUR demonstrou sua capacidade de exibir efeitos antibacterianos contra um amplo espectro de bactérias. Indica-se que a mesma tem a capacidade de perturbar a integridade e a permeabilidade das membranas celulares bacterianas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, resultando no desaparecimento das células bacterianas (Dai *et al.*, 2022). Essa característica é potencializada pela presença de grupos hidroxila fenólicos, que atuam como grupos doadores de elétrons. Os grupamentos álcool (-OH) e metoxi (OCH_3) presentes nos anéis aromáticos da curcumina possuem propriedades antibacterianas contra ambos os tipos de bactérias. Esses grupos doadores de elétrons interagem com a membrana bacteriana, aumentando assim a permeabilidade do medicamento, que, provavelmente responsável pelo efeito bactericida direto da curcumina contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Targhi *et al.*, 2021).

Figura 3. Mecanismo de ação da curcumina



Fonte: Dai; Lin; Shen; 2022.

Além disso, há relatos indicando que esta possui a capacidade de combater eficazmente a formação de biofilme, modulando a atividade de genes associados à detecção de *quorum* bacteriano. Os principais mecanismos envolvidos nessa atividade incluem a desestabilização da estrutura dos biofilmes, impedindo o movimento e agregação bacteriana, suprimindo a expressão de genes que promovem a formação de biofilme, obstruindo a ativação de genes de virulência dependentes da detecção de *quorum* e impedindo o crescimento de células bacterianas (Hu *et al.*, 2023).

2.4 Nanotecnologia farmacêutica

A nanotecnologia farmacêutica representa uma área promissora na busca por terapias mais eficazes e precisas. Através da manipulação de materiais em escala nanométrica, como lipossomas, nanopartículas e nanoemulsões, esta visa atuar frente ao aprimoramento da entrega de medicamentos, melhorar a biodisponibilidade e reduzir os efeitos colaterais associados às terapias convencionais (Hwang *et al.*, 2021; Edis *et al.*, 2021).

Além disso, é possível oferecer uma abordagem inovadora para fins de promoção da administração de fármacos instáveis em pH gastrointestinal, sendo isso relacionado com a capacidade de modificar a superfície desses nanossistemas, de modo que seja aumentada sua estabilidade nessas condições, prolongar sua circulação no organismo e melhorar sua eficácia terapêutica. Nesse sentido, são abertas novas perspectivas no campo da medicina personalizada, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos adaptados às necessidades individuais de cada paciente (Cheng *et al.*, 2022; Rana *et al.*, 2023).

2.4.1 Lipossoma

A FDA concedeu aprovação para o uso clínico de lipossomas, tornando-os os primeiros nanocarreadores a receber tal reconhecimento. Estes consistem em uma bicamada fosfolipídica com a presença de um núcleo aquoso, de formato esférico, geralmente apresentam um tamanho de partícula que varia entre 25 e 1000 nm (Chen *et al.*, 2020). De modo geral, são categorizados com base no número e tamanho de suas lamelas, tais como os multivesiculares (MVs), multilamelares grandes (LMVs), oligolamelares (OLVs), unilamelares gigantes (GUVs), unilamelares de tamanho médio (MUVs) e unilamelares

pequenas (SUVs). Os tamanhos dessas vesículas podem variar de algumas centenas de nanômetros a micrômetros, enquanto MUVs e SUVs normalmente medem entre 100-500 nm e 20-100 nm, respectivamente (Wahyudiono *et al.*, 2022).

Ao considerar a utilização de lipossomas em comparação com outros sistemas, diversas vantagens podem ser destacadas, como a biocompatibilidade, uma vez que os fosfolipídios utilizados na sua produção se assemelham muito aos encontrados nas membranas celulares, minimizando a probabilidade de reações adversas. Ademais, estes oferecem versatilidade, pois podem encapsular vários tipos de fármacos, sejam hidrofílicos, lipofílicos ou uma combinação de ambas, sendo isso atribuído à sua estrutura anfifílica, além de promoverem a liberação controlada desses ativos, otimizando o efeito terapêutico e reduzindo a frequência de doses (Hasan *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2022).

Considerando que a solubilidade da curcumina em água representa um desafio significativo em virtude da sua natureza hidrofóbica, e, a fim de superar esses desafios, uma nova abordagem terapêutica se faz pelo emprego de nanocarreadores como lipossomas. Estes possibilitam a entrega da curcumina diretamente às células bacterianas, de modo que seja aumentada sua concentração intracelular e potencializada sua atividade antibacteriana. No entanto, é importante salientar que os lipossomas são instáveis em pH gastrointestinal, o que pode comprometer sua eficácia terapêutica, e, nesse sentido, o revestimento com moléculas como a quitosana pode ser essencial para protegê-los da degradação no trato gastrointestinal, garantindo assim a entrega eficiente da curcumina ao seu local de ação (Wong *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2024).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de curcumina encapsulada em lipossomas revestidos com quitosana frente a *Escherichia coli*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Desenvolver lipossomas revestidos com quitosana encapsulando curcumina(Lipo-CUR-Qui);
- II. Caracterizar físico-quimicamente as formulações do Lipo-CUR-Qui;
- III. Avaliar a atividade antibacteriana do Lipo-CUR-Qui;
- IV. Avaliar a atividade antibiofilme do Lipo-CUR-Qui;

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação dos lipossomas revestidos com quitosana contendo curcumina

Os lipossomas contendo CUR foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Para encapsulação de fármacos hidrofílicos, os lipídeos, colesterol (CH), CUR e fosfatidilcolina (PC), Tween 80 foram solubilizados em solvente orgânico sob agitação magnética. Em seguida, o filme lipídico foi formado pela evaporação dos solventes à pressão reduzida, que, posteriormente foi ressuspendido com a solução de tampão fosfato ($\text{pH}= 7.4$) formando espontaneamente lipossomas multilamelares grandes (MLV). Em seguida estes foram sonicados obtendo os lipossomas unilamelares pequenos (SUV) (CAVALCANTI *et al.*, 2011).

Para o revestimento dos LIPO-CUR-QUI, a quitosana foi solubilizada em ácido acético glacial. A solução de quitosana a 1% foi submetida a agitação constante overnight. Os lipossomas foram adicionados gota a gota na solução de quitosana e se mantiveram sob agitação magnética por 1 hora (ALSHAMSAN *et al.*, 2019).

4.2 Caracterização dos lipossomas

Os Lipo-CUR-Qui foram submetidos à caracterização físico-química através da análise do tamanho de partícula (\varnothing), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e pH como previamente descrito por Cavalcanti *et al.* (2011). As dispersões de lipossomas foram dimensionadas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

Para análise do tamanho de partícula, a dispersão lipossomal foi diluída em água purificada. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (nm). O potencial zeta dos lipossomas foi medido após a diluição da dispersão de lipossomas em uma solução de água ultrapura. A carga superficial dos lipossomas (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH do lipossoma foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnopon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.3 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de Lipo-CUR-Qui

Para determinar o teor de CUR nas formulações, os lipossomas foram diluídos em CH₃OH, centrifugada durante 10 minutos e o sobrenadante foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em percentual a partir da média das absorbâncias. O experimento será realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A eficiência de encapsulação (EE%) de CUR foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de lipossomas foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 1h. Uma alíquota da amostra filtrada foi diluída em CH₃OH. A EE% de CUR foi mensurado por espectrofotometria e os resultados foram expressos em percentual a partir da média as absorbâncias. Os dados de eficiência de encapsulação dos fármacos foram calculados usando a equação descrita abaixo:

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Total de CUR} - \text{filtrado de CUR}}{\text{Total de CUR}} \times 100$$

4.4 Avaliação da atividade antibiofilme de Lipo-CUR-Qui

A atividade antibiofilme de Lipo-CUR-Qui frente a *E. coli* ATCC H10407 foi realizada através do método do cristal violeta. Inicialmente as cepas foram ajustadas na escala 0,5 de McFarland. A contagem de células foi confirmada por espectrofotometria a 630 nm e as suspensões bacterianas foram distribuídas em placas de microdiluição de fundo plano até uma concentração final de 10⁵ UFC/mL e incubadas a 35 °C por 24 h. Após o crescimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi aspirado e diluições em série de Lipo-CUR-Qui foram realizadas em TSB e adicionadas a cada poço.

As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foram aspirado e serão realizadas lavagens com salina (0,9%). 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%. O excesso de corante foi removido e será realizada lavagens com salina em cada poço. Em seguida a análise do resultado foi realizada através de espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir a formação do biofilme (PEETERS *et al.*, 2016). Todo o experimento será realizado em triplicatas independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química

As formulações Lipo-Qui apresentaram TP de $97,72 \pm 0,7$ nm, PDI de 0,298, Potencial zeta de $+12,4 \pm 0,9$ mV e pH de 5, por sua vez, as formulações de Lipo-CUR-Qui apresentaram $142,0 \pm 2,2$ nm, 0,386, $+15,0 \pm 0,6$ mV e 5,1 conforme descrito na Tabela 1. Após examinar os resultados, foi observado que o tamanho das partículas nas preparações com e sem revestimento de quitosana diferem, esse aumento no tamanho das partículas pode indicar uma modificação na estrutura dos lipossomas, possivelmente devido à incorporação de curcumina e seguido pelo revestimento por quitosana. (IMAM *et al.*, 2021). No entanto, é importante notar que o Índice de Polidispersão (PDI) também aumentou ligeiramente de 0,298 para 0,386, o que pode indicar uma maior heterogeneidade no tamanho das partículas nas formulações Lipo-CUR-Qui. Valores de PDI inferiores a 0,1 indicam uma distribuição uniforme, no entanto, valores até 0,6 são considerados aceitáveis para aplicações farmacêuticas (Cui *et al.*, 2021; Nunes *et al.*, 2021).

Tabela 1. Caracterização de Lipo -Qui e Lipo-CUR-Qui.

Formulação	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	Teor	%EE
Lipo-Qui	$97,72 \pm 0,7$	0,298	$+12,4 \pm 0,9$	5	-	-
Lipo-CUR-Qui	$142,0 \pm 2,2$	0,386	$+15,0 \pm 0,6$	5,1	$99,9 \pm 0,1\%$	$97,2 \pm 0,6\%$

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana; Lipo-CUR-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CUR;

Os fosfolipídios presentes na formulação tendem a causar carga superficial negativa, possivelmente devido aos grupos de ácidos graxos livres e ao fosfato dos fosfolipídios. Os lipossomas podem ser formulados e aplicados com ou sem revestimento em sua superfície, geralmente polímeros com a quitosana são empregados com esse propósito. Por sua vez, a quitosana é um polímero catiônico derivado da quitina que possui grupamentos amina de

carga positiva (NH^{3+}), capazes de interagir eletrostaticamente com a superfície negativa dos lipossomas não revestidos, gerando uma diferença de potencial. A variação no potencial zeta das formulações com e sem revestimento de quitosana sugere que o revestimento foi eficaz e uma maior estabilidade coloidal das formulações Lipo-CUR-Qui (Hasan *et al.*, 2019; Moslehi *et al.*, 2020).

Quando as formulações são revestidas com quitosana, o pH tem um papel crucial na liberação dos fármacos em nanossistemas, isso porque pH ácidos pode ajudar a manter a estabilidade desses compostos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, melhorando sua eficácia terapêutica ou biodisponibilidade. Nesse sentido, o pH das formulações permaneceu em torno de 5,1 para ambas as formulações, indicando que o processo de encapsulação não teve um efeito significativo no pH das amostras (Ahmed *et al.*, 2020; Oransa *et al.*, 2022). O revestimento é projetado para resistir ao pH da mucosa gástrica, permitindo a liberação controlada do fármaco encapsulado no intestino delgado (De Leo *et al.*, 2023).

Considerando a baixa solubilidade da CUR em meios aquosos, sua absorção e biodisponibilidade são limitadas. Ao encapsular a mesma em lipossomas a solubilidade é aumentada, facilitando sua administração e absorção, podendo isso resultar em uma distribuição mais eficaz do fármaco no organismo e uma melhor resposta terapêutica (HU *et al.*, 2023). Valores altos de teor e eficiência de encapsulação (%EE) dos fármacos em lipossomas são aspectos essenciais para uma farmacoterapia eficiente, devido à importância da manutenção do fármaco dentro de uma faixa terapêutica durante um período adequado para o tratamento de infecções causadas por bactérias que induzem o câncer colorretal. Assim, a formulação de Lipo-Cur-Qui obteve teor de $99,9 \pm 0,1\%$ e %EE de $97,2 \pm 0,6\%$, indicando que uma grande proporção da CUR foi adicionada foi encapsulada no lipossoma com sucesso, sugerindo que o processo de encapsulação foi eficiente. Resultados como esses são encorajadores para o desenvolvimento de formulações de liberação controlada de curcumina para futuras aplicações clínicas (Badran *et al.*, 2022).

5.2 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana, demonstrou resultados onde CUR apresentou CIM e CBM de 125 µg/ml *E. coli* ATCC 25922, 1000 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846 e para *E.*

coli H10407 apresentou CIM de 250 µg/mL e CBM de 500 µg/mL. Já os lipossomas revestidos de quitosana encapsulando CUR apresentaram CIM e CBM de 62,5 µg/mL para todas as cepas testadas, demonstrando um grande aumento da atividade antibacteriana de CUR após sua adição no sistema de liberação controlada (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da atividade antibacteriana de CUR, e Lipo-CUR-Qui frente a *E. coli* ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407

Bactérias	CUR		Lipo-CUR-Qui	
	CIM	CBM	CIM	CBM
µg/mL				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	125	62,5	62,5
<i>E. coli</i> NCTC 13846	1000	1000	62,5	62,5
<i>E. coli</i> H10407	250	500	62,5	62,5

CUR: Curcumina; Lipo-CUR-QUI: Lipossoma contendo curcumina revestido por quitosana; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.

A atividade antibacteriana de CUR livre frente a bacilos Gram-negativos, apesar de escassa, já foi descrita anteriormente na literatura, conforme observado no estudo de Kareem *et al.* (2020) os quais avaliaram o CIM e o CBM de CUR livre frente a cepas de *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560) com valores de CIM e CBM de 256 e 512 µg/mL, respectivamente. Segundo os autores, a baixa eficácia da CUR frente a essas bactérias pode estar relacionada à sua dificuldade de permeação das membranas bacterianas, especialmente devido à sua natureza lipofílica, afetando diretamente na inibição do crescimento bacteriano.

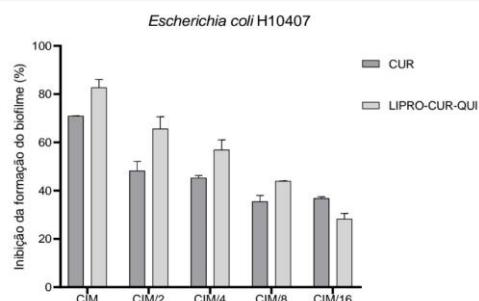
Considerando esse aspecto, os nanossistemas surgem como alternativas promissoras, uma vez que podem facilitar a adesão e a liberação da substância encapsulada diretamente no interior das células bacterianas, potencializando assim o efeito antibacteriano da CUR (Zhu *et al.*, 2024). Na literatura foram encontrados alguns estudos que avaliaram a atividade da CUR nanoencapsulada frente a bactérias Gram-negativas, no entanto, Targhi *et al.* (2021), encapsularam a CUR em niossomos (Cur-Nio), e relataram propriedades antibacterianas frente à isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM de 50 µg/mL para a CUR livre e 25 µg/mL para Cur-Nio.

Com base nesses resultados, evidenciamos corroboramos com o que foi descrito na literatura, evidenciando a redução significativa da CIM e da CBM para a curcumina encapsulada em lipossomos em comparação com a curcumina livre. A propriedade antibacteriana é atribuída a presença dos curcumínóides, principais metabólitos secundários da CUR, exibindo tanto inibição de bactérias sensíveis, quanto resistentes aos antibióticos convencionais (Hettiarachchi *et al.*, 2022).

5.3 Atividade Antibiofilme

A inibição da formação de biofilme mostrou uma resposta dependente da dose para os diferentes agentes testados. Observou-se que a maior inibição ocorreu na CIM e a menor inibição ocorreu na CIM/16, conforme representado na Figura 3. Os resultados revelaram uma variação significativa nos níveis de inibição do biofilme, com CUR apresentando uma inibição que variou de 36,3% a 71%, e Lipo-CUR-Qui de 26,61% a 85,07%. Conforme previamente esperado, o Lipo-Qui não demonstrou capacidade de inibir a formação de biofilme em nenhuma das concentrações testadas. Essas descobertas ressaltam a importância das dosagens específicas na eficácia da inibição do biofilme por esses agentes e fornecem informações valiosas para futuras investigações e aplicações clínicas (Maurizi *et al.*, 2022).

Figura 4. Inibição da formação de biofilme de cepas de *Escherichia coli* H10407 após o tratamento de curcumina encapsulados em lipossomos revestidos com quitosana.



Fonte: Autoria própria (2024).

Biofilmes são aglomerados microbianos que se constituem em uma matriz de exopolissacarídeos, criando uma barreira protetora que isola as bactérias de substâncias antibacterianas. Portanto, para que substâncias sejam eficazes na desestruturação de biofilmes, é fundamental que elas possuam a capacidade de penetrar essa matriz e eliminar as bactérias contidas nesses aglomerados (Zou *et al.*, 2023). Com base nesse princípio, a atividade de inibição de biofilmes observada nas formulações desenvolvidas neste estudo pode ser atribuída à ação das formulações lipossomais que encapsulam a curcumina, as quais demonstram potencial na prevenção e eliminação de biofilmes, particularmente nas fases de adesão, proliferação e crescimento dessas estruturas bacterianas complexas (Alshammari *et al.*, 2023).

A formação de biofilme começa com a adesão das bactérias a uma superfície, seguida pelo crescimento celular e pela produção de exopolissacarídeos. Esse processo é influenciado pelo *Quorum Sensing* (QS), que coordena o comportamento das bactérias em resposta à densidade populacional. A capacidade de adesão das bactérias à superfície e a produção de exopolissacarídeos são cruciais para a formação do biofilme. Para inibir a formação de biofilme, são utilizadas abordagens que visam diretamente as células bacterianas, previnem a adesão bacteriana à superfície ou interrompem o QS (Atac *et al.*, 2023).

A fim de avaliar a inibição da formação de biofilme de nanossistemas alguns estudos foram desenvolvidos como no estudo conduzido por Hu *et al.* (2023), onde a atividade antibiofilme da curcumina livre e lipossomas contendo curcumina foi avaliada frente a *Streptococcus mutans*. Os resultados revelaram que a formação de biofilme foi significativamente reduzida no grupo tratado com lipossomas encapsulados em curcumina (Lipo-CUR) em comparação com o grupo tratado com curcumina livre numa concentração de 10 µM, além disso, não houve diferença significativa observada entre o grupo de CUR e o grupo controle. Isso pode ser atribuído ao fato de que a CUR livre foi eliminada após 4 horas, momento em que o biofilme foi inicialmente formado. Por outro lado, a CUR encapsulada em lipossomas aderiu ao biofilme e não foi completamente removida, permitindo que a mesma continuasse a exercer seu efeito antibacteriano durante todo o período de cultura.

A pesquisa conduzida por Shariffian *et al.* (2020) em estudos com nanopartículas, revelaram que quando a Nano-Cur não estava presente, a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 10145 exibiu produção robusta de biofilme. No entanto, quando

a Nano-Cur foi introduzida nas concentrações de 15 e 20 µg/mL, a formação de biofilme foi significativamente reduzida para níveis moderado (2+) e fraco (1+), respectivamente, ressaltando, assim, o seu potencial frente à inibição de biofilmes.

Além das características dos fármacos, os atributos dos lipossomas também podem potencializar a atividade antibiofilme. De acordo com a literatura, os lipossomas devem possuir diâmetros entre 100 e 300 nm para facilitar a penetração e o direcionamento dos agentes antibacterianos no biofilme (Khan *et al.*, 2020). Dessa forma, os lipossomas desenvolvidos neste estudo demonstraram possuir tamanhos adequados para essa penetração, com tamanho de, aproximadamente, 142,0 nm.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através do presente estudo são encorajadores, sugerindo a possibilidade de utilização das formulações que encapsulam curcumina em lipossomas revestidos com quitosana como uma opção terapêutica para pacientes diagnosticados com cepas genotóxicas de *E. coli*. Esta abordagem terapêutica demonstra um potencial significativo para ser adotada, no futuro, para o combate à indução e/ou progressão do câncer colorretal. Dessa forma, esses achados representam um avanço importante e podem impactar positivamente a prática clínica, destacando a importância contínua da pesquisa nessa área.

Apesar das limitações relacionados ao estudo *in vitro* e realizado exclusivamente em bactérias, abre-se possibilidades para pesquisas futuras, como a investigação *in vitro* em células tumorais – a fim de investigar diretamente seus efeitos frente ao câncer colorretal. Além disso, modelos animais *in vivo* poderiam ser utilizados para compreender o comportamento das formulações em ambientes biológicos, representando, assim, direcionamentos importantes para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o câncer.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, A. et al. Tomasz M. Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 7, p. 153, 2020.
- AHMED, T. A. et al. Development of rosuvastatin flexible lipid-based nanoparticles: promising nanocarriers for improving intestinal cells cytotoxicity. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2020.
- ALSHAMSAN, A. et al. Exploring anti-MRSA activity of chitosan-coated liposomal dicloxacillin. **Journal of microbiological methods**, v. 156, p. 23-28, 2019.
- ANTONIOU, A. I. et al. Stimulus-responsive liposomes for biomedical applications. **Drug discovery today**, v. 26, n. 8, p. 1794-1824, 2021.
- ARIMA, K. et al. Western-Style diet, PKs island-carrying *Escherichia coli*, and colorectal cancer: analyses from two large prospective cohort studies. **Gastroenterology**, v. 163, n. 4, p. 862-874, 2022.
- BADRAN, M.M. et al. Transdermal glipizide delivery system based on chitosan-coated deformable liposomes: development, *ex vivo*, and *in vivo* studies. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 826, 2022.
- CABALLERO-AVENDAÑO, A. et al. Epidemiology of environmental factors related to beta-catenin pathway and its impact on the development and progression of colorectal cancer. **Gaceta médica de México**, v. 159, n. 3, p. 245-252, 2023.
- CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 44, n. 3, p. 332-340, 2011.
- CHEN, Y. et al. Nano encapsulated curcumin: and its potential for biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, p. 3099-3120, 2020.
- CHENG, Z. et al. Nanocarriers for intracellular co-delivery of proteins and small-molecule drugs for cancer therapy. **Front Bioeng Biotechnol**. 2022 v. 6, n. 10, p. 994655, 2022.

CHEW, S. S. *et al.* Targeting gut microbial biofilms—a key to hinder colon carcinogenesis?. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2272, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2020.

COBO-SIMÓN, M.; HART, R.; OCHMAN, H. *Escherichia coli*: What is and Which are?. **Molecular Biology and Evolution**, v. 40, n. 1, p. 273, 2023.

DAI, C. *et al.* The natural product curcumin as an antibacterial agent: current achievements and problems. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 459,.2022.

DAS, A. *et al.* Physicochemical characterization of dual action liposomal formulations: anticancer and antimicrobial. **Heliyon**, v. 5, n. 8, 2019.

DE LEO, V. *et al.* Polymer Encapsulated Liposomes for Oral Co-Delivery of Curcumin and Hydroxytyrosol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 790, 2023.

DE SOUZA, J. B. *et al.* Prevalence and implications of pKs-positive *Escherichia coli* in colorectal cancer. **Life Sciences**, p. 122462, 2024.

DE SOUZA, J. B.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; CAVALCANTI, I. M. F. Strategies for the treatment of colorectal cancer caused by gut microbiota. **Life Sciences**, v. 290, p. 120202, 2022.

DOUGHERTY, M. W. *et al.* The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. **Neoplasia**, v. 43, p. 100918, 2023.

EDIS, Z. W. J. *et al.* Nanocarriers-Mediated Drug Delivery Systems for Anticancer Agents: An Overview and Perspectives. **Int J Nanomedicine**. v. 17, n. 16, p. 1313-1330, 2021.

FAÏS, T. *et al.* Colibactin: more than a new bacterial toxin. **Toxins**, v. 10, n. 4, p. 151, 2018.

FAN, A. *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 14, p. 3837, 2021.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, 1990.

GOTTESMANN, M. *et al.* Smart drug delivery against Helicobacter pylori: pectin-coated, mucoadhesive liposomes with antiadhesive activity and antibiotic cargo. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 5943-5957, 2020.

HASAN, M. *et al.* Growth-inhibitory effect of chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin on MCF-7 breast cancer cells. **Marine drugs**, v. 18, n. 4, p. 217, 2020.

HATTORI, N. *et al.* Antibiotics suppress colon tumorigenesis through inhibition of aberrant DNA methylation in an azoxymethane and dextran sulfate sodium colitis model. **Cancer science**, v. 110, n. 1, p. 147-156, 2019.

HETTIARACHCHI, S. S. *et al.* Comparison of Antibacterial Activity of Nanocurcumin with Bulk Curcumin. **ACS omega**, v. 7, n. 50, p. 46494-46500, 2022.

HU, Z. *et al.* Functional liposome loaded curcumin for the treatment of Streptococcus mutans biofilm. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1160521, 2022.

HU, Y. *et al.* Antioxidant curcumin induces oxidative stress to kill tumor cells. **Oncology Letters**, v. 27, n. 2, p. 1-12, 2024.

HUSSAIN, Y. *et al.* Antimicrobial potential of curcumin: therapeutic potential and challenges to clinical applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 322, 2022.

HWANG, S. R. *et al.* Pharmaceutical Aspects of Nanocarriers for Smart Anticancer Therapy. **Pharmaceutics**. 2021 n. 5, v. 13, p. 1875.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Estatísticas de câncer**. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2020. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 10/02/2024.

IPAR, V. S. *et al.* Enhancing curcumin oral bioavailability through nanoformulations. **European journal of drug metabolism and Pharmacokinetics**, v. 44, 459-480, 2019.

ISLAM, M. R. *et al.* Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. **Chemico-Biological Interactions**, p. 110170, 2022.

ISLAM, M. R. *et al.* Targeted therapies of curcumin focus on its therapeutic benefits in cancers and human health: Molecular signaling pathway-based approaches and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 170, p. 116034, 2024

IYADORAI, T. *et al.* Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. **PLoS one**, v. 15, n. 1, p. e0228217, 2020.

KAREEM, S. M. *et al.* Effects of Curcumin and Silymarin on the *Shigella dysenteriae* and *Campylobacter jejuni* *in vitro*. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 51, p. 824-828, 2020.

KATOUIZIAN, I.; TAHERI, R. A. Preparation, characterization and release behavior of chitosan-coated nanoliposomes (chitosomes) containing olive leaf extract optimized by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, p. 3430-3443, 2021.

KIM, J.; LEE, H. K. Potential role of the gut microbiome in colorectal cancer progression. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 807648, 2022.

KOSARI, F. *et al.* Evaluation of cinnamon extract effects on clbB gene expression and biofilm formation in *Escherichia coli* strains isolated from colon cancer patients. **BMC cancer**, v. 20, p. 1-8, 2020.

LEOWATTANA, W.; LEOWATTANA, P.; LEOWATTANA, T. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 10, p. 1569, 2023.

LI, J. *et al.* Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes & development**, v. 35, n. 11-12, p. 787-820, 2021.

- LI, S. et al. Tumorigenic bacteria in colorectal cancer: mechanisms and treatments. **Cancer biology & medicine**, v. 19, n. 2, p. 147, 2022.
- LIU, K. et al. The role of fecal *Fusobacterium nucleatum* and pks+ *Escherichia coli* as early diagnostic markers of colorectal cancer. **Disease Markers**, v. 2021, 2021.
- LONG, Shuping et al. Metaproteomics characterizes human gut microbiome function in colorectal cancer. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 14, 2020.
- MALEKI DIZAJ, S. et al. Curcumin nanoformulations: Beneficial nanomedicine against cancer. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 3, p. 1156-1181, 2022.
- MOHAMMED, L. et al. Chitosan-covered liposomes as a promising drug transporter: nanoscale investigations. **RSC advances**, v. 11, n. 3, p. 1503-1516, 2021.
- MORRIS, V. K. et al. Treatment of metastatic colorectal cancer: ASCO guideline. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 41, n. 3, p. 678, 2023.
- NIIDA, A. et al. Modeling colorectal cancer evolution. **Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 9, p. 869-878, 2021.
- NOUGAYRÈDE, J. P. et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 848-851, 2006.
- OLIERO, M. et al. Oligosaccharides increase the genotoxic effect of colibactin produced by pks+ *Escherichia coli* strains. **Bmc Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2021.
- ORANSA, H. A. et al. Novel Mucoadhesive Chitosomes as a Platform for Enhanced Oral Bioavailability of Cinnarizine. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5641-5660, 2022.
- PATEL, S. G. et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection. **The lancet Gastroenterology & hepatology**, v. 7, n. 3, p. 262-274, 2022.

PETERS, M. et al. Size-dependent properties of functional PPV-based conjugated polymer nanoparticles for bioimaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 494-501, 2018.

PLEGUEZUELOS-MANZANO, C. et al. Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic pks+ *E. coli*. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 269-273, 2020.

QU, R. et al. Role of the Gut Microbiota and Its Metabolites in Tumorigenesis or Development of Colorectal Cancer. **Advanced Science**, p. 2205563, 2023.

QUAGLIO, A. E. V. et al. Gut microbiota, inflammatory bowel disease and colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 28, n. 30, p. 4053, 2022.

RANA, I. et al. Nanocarriers for cancer nano-immunotherapy. **Drug Deliv Transl Res**, v. 13, n. 7, p. 1936-1954, 2023.

RATSHILINGANO, M. T. et al. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from two commercial lettuce and spinach supply chains. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 1, p. 122-132, 2022.

REBERSEK, M. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. **BMC cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2021.

SHARIFI, S. et al. Anti-microbial activity of curcumin nanoformulations: New trends and future perspectives. **Phytotherapy Research**, v 34, n. 8, p. 1926-1946, 2020.

SHARIFIAN, P. et al. Investigating the effect of nano-curcumin on the expression of biofilm regulatory genes of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**, v. 18, p. 2477-2484, 2020.

SHIN, A. E et al. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2023.

SI, H. et al. Colorectal cancer occurrence and treatment based on changes in intestinal flora. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2021. p. 3-10.

SONG, M. et al. Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 158, n. 2, p. 322-340, 2020.

STRAKOVA, N. et al. *Klebsiella pneumoniae* producing bacterial toxin colibactin as a risk of colorectal cancer development - A systematic review. **Toxicon**, n. 15, v. 197, p. 126-135, 2021.

SULLIVAN, B. A et al. Cause, epidemiology, and histology of polyps and pathways to colorectal cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 32, n. 2, p. 177-194, 2022.

TARGHI, A. A. et al. Synergistic effect of curcumin-Cu and curcumin-Ag nanoparticle loaded niosome: Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, p. 105116, 2021.

TARIQ, H. et al. Colibactin possessing *E. coli* isolates in association with colorectal cancer and their genetic diversity among Pakistani population. **Plos one**, v. 17, n. 11, p. e0262662, 2022.

TIRENDI, S. et al. Colorectal cancer and therapy response: a focus on the main mechanisms involved. **Frontiers in Oncology**, v. 13, 2023.

VEZIANT, J. et al. Gut microbiota as potential biomarker and/or therapeutic target to improve the management of cancer: focus on colibactin-producing *Escherichia coli* in colorectal cancer. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2215, 2021.

WAHYUDIONO, J. et al. Curcumin-loaded liposome preparation in ultrasound environment under pressurized carbon dioxide. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1469, 2022.

WAN, S. et al. Curcumin-Loaded Platelet Membrane Bioinspired Chitosan-Modified Liposome for Effective Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 631, 2023.

WANG, C. H. et al. Defeating antibiotic-resistant bacteria: exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 1061, 2020.

WILD, C. et al. **World cancer report: cancer research for cancer prevention.** International Agency for Research on Cancer, 2020.

YANG, C. et al. Review of the Protective Mechanism of Curcumin on Cardiovascular Disease. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 165-192, 2024.

- YOON, S.; LEE, Y. J. Molecular characteristics of *Escherichia coli* from bulk tank milk in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 23, n. 1, 2022.
- YU, D. I. et al. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 553-571, 2021.
- YUAN, H. et al. Gut microbiota: A novel and potential target for radioimmunotherapy in colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1128774, 2023.
- YUN, D. G et al. Antibacterial activity of curcumin via apoptosis-like response in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 5505-5514, 2016.
- ZHAO, W. et al. Emerging mechanisms progress of colorectal cancer liver metastasis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 1081585, 2022.
- ZHAO, Y. et al.. Role of gut microbiota in epigenetic regulation of colorectal Cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1875, n. 1, p. 188490, 2021.
- ZHOU, W. et al. The formation of chitosan-coated rhamnolipid liposomes containing curcumin: stability and *in vitro* digestion. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 560, 2021.
- ZHU, J. et al. Curcumin for Treating Breast Cancer: A Review of Molecular Mechanisms, Combinations with Anticancer Drugs, and Nanosystems. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 79, 2024.
- ZYGULSKA, A. L et al. Novel diagnostic biomarkers in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 2, p. 852, 2022.