



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Gabriela Pereira Chuy

**Explorando a atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de
prata biogênicas**

Florianópolis
2025

Gabriela Pereira Chuy

Explorando a atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Biociências

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Fabienne A. Ferreira

Florianópolis
2025

Chuy, Gabriela Pereira

Explorando a atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata biogênicas / Gabriela Pereira Chuy
Orientadora, Fabienne Antunes Ferreira, 2025.
62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. nanopartícula de prata. 3. nanopartícula biogênica. 4. atividade antimicrobiana. 5. atividade antibiofilme. I. Ferreira, Fabienne Antunes. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Gabriela Pereira Chuy

Explorando a atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata
biogênicas

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado em 26/02/2025
por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.



Documento assinado digitalmente
Aginaldo Roberto Pinto
Data: 06/05/2025 09:44:53-0300
CPF: ***.874.718-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Documento assinado digitalmente
Fabienne Antunes Ferreira
Data: 06/05/2025 09:02:07-0300
CPF: ***.695.537-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof(a). Dr(a). Fabienne Antunes Ferreira
Orientador(a)

Florianópolis, 2025.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha profunda gratidão aos meus pais, Leonardo e Luciana, cujo apoio inabalável, incentivo constante e amor incondicional sempre me proporcionaram a serenidade necessária para trilhar meu caminho com confiança e determinação.

As minhas amigas, pelo suporte incondicional e por tornarem esta jornada mais leve e enriquecedora, meu sincero agradecimento. Em especial, à Emilene, Pâmela, Bethina, Gabrielly, Krislainy e Vitória, por compartilharem comigo cada momento dessa trajetória.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabienne Ferreira, por acreditar no potencial deste projeto, pela orientação criteriosa, pela generosidade em compartilhar seu conhecimento e por abrir portas fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. William Leonardo da Silva, precursor do desenvolvimento da nanopartícula, cuja presença constante e contribuição inestimável foram essenciais para minha formação científica.

Aos professores que gentilmente forneceram as cepas microbiológicas: Profa. Agnes Figueiredo (URFJ), Profa. Jussara Palmeiro, Profa. Izabella da Silva e Prof. Admir José Giachini, todos da UFSC. E àqueles que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho: Profa. Gislaine Fongaro (UFSC) e suas alunas Beatriz Pereira Savi e Catielen Paula Pavi, além do Prof. Diogo Robl (UFSC) e sua aluna Giovanna Amaral Filipe Garcia.

À equipe do LAMEB-UFSC (Laboratório Multiusuário para Estudos de Biologia), pelo acesso ao leitor de placas de espectrofotometria, e ao LAMPB-UFSC (Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos), pelo suporte no uso do espectrofotômetro.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pelo auxílio imprescindível na microscopia eletrônica de varredura, com agradecimentos especiais às professoras Debora Foguel, Marcia Attias e Ayla da Silva Santana (Instituto Nacional de Tecnologia; INT), bem como aos técnicos Luis Otavio da Silva Pacheco e Vânia Vieira.

Ao GPNAP (Grupo de Pesquisa em Nanomateriais Aplicados) da Universidade Franciscana (UFN), pelo fornecimento de materiais e espaço para a síntese das nanopartículas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento da minha bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências (PPGBTC) e à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por proporcionarem a estrutura e as oportunidades essenciais para a realização deste trabalho e para minha evolução acadêmica.

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores desafios para a saúde pública global, pois reduz a eficácia dos tratamentos convencionais, aumentando a morbidade e a mortalidade. Além disso, a formação de biofilmes por microrganismos patogênicos e resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) e *Candida albicans*, agrava ainda mais o cenário, pois as infecções ficam ainda mais difíceis de erradicar e o microrganismo permanece por mais tempo no ambiente. Diante da necessidade de novas estratégias antimicrobianas, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido amplamente estudadas devido à sua potente atividade antimicrobiana e antibiofilme. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de AgNPs biossintetizadas por microrganismos (biogênicas; AgNP B) com AgNPs sintetizadas quimicamente (AgNP Q). Para isso, AgNPs biogênicas foram produzidas utilizando uma bactéria como agente redutor dos íons de prata. A atividade antimicrobiana e antifúngica foi determinada contra diversas cepas e isolados microbianos por ensaios de microdiluição em caldo, para estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM). Além disso, a atividade antibiofilme foi avaliada para MRSA e *C. albicans* por meio de ensaios de inibição e degradação do biofilme, utilizando ensaios *in vitro* em placas de microtitulação. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualizar os efeitos das AgNPs sobre a estrutura do biofilme pré-formado. A atividade virucida também foi avaliada. Os resultados demonstraram que as AgNP B apresentaram maior atividade antimicrobiana e antifúngica em comparação com as AgNP Q, sendo eficazes contra patógenos multirresistentes, como MRSA e *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, em concentrações significativamente menores. Além disso, as AgNP B inibiram de maneira mais eficiente a formação de biofilmes e promoveram uma degradação mais rápida de biofilmes pré-formados. A microscopia eletrônica revelou que as AgNP B causaram redução evidente no número de células bacterianas e da matriz do biofilme. No entanto, não foi observada atividade antivirucida relevante. A maior eficácia das AgNP B contra microrganismos celulares pode estar associada à presença de metabólitos microbianos e proteínas da membrana bacteriana na superfície das nanopartículas, que potencializam sua interação com as células-alvo. Os achados deste estudo destacam o potencial das AgNP B como uma alternativa promissora e mais sustentável, quando comparada às AgNP Q, para o controle de microrganismos resistentes a antibióticos e formadores de biofilme. Essas AgNPs podem ser exploradas no desenvolvimento de novos antimicrobianos e desinfetantes, tanto na área clínica quanto industrial. A nanotecnologia aplicada ao combate à resistência aos antimicrobianos representa um avanço significativo no desenvolvimento de estratégias inovadoras para mitigar os impactos das infecções resistentes, minimizando os efeitos adversos associados a resistência.

Palavras-chave: nanopartícula de prata; nanopartícula biogênica; atividade antimicrobiana; atividade antibiofilme.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the greatest challenges to global public health, as it reduces the effectiveness of conventional treatments, increasing morbidity and mortality. Additionally, biofilm formation by pathogenic and resistant microorganisms, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC), and *Candida albicans*, further exacerbates the situation, making infections even more difficult to eradicate and allowing the microorganism to persist longer in the environment. Given the need for new antimicrobial strategies, silver nanoparticles (AgNPs) have been widely studied due to their potent antimicrobial and antibiofilm activity. In this context, this study aimed to evaluate and compare the antimicrobial and antibiofilm activity of biosynthesized AgNPs (biogenic; AgNP B) with chemically synthesized AgNPs (AgNP C). For this purpose, AgNP B were produced using a bacterium as a reducing agent for silver ions. Antimicrobial and antifungal activity was determined for various microbial strains through broth microdilution assays to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC). Furthermore, antibiofilm activity was evaluated for MRSA and *C. albicans* through biofilm inhibition and degradation assays using in vitro microtiter plate tests. Scanning electron microscopy was employed to visualize the effects of the NPs on microbial cells and biofilm structure. Virucidal activity was also assessed. The results demonstrated that AgNP B exhibited greater antimicrobial and antifungal activity compared to AgNP C, being effective against multidrug-resistant pathogens such as MRSA and KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* at significantly lower concentrations. Moreover, AgNP B more efficiently inhibited biofilm formation and promoted faster degradation of pre-formed biofilms. Electron microscopy revealed that AgNP B caused a noticeable reduction in the number of bacterial cells and the biofilm matrix. However, no relevant virucidal activity was observed. The higher efficacy of AgNP B against cellular microorganisms may be associated with the presence of microbial metabolites and bacterial membrane proteins on the nanoparticle surface, which enhance their interaction with target cells. The findings of this study highlight the potential of AgNP B as a more promising and sustainable alternative, compared to AgNP C, for controlling antibiotic-resistant and biofilm-forming microorganisms. These NPs can be explored for the development of new antimicrobials and disinfectants in both clinical and industrial applications. Nanotechnology applied to combating antimicrobial resistance represents a significant advancement in the development of innovative strategies to mitigate the impact of resistant infections while minimizing the adverse effects associated with resistance.

Keywords: silver nanoparticle; biogenic nanoparticle; antimicrobial activity; antibiofilm activity; antibiofilm activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de <i>S. aureus</i> . Barra de escala = 1 μm	19
Figura 2 – Diferentes morfologias das nanopartículas. (A) amorfa; (B) esférica; (C) triangular e (D) bastonete.....	21
Figura 3 – Metodologia da CIM.....	27
Figura 4 – Metodologia da inibição da formação do biofilme.....	30
Figura 5 – Curva de crescimento das 10 cepas bacterianas utilizadas no estudo.....	38
Figura 6 – Imagens microscópicas obtidas em microscópio invertido em um aumento de 400X dos cultivos dos fungos em meio RPMI1640 a 28°C por 72 horas.....	40
Figura 7 – Gráfico de comparação da atividade antibiofilme entre AgNP B e AgNP Q, em relação ao controle não tratado, na formação de biofilme pela cepa MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923 após 24h de incubação. Os poços de microplacas abaixo das barras mostram os biofilmes formados em cada teste. DO=densidade ótica.....	42
Figura 8 – Gráficos demonstrando a degradação do biofilme em 6 diferentes tempos de contato com as AgNPs B e Q. O gráfico (A) sendo os tempos de 30min, 1h e 1h30min e sido testado apenas na cepa MRSA BMB9393. O gráfico (B) no tempo de 2h, o gráfico (C) no tempo de 4h e o gráfico (D) no tempo de 20h, sendo esses três últimos tempos testados em MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923. DO=densidade ótica.....	44
Figura 9 – Imagens de microscópio eletrônico de varredura (MEV) ilustrando a degradação do biofilme MRSA pré-formado após 4 horas de tratamento com AgNP B (B e E) e AgNP Q (C e F). (A e D) Representa o controle não tratado, mostrando uma estrutura de biofilme intacta. (1) Barra de escala = 1 μm , ampliação de 9,58Kx; (2) Barra de escala = 10 μm , ampliação de 1,20Kx.....	48
Figura 10 – Gráfico de comparação da atividade antibiofilme entre AgNP B e AgNP Q, em relação ao controle não tratado, na formação de biofilme por cepas de <i>C. albicans</i> após 24 horas de incubação. DO=densidade ótica.....	49

Figura 11 – Análise microscópica da atividade virucida da AgNP B. **(A)** Controle celular, com células íntegras e sem tratamento; **(B)** Controle celular com a AgNP B, sem alterações morfológicas aparentes; **(C)** Efeito citopático observado após a adição da AgNP B em células infectadas; **(D)** Controle viral, demonstrando a destruição celular causada pela infecção.....51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resultados das leituras da DO em espectrofotômetro.....	31
Quadro 2 – Inibição do biofilme . Classificação dos biofilmes tratados e não tratados de MRSA BMB9693 e MSSA ATCC25923, de acordo com os valores da DO (densidade ótica). fraca = fracamente aderente; e forte = fortemente aderente.....	42
Quadro 3 – Degradação do biofilme . Classificação dos biofilmes tratados e não tratados de MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923 de acordo com os valores da DO (densidade ótica), onde NA = não aderente; fraco = fracamente aderente; moderado = moderadamente aderente e forte = fortemente aderente.....	45
Quadro anexo – Origem clínica, ano de isolamento e perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas utilizadas no estudo.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) de AgNP B (biogênica) e AgNP Q (química) testadas contra diferentes cepas microbianas e isolados clínicos.....	35
Tabela 2 – Tempo de geração (TG) em minutos e a velocidade de crescimento (VC) das 10 cepas bacterianas utilizadas no estudo.....	38
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) de AgNP B e AgNP Q testada contra diferentes cepas de fungos filamentosos. SI = sem inibição até 312,5 µg/mL de AgNPs.....	40
Tabela 4 – CIMB e CMEB de MRSA BMB9393 após 20 horas de contato com AgNP B.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP	Nanopartícula de Prata
ATCC	American Type Culture Collection
BAP	Biofilm Associated Protein
BDA	Ágar Dextrose de Batata
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme
CMEB	Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme
DLS	Espelhamento Dinâmico de Luz
DO	Densidade Ótica
DRX	Difratometria de Raio X
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESBL	Extended Spectrum Betalactamase
FnBP	Fibronectin Binding-Protein
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GDB	Global Burden of Disease
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva
MHA	Ágar Mueller-Hinton
MHB	Caldo Mueller-Hinton
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NDM-1	New Delhi Metallo-Beta-Lactamase
NPs	Nanopartículas
PBS	Phosphate-Buffered Saline
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USFC	Universidade Federal de Santa Catarina

VRE Vancomycin-Resistant *Enterococcus*
VRSA Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	16
1.2	O BIOFILME BACTERIANO	18
1.3	NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS	21
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	NANOPARTÍCULAS E MICRORGANISMOS	26
3.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
3.2.1	Curva de crescimento.....	28
3.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	29
3.4	ATIVIDADE ANTIBIOFILME	29
3.4.1	Inibição da formação do biofilme de MRSA e MSSA	29
3.4.2	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB).....	31
3.4.3	Inibição da formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	32
3.4.4	Degradação do biofilme pré-formado e Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB)	32
3.4.5	Microscopia eletrônica por varredura (MEV).....	33
3.4.6	Análise estatística.....	34
3.5	ATIVIDADE VIRUCIDA	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	A AgNP B APRESENTA MAIOR ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA EM COMPARAÇÃO COM A AgNP Q.....	35
4.2	A AgNP B EXIBE ATIVIDADE ANTIBIOFILME, PREVENINDO A FORMAÇÃO E DEGRADANDO BIOFILMES PRÉ-FORMADOS.....	41
4.3	AgNPs NÃO REDUZIRAM A REPLICAÇÃO VIRAL EM CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS	51
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO – PERFIS DE RESISTÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Infecções são causadas pela colonização e proliferação de agentes patogênicos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas no organismo humano e em outros seres vivos. Esses microrganismos podem afetar diferentes sistemas e órgãos do corpo, levando a uma variedade de doenças, desde infecções leves até condições potencialmente fatais (LEWNARD; REINGOLD, 2019). Apesar de existir tratamento para uma parcela destas infecções, alguns destes agentes microbiológicos são mais desafiadores, por não serem facilmente controlados por medicamentos ou desinfetantes, como é o caso de bactérias resistentes aos antimicrobianos e microrganismos capazes de formar biofilme (FERNÁNDEZ-BILLÓN *et al.*, 2023; WIESE-POSSELT *et al.*, 2023). Novas moléculas com atividade antimicrobiana e antibiofilme são desejáveis, para ampliar as possibilidades de controle de agentes infecciosos, incluindo os mais desafiadores. Neste sentido, a nanotecnologia é uma área que vem sendo explorada, com potenciais aplicações biotecnológicas, como o desenvolvimento de produtos e processos com benefícios terapêuticos ou industriais (TOLISANDO; DEL BUONO, 2023).

1.1 A PROBLEMÁTICA DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência aos antimicrobianos, dentro de uma ampla gama de agentes infecciosos, é uma ameaça crescente à saúde pública, causando grande preocupação para múltiplos setores, visto que implica em elevadas taxas de morbidade e mortalidade, bem como no aumento dos custos do tratamento, impacto nos procedimentos médicos e industriais e disseminação acelerada da resistência (FREIRES; RODRIGUES JÚNIOR, 2022; WIESE-POSSELT *et al.*, 2023). Os dados de resistência mundial divulgados em um estudo sistemático dos colaboradores do GBD (do inglês: *Global Burden of Disease*) sobre resistência antimicrobiana, estimou 4,71 milhões de mortes associadas e 1,14 milhões de mortes atribuíveis à resistência em bactérias em 2021. Tanto para as mortes associadas como para as mortes atribuíveis à resistência aos antimicrobianos o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA; do inglês: *Methicillin-resistant S. aureus*) foi o que mais aumentou a nível global (NAGHAVI *et al.*, 2024).

A resistência aos antimicrobianos é um problema complexo e multifacetado, influenciado por diversos fatores interligados (BLOOMFIELD *et al.*, 2024). Entre os

principais fatores que contribuem para a resistência bacteriana, podemos destacar: o uso inadequado de antimicrobianos, devido a prática de se automedicar sem a devida orientação médica ou quando utilizados para doenças virais ou em doses incorretas; a prescrição inadequada de antimicrobianos por profissionais de saúde, e a falta de adesão ao tratamento, como não completar o ciclo de antimicrobianos ou o uso de doses em horários irregulares (BENVENGA *et al.*, 2024; DUFF *et al.*, 2024; WIETERS *et al.*, 2024). Ainda, outras causas se relacionam com o aumento da resistência bacteriana, como o uso excessivo de antimicrobianos em animais de produção (como aves, suínos e bovinos); a falta de saneamento básico e de acesso à água potável, que facilita a proliferação de microrganismos e aumenta o risco de infecções; e as mudanças climáticas, que podem exercer influência sobre as características fisiológicas microbianas, contribuindo para melhor adaptação dos microrganismos aos antimicrobianos (MARRANA, 2022; MacFADDEN *et al.*, 2018).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos, com ênfase ao grupo dos patógenos humanos ESKAPE (*Enterobacter aerogenes*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium*), podem ser intrínsecos do microrganismo ou adquiridos por mutação ou transmissão horizontal de material genético, onde elementos genéticos móveis, como por exemplo plasmídeos, são veículos para transferência genética de genes de resistência entre as bactérias (DRALI *et al.*, 2018; MOUANGA-NDZIME *et al.*, 2023). A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ocorrer devido: (1) a degradação enzimática do antimicrobiano, o qual é um dos mecanismos de resistência bacteriano mais frequente. Como exemplo, pode-se citar as enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL; do inglês *Extended Spectrum betalactamases*), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *new delhi metallo-beta-lactamase* (NDM-1), que são capazes de degradar diversos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas; (2) à diminuição da permeabilidade da membrana, devido principalmente à diminuição da expressão de porinas, que são proteínas transmembranas associadas ao transporte de moléculas através da membrana bacteriana, onde, neste caso, o antimicrobiano não consegue penetrar no citoplasma bacteriano na concentração necessária para sua ação; (3) à atividade de efluxo, exercida por bombas de efluxo, que são proteínas transmembranas capazes de transportar (“bombear”) antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular,

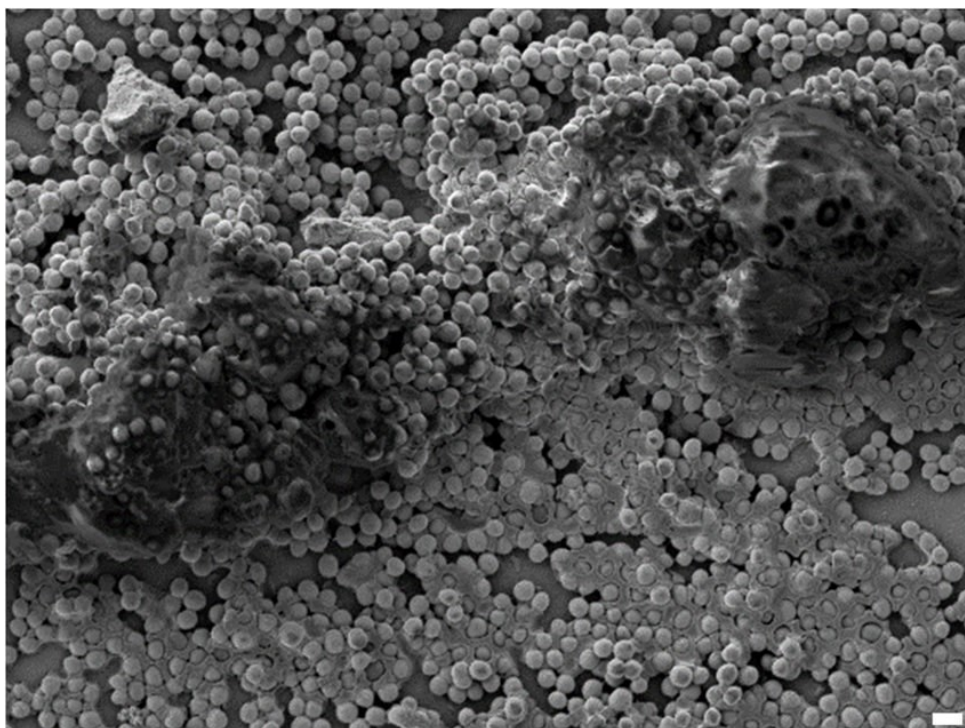
fazendo com que a droga não alcance concentrações efetivas no citoplasma bacteriano, e (4) alteração de sítio alvo, que é quando há alteração do local-alvo onde atua determinado antimicrobiano, de modo a impedir a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, que ocorre em *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE; do inglês: *Vancomycin-resistant Enterococcus*) (COSTA, 2019; OTEO; ARACIL, 2015). Este último mecanismo ocorre também em MRSA, devido a presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina alternativa, denominada PBP2a, que apresenta baixa afinidade de ligação por antibióticos beta-lactâmicos. Assim, a bactéria utiliza esta PBP2a para sintetizar as ligações cruzadas das unidades de peptidoglicana da parede celular, mesmo na presença de beta-lactâmicos (CASCIOFERRO *et al.*, 2020). Apesar do nome metilicilina, MRSA é resistente a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos, com exceção de cefalosporinas de 5ª geração em diante (AHMED; BAPTISTE, 2018; STOGIOS; SAVCHENKO, 2020). Uma das últimas linhas de tratamento contra infecções por MRSA são os glicopeptídeos, como a vancomicina. No entanto, há diversos relatos na literatura de isolados resistentes também à vancomicina, conhecidos como VRSA (do inglês: *Vancomycin-resistant S. aureus*) (CAMERON *et al.*, 2016). Assim, alternativas para o tratamento de MRSA são extremamente necessárias (MASIMEN *et al.*, 2022).

1.2 O BIOFILME MICROBIANO

O biofilme microbiano constitui uma comunidade de células bacterianas ou fúngicas complexa (figura 1). Estas células estão em grande quantidade, fortemente aderidas entre si e a uma superfície, e embebidas em outras moléculas (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021; FERNÁNDEZ-BILLÓN *et al.*, 2023). A estrutura do biofilme é constituída por, além de células microbianas aderidas, água, matriz de polímeros extracelulares (fibronectina, colágeno, elastina, etc) e moléculas retidas diversas (ex.: DNA) (EDWARD *et al.*, 2023). Infecções relacionadas a biofilme estão comumente associadas a utilização de dispositivos médicos implantáveis, como cateteres, sondas e próteses, uma vez que microrganismos podem aderir a estes dispositivos. Em geral, a formação de biofilme em um destes dispositivos requer a remoção do mesmo, pois o biofilme reduz a suscetibilidade microbiana a agentes antimicrobianos e às defesas imunológicas, complicando a erradicação de infecções relacionadas a ele (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021). Diversas bactérias de importância clínica são capazes de produzir biofilme, incluindo *S. aureus*, *Escherichia coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

Estes biofilmes estão relacionados principalmente a cronificação de infecções, em diversos contextos clínicos (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021). Adicionalmente, o biofilme produzido no ambiente pode ter impacto negativo nas indústrias (ex.: biofilme em tubulações industriais) e nos locais de atendimento à saúde (ex.: biofilme superfícies e equipamentos hospitalares), aumentando a problemática (RATHER; GUPTA; MANDAL, 2021; EDWARD *et al.*, 2023). Estudos evidenciam que biofilme de *S. aureus* pode persistir em superfícies hospitalares por até 5 meses, e biofilme de *P. aeruginosa* pode sobreviver por até 4 semanas em superfícies de aço inoxidável, mesmo após a aplicação de desinfetantes hospitalares comuns (ABDALLAH *et al.*, 2014; CENTELEGHE *et al.*, 2022). A persistência de biofilmes em superfícies e utensílios hospitalares aumenta o risco de infecções nosocomiais, especialmente em pacientes imunossuprimidos. A resistência de biofilmes a métodos tradicionais de limpeza e desinfecção exige o desenvolvimento de novas estratégias de controle, como o uso de agentes antimicrobianos inovadores e métodos de desinfecção mais eficazes (WEBER *et al.*, 2023).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *S. aureus*. Barra de escala = 1 μ m



Fonte: LAMRET *et al.* 2020.

S. aureus é uma das espécies bacterianas mais frequentemente associada a infecções relacionadas à formação de biofilme. (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; TAHAEI *et al.*, 2021). Em *S. aureus*, diversos fatores bacterianos já foram relacionados com a capacidade de formar biofilme, como as proteínas de ligação a fibronectina (FnBP; do inglês *fibronectin binding-protein*), o DNA extracelular, a proteína BAP (do inglês: *biofilm associated protein*) e moléculas de adesão codificadas pelo operon *ica* (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; KHASAWNEH *et al.*, 2020; LESHEM *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2023). A matriz do biofilme apresenta uma barreira física para a penetração dos antimicrobianos e mediadores imunológicos. Adicionalmente, no ambiente de biofilme, as células de *S. aureus* são encontradas em diferentes estágios metabólicos, incluindo estágios de inatividade metabólica ou *persisters* (células em estado de persistência, um tipo de resistência), fazendo com que não sejam afetadas adequadamente por antimicrobianos ou por mecanismos do sistema imunológico (FIGUEIREDO *et al.*, 2017; RICHTER *et al.*, 2020). A adesão das bactérias em um biofilme também possibilita o contato célula-a-célula, facilitando a troca genética, podendo estar associada a disseminação de genes de resistência por mecanismos de transferência horizontal de genes (SHREE *et al.*, 2023).

A resistência aos antimicrobianos não se limita às bactérias, e afeta um amplo espectro de patógenos, incluindo fungos com impactos significativos na saúde pública (KHAN *et al.*, 2020; RATHER *et al.*, 2021). Fungos, especialmente *Candida* sp. e *Aspergillus* sp., apresentam resistência crescente a antifúngicos (RATHER *et al.*, 2021), dificultando o tratamento de infecções, particularmente em pacientes imunocomprometidos.

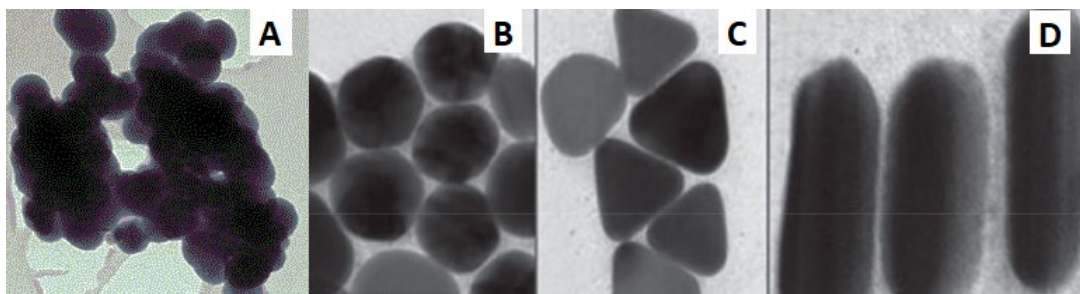
Adicionalmente, fungos como *Candida albicans*, podem formar biofilmes em dispositivos médicos e superfícies hospitalares, contribuindo para a persistência das infecções e aumentando o risco de complicações (RAI; GUPTA, 2019). A matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* é predominantemente composta por 55% de proteínas, 25% de carboidratos, 15% de lipídios e DNA extracelular, contribuindo para sua estabilidade. Proteínas plasmáticas, como albumina e fibrinogênio, podem atuar como intermediárias na adesão de microrganismos do biofilme a cateteres colonizados. No entanto, entre os componentes celulares presentes, a levedura representa a fração mais significativa, contribuindo diretamente para a densidade e a formação do biofilme, onde os polissacarídeos ligados a β -1,6-glucana desempenham

um papel essencial na organização estrutural da matriz (HERNANDEZ-CUELLAR *et al.*, 2022).

1.3 NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS

A nanotecnologia tem se destacado como uma área de crescente importância, especialmente devido ao interesse nas nanopartículas (NPs) biogênicas, que possuem grande potencial na prevenção de infecções e outras aplicações biotecnológicas (TOLISANDO; DEL BUONO, 2023). Essa tecnologia abrange a produção, manipulação e utilização de materiais nanoestruturados, como as NPs, que possuem dimensões entre 10 e 100 nm. Essas partículas podem ser sintetizadas por métodos físicos, químicos ou biológicos, apresentando diferentes morfologias, como amorfa, esférica, triangular ou bastonete (figura 2). Suas propriedades, como estabilidade e tamanho, são diretamente influenciadas pelo método de síntese empregado (NISAR *et al.*, 2019). NPs biogênicas têm aplicações promissoras em catálise, sensores, remediação ambiental e ciência dos materiais (MAHAWAR *et al.*, 2023). Na medicina, elas são exploradas para diagnóstico, terapia, liberação controlada de medicamentos e aplicações em curativos para promover a cicatrização de feridas (EGHBALIFAM; SHOJAOSADATI; HASHEMI-NAJAFABADI, 2023; GAREEV *et al.*, 2022). Na área de energia, sua estrutura única e propriedades de transporte de elétrons estão sendo aproveitadas para melhorar a eficiência e a sustentabilidade de dispositivos energéticos (PATIL *et al.*, 2023).

Figura 2 – Diferentes morfologias das nanopartículas. **(A)** amorfa; **(B)** esférica; **(C)** triangular e **(D)** bastonete.



Fonte: ARAÚJO *et al.* 2019; DURÁN *et al.* 2018.

Essas NPs biogênicas são produzidas por organismos vivos ou derivadas de materiais biológicos, como plantas, bactérias, fungos e algas. Este tipo de NP é formada naturalmente, como resultado de processos bioquímicos complexos, e

oferecem vantagens únicas, devido às suas propriedades especiais (DAS; KARANKAR, 2019). A síntese biológica de NPs apresenta uma série de vantagens em comparação com os métodos tradicionais físico-químicos de síntese de NPs, que envolvem o uso de produtos químicos tóxicos. Os processos biológicos de produção das NPs são frequentemente mais sustentáveis (impacto reduzido ao ambiente), além de permitir um melhor controle sobre a forma, tamanho, composição, estabilidade coloidal, dispersão uniforme e menor aglomeração das NPs (DAS; KARANKAR, 2019; GHORBANI, 2013).

NPs biogênicas podem exibir atividade antimicrobiana tanto individualmente quanto em combinação com agentes antimicrobianos já conhecidos, como alguns metais (ex.: prata). Os microrganismos possuem mecanismos de formação de NPs muito específicos e as etapas são a captura de íons de ferro do meio ambiente e a precipitação em mineral de ferro dentro de projeções intracitoplasmáticas ou vesículas formadas a partir da membrana plasmática bacteriana, onde serão reduzidos por agentes redutores em diferentes formas e tamanhos de NPs (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021; PATEL, *et al.*, 2020). Os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana dessas NPs combinadas com metais incluem: (a) produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro dos microrganismos, que podem inibir enzimas e processos metabólicos; e (b) danos às membranas plasmáticas microbianas, envolvendo acúmulo de íons metálicos, atração eletrostática entre NPs e células microbianas, e a ruptura de enzimas vitais na cadeia respiratória (HUH; KWON, 2011; NISAR, 2019).

Enquanto a resistência bacteriana a antimicrobianos é bem documentada, o desenvolvimento de resistência a nanopartículas de prata (AgNP) permanece pouco investigado. O estudo de Panáček e colaboradores (2017) mostrou que cepas de bactérias Gram-negativas, como *E. coli* O13, *P. aeruginosa* CCM 3955 e *E. coli* O CCM 3954, podem adquirir resistência após exposições repetidas. Esse processo ocorre devido à produção de flagelina, uma proteína do flagelo com habilidade de adesão, que provoca a agregação das NPs. A resistência surge por alterações fenotípicas, sem modificações genéticas, reduzindo a estabilidade coloidal das NPs e comprometendo sua eficácia antibacteriana.

Segundo Quinteros e colaboradores (2019), as AgNPs sintetizadas por bactérias demonstraram maior atividade antibacteriana, quando comparadas com as

sintetizadas pela via química. A hipótese que justifica este achado é de que há uma biocompatibilidade entre a NP e a célula microbiana, facilitando a interação, diretamente relacionada a atividade observada. O envelope de membrana natural encontrado nas NPs biogênicas melhora as características de biocompatibilidade, reduzindo a toxicidade contra células humanas e animais e ao meio ambiente (CORREA; PRESCILIANO; ABREU, 2021). Chuy e colaboradores (2022) demonstraram que as AgNP biossintetizadas por uma cepa de *K. quasipneumoniae* apresentou atividade antibacteriana maior, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) menores, quando comparadas a AgNP sintetizadas pelo extrato de *Aloe vera* em cepas de KPC.

Adicionalmente, foi relatado que as NPs biogênicas podem superar os problemas de resistência aos antibióticos associados à formação de biofilme bacteriano, pois não apenas os destroem, mas também diminuem as doses de antimicrobianos necessárias, quando administradas em combinação com as NPs (DAS; KARANKAR, 2019; SINGH *et al.*, 2020). Quando essas NPs penetram na membrana celular do biofilme, danificam a estrutura celular e alteram sua fisiologia, pois enzimas proteicas, polissacarídeos e lipídios presentes na matriz se rompem (SHIVASHANKAR, 2021).

No estudo de Chuy e colaboradores (2022), uma AgNP biogênica foi obtida. Resumidamente, uma cultura da cepa *K. quasipneumoniae* ATCC700603 foi cultivada em caldo Mueller-Hinton (MHB; Kasvi®, Brasil) e incubada por 18h a 37°C. A cultura foi adicionada a uma solução contendo o precursor metálico nitrato de prata (AgNO_3 99,9%, Sigma-Aldrich®, EUA) na proporção 1% (v/v). A solução foi colocada sob radiação visível (75 W/30 min), e a mudança de coloração para marrom sugeriu a formação de AgNPs. A solução foi, então, colocada em banho-maria (56°C por 30 min), para que ocorresse precipitação das NPs e, em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi seco (60°C por 24 h) e rotulado como AgNP B.

A AgNP B foi caracterizada por difratometria de raio X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS) e por espalhamento dinâmico de luz (DLS; do inglês: *Dynamic Light Scattering*), em que foram identificadas características e pureza da amostra, conforme descrito por Chuy e colaboradores (2022).

A problemática das infecções causadas por diversos agentes microbiológicos, incluindo os agentes mais desafiadores, como bactérias e fungos resistentes aos antimicrobianos e produtores de biofilme, exige o desenvolvimento de novas alternativas para controlá-los. A AgNP biogênica anteriormente desenvolvida (AgNP B) apresentou atividade antimicrobiana contra uma cepa de bactéria de importância clínica, e resistente aos antimicrobianos, *K. pneumoniae* produtora de KPC (CHUY *et al.*, 2022). Assim, no presente estudo, ampliou-se o estudo da atividade antimicrobiana anteriormente observada para outros agentes infecciosos, como outras espécies de bactérias resistentes a antibióticos, fungos e vírus de importância clínica. A atividade antibiofilme também foi estudada para MRSA e *C. albicans*. Uma vez que as AgNPs biogênicas apresentam vantagens quando comparadas a NPs sintetizadas quimicamente, este estudo demonstrou o potencial para futuras aplicações biotecnológicas mais sustentáveis, como o desenvolvimento de produtos e processos com benefícios terapêuticos ou industriais, como por exemplo um desinfetante hospitalar eficaz e mais sustentável que os encontrados no mercado atual.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de AgNPs biossintetizadas a partir de microrganismos (AgNP B; biogênica) com as AgNPs sintetizadas pela via química (AgNP Q).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antimicrobiana das AgNP B e AgNP Q frente à cepas padrões e isolados clínicos de bactérias de importância clínica;
- Avaliar a capacidade das AgNP B e AgNP Q em inibir a formação do biofilme de *S. aureus* e *C. albicans*;
- Avaliar a capacidade das AgNP B e AgNP Q em destruir o biofilme pré-formado de cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a atividade antifúngica das AgNP B e AgNP Q frente a levedura *C. albicans* e espécies de fungos filamentosos: *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.
- Avaliar a atividade virucida das AgNP B e AgNP Q frente ao Adenovírus;
- Comparar as atividades antimicrobiana e antibiofilme da AgNP B e AgNP Q.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 NANOPARTÍCULAS E MICRORGANISMOS

A AgNP biogênica (AgNP B) foi obtida do estudo de Chuy e colaboradores (2022). A AgNP química (AgNP Q) foi sintetizada conforme Pratheesya e colaboradores (2019), adicionando-se uma solução de borohidreto de sódio (NaBH_4 , Sigma-Aldrich®, EUA) em banho de gelo, e sob agitação magnética por 15 min a uma solução de AgNO_3 99,9% (taxa de 1 gota/s).

Os isolados clínicos bacterianos avaliados neste estudo incluem isolados de MRSA previamente caracterizados em um estudo anterior de nosso grupo de pesquisa (DOMINSKI *et al.*, 2018). A cepa de MRSA BMB9393 (COSTA *et al.*, 2013) foi gentilmente fornecida pela Prof^a. Agnes Figueiredo (UFRJ), e um isolado clínico de *K. pneumoniae* produtora de KPC, doado pela Prof^a. Jussara Palmeiro (UFSC). Além disso, foi incluída uma cepa clínica multirresistente de *P. aeruginosa*, gentilmente doada pela Prof^a. Izabella da Silva (UFSC), juntamente com *P. aeruginosa* ATCC9027, *K. quasipneumoniae* ATCC700603 e *S. aureus* ATCC25923 doadas pelo Prof. Admir José Giachini (UFCS) e *C. albicans* ATCC14053, doada pela Prof^a. Jussara Palmeiro (UFSC), além da cepa *C. albicans* ATCC10231, doada pelo Prof. Diogo Robl (UFSC). Todos os isolados e cepas são armazenados a -80°C em glicerol a 10% (p/v). O perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados clínicos utilizados no estudo, incluindo origem clínica e ano de isolamento, são apresentados no quadro anexo.

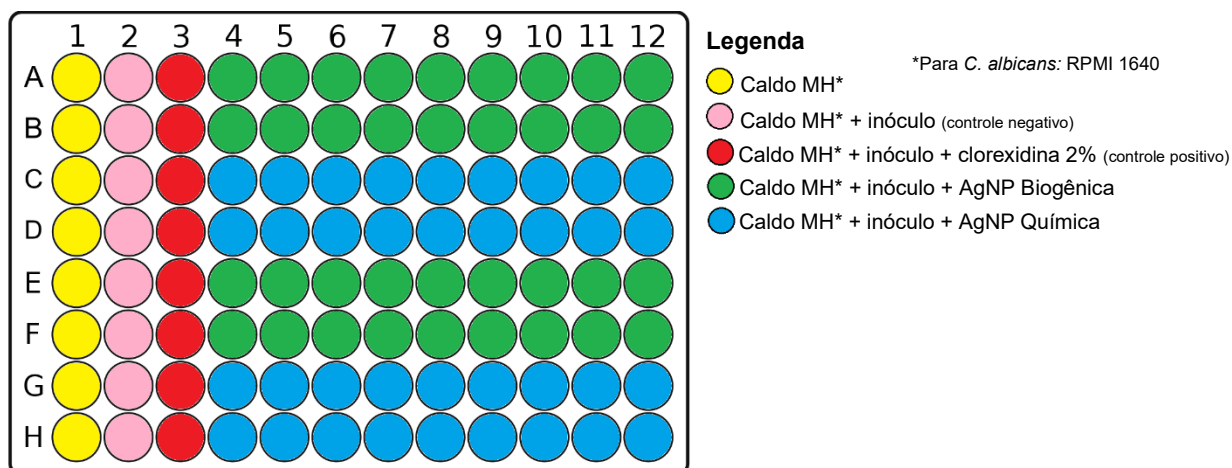
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas através do método de microdiluição em placas de microtitulação, seguindo as diretrizes preconizadas pelo BrCAST (2023). Inicialmente, os estoques das cepas foram inoculados pela técnica de esgotamento em placas de ágar Mueller Hinton (MHA; Kasvi®, Brasil) e incubadas por 18-20h à 37°C , para garantir a pureza da cultura. Em seguida, suspensões contendo os microrganismos foram preparadas, individualmente, em caldo Mueller-Hinton (MHB; Kasvi®, Brasil), e caldo RPMI 1640 (Merck®, Alemanha) para as *C. albicans*. As suspensões de células microbianas foram padronizadas para escala de 0,5 McFarland (correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias e $1,5 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ células/mL para leveduras) e, em seguida, os inóculos bacterianos e fúngicos foram

diluídos em caldo MHB/RPMI no fator 1:20, e inoculados nos poços da placa, conforme a figura 3, em duplicata. Foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno de fundo plano (Eppendorf®, Alemanha).

Diluições seriadas (no fator 1:2) da solução com AgNP B e da AgNP Q foram realizadas em um volume de 100µL de MHB/RPMI, a partir da 4ª coluna de poços (figura 3). Foi adicionado um volume de 100 µL das AgNPs B e Q ao caldo MHB/RPMI, com a concentração testada variando de 312,5 µg/mL a 1,22 µg/mL. A partir da 2ª coluna de poços da placa, um volume de 10 µL dos inóculos bacterianos/fúngicos foi adicionado. A 1ª coluna de poços indicou o controle de esterilidade do meio, possuindo apenas MHB/RPMI, a 2ª coluna de poços indicou o controle negativo, sendo adicionado MHB/RPMI e um volume de 10µL do inóculo bacteriano/fúngico, a 3ª coluna de poços indicou o controle positivo, adicionando MHB/RPMI, um volume de 10µL do inóculo bacteriano/fúngico e uma solução contendo clorexidina 2% (p/v). As placas foram incubadas por 24h a 37 ± 2 °C, em condições aeróbias, e com agitação de 200rpm.

Figura 3 – Metodologia da CIM.



Fonte: elaborado pela autora

A leitura da CIM foi realizada de forma visual, de acordo com a turvação visível dos poços, sendo a CIM definida como a menor concentração do composto que não apresentaram turvação. A CBM foi determinada espalhando na superfície das placas de MHA 10µL do conteúdo dos poços das três primeiras concentrações que não apresentaram turvação visível, e nas duas primeiras concentrações que apresentaram turvação visível. As placas foram incubadas por 18-24h a 37 ± 2 °C em condições aeróbias, e verificadas quanto ao crescimento visível. A menor concentração do

composto que não apresentou nenhum crescimento visível em placa foi considerada a CBM/CFM.

3.2.1 Curva de crescimento

A fim de comparar o padrão de crescimento entre as cepas bacterianas utilizadas no estudo e determinar o estágio metabólico em que se encontram, realizou-se um ensaio de cinética para obter a curva padrão de crescimento de cada uma das amostras, seguindo a metodologia de Wang e colaboradores (2019). No primeiro dia, as amostras foram semeadas por esgotamento em MHA, e as placas foram incubadas a 37°C por 16-18h. No segundo dia, as colônias isoladas foram ressuspensas em solução salina estéril (0,85%), padronizando a densidade celular para escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, a diluição foi realizada na proporção de 1:1000 em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*; Kasvi®, Brasil). Foi pipetado um volume de 200 µL de cada amostra diluída em placas de 96 poços, sendo cada amostra pipetada em quadruplicata e selada com papel filme. A placa foi incubada a 37°C por 18h, com intervalos de agitação branda (em torno de 150 rpm). A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada a cada 60 minutos, em 600 nm, utilizando uma multileitora de placas sob agitação e temperatura de 37°C. A confecção dos gráficos de curva de crescimento foi realizada no programa Excel (Microsoft®) e os valores finais representam as médias das quadruplicatas técnicas e da duplicata biológica.

Para definir o tempo de geração de cada cepa utilizou-se duas fórmulas: na primeiro os dados da DO obtidos partir da leitura no espectrofotômetro foram transformados em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) utilizando a seguinte equação, onde x corresponde a DO a ser convertida:

$$\text{UFC/mL} = \frac{1,5 \times 10^8 \cdot x}{0,1}$$

E a segunda fórmula, foi usada para obter o tempo de geração (TG) em minutos. Os cálculos foram realizados considerando a fase log da curva de crescimento, através da conversão dos dados UFC/mL em *log*, conforme a equação abaixo, onde “N” é o número de células final, “No” é o número de células iniciais e t o tempo (60 minutos):

$$TG = \frac{\log 2}{\log N - \log N_0} \cdot t$$

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os testes seguiram as diretrizes do EUCAST (2022) e foram realizados em colaboração com o Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB) da UFSC, sob coordenação do Prof. Diogo Robl. Foram selecionados quatro isolados fúngicos de interesse para carcinocultura, saúde humana e conservação pós-colheita: *F. oxysporum* MUCL909, *A. niger* DR02, *A. alternata* CCT2816 e *R. stolonifer* CCT0276. Os fungos foram cultivados em ágar dextrose de batata (BDA; Kasvi®, Brasil) a 28°C até atingirem esporulação abundante. Os esporos foram coletados com solução estéril de Tween 20 (0,1%), filtrados para remoção de hifas, e ajustados para uma concentração de $2-5 \times 10^7$ esporos/mL. As suspensões foram armazenadas a -80 °C em glicerol 30% e peptona 0,1% até o momento de uso. Os testes de CIM foram realizados em placas de 96 poços, com inóculos contendo $1-2 \times 10^5$ esporos/mL em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e 2% (p/v) de glicose. As AgNPs B e Q foram testadas em concentrações de 312 a 1,21 µg/mL, com anfotericina B como controle positivo. Após incubação a 28°C por até 72 horas, a germinação dos esporos e a morfologia das hifas foram analisadas utilizando o microscópio invertido Olympus CKX53®, com aumento de 400x. Para confirmar o efeito fungistático ou fungicida, os poços sem crescimento foram inoculados em meio BDA e incubados por sete dias a 28°C.

3.4 ATIVIDADE ANTIBIOFILME

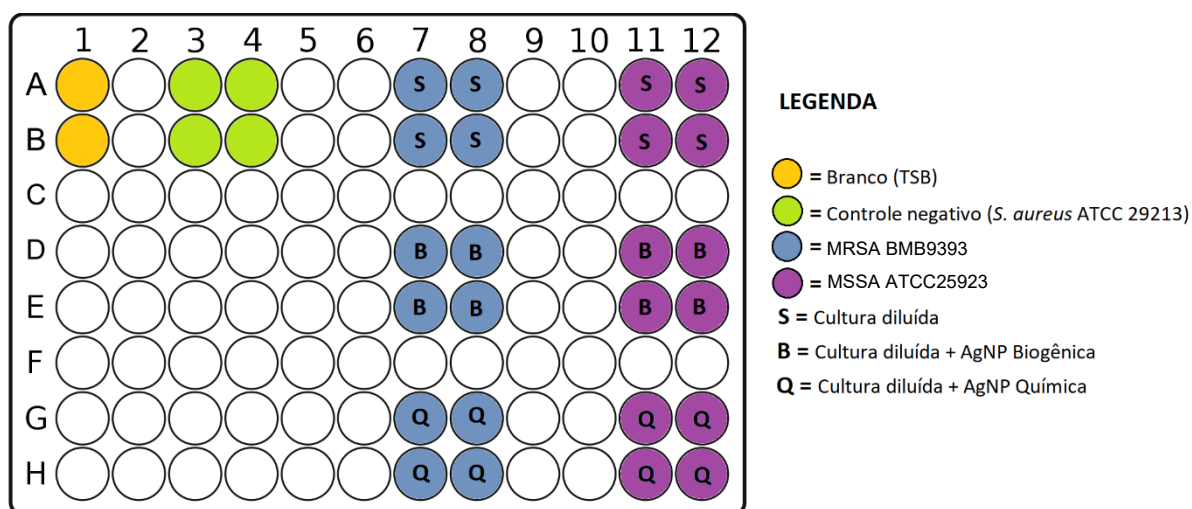
3.4.1 Inibição da formação do biofilme de MRSA e MSSA

Para realizar o ensaio de inibição da formação do biofilme, foram selecionadas uma cepa clínica de MRSA (BMB9393) e uma cepa de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA; do inglês: *Methicillin-sensitive S. aureus*) ATCC25923, ambas fortemente produtoras de biofilme (FERREIRA *et al.*, 2012; NEOPANE *et al.*, 2018). Para estimar de forma quantitativa a formação de biofilme, foi utilizado o ensaio *in vitro* em placa de microtitulação, de acordo com Ferreira e colaboradores (2012). Placas de microtitulação de 96 poços de poliestireno e com fundo chato (Eppendorf®, Alemanha) foram utilizadas. Inicialmente, os estoques das cepas foram inoculados pela técnica

de esgotamento em ágar em placas de MHA, por 18-20h à 37°C. Em seguida, uma unidade formadora de colônia (UFC) isolada foi inoculada em caldo TSB e incubadas a 37°C por 18-20h, sob agitação (200rpm). As culturas líquidas foram diluídas 1:100 (v/v) em TSB com glicose 1% (p/v) em quadriplicata, e adicionadas aos poços da placa de 96 poços. As soluções de AgNPs B e Q foram misturadas às bactérias imediatamente após a inoculação das mesmas na placa, de modo a verificar se as AgNPs iriam inibir a formação de biofilme. A solução contendo as AgNPs foram preparadas em concentrações sub-inibitórias abaixo da CIM, de modo a não matar as bactérias.

Foi adicionado um controle da esterilidade do meio (poços A1 e B1), um controle negativo (*S. aureus* ATCC29213; cepa não produtora de biofilme) e controles experimentais, que foram as cepas de MRSA e MSSA sem o tratamento das AgNPs, conforme figura 4 (representados pela letra S). As placas foram incubadas por 20h a 37 ± 2 °C em condições aeróbias, sem agitação.

Figura 4 – Metodologia da inibição da formação do biofilme.



Fonte: elaborado pela autora

Após incubação, a DO do crescimento microbiano foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm. Em seguida, o sobrenadante da placa foi removido, e os poços foram lavados delicadamente 2x com solução salina (NaCl 0,85%; p/v) estéril. As células no biofilme foram fixadas em uma temperatura de 65-70°C, por cerca de 2h. Após secagem, um volume de 200µL de solução de cristal violeta (Newprov®, Brasil) foi adicionado em cada poço da placa e,

após 1 minuto, as placas foram novamente lavadas 3x com água destilada. Após nova secagem (65-70°C por 1h), a DO do biofilme formado em cada poço da placa foi novamente determinada em espectrofotômetro (540 nm). A atividade antibiofilme foi estudada comparando a DO do biofilme formado nos poços controle com a DO do biofilme formado na presença de AgNPs.

O biofilme foi calculado conforme equação (FERREIRA *et al.*, 2012):

$$\text{Unidade de Biofilme (UB)} = \frac{\text{Valor da leitura 2 (biofilme corado)}}{\text{Valor da leitura 1 (crescimento)}}$$

E os resultados foram considerados de acordo com o quadro 1:

Quadro 1 – Resultados das leituras da DO em espectrofotômetro.

DO < ou = 0,24	Não aderente
0,25 > DO < 0,45	Fracamente aderente
0,46 > DO < 0,91	Moderadamente aderente
DO > ou = 0,92	Fortemente aderente

Fonte: elaborado pela autora

3.4.2 Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB)

A concentração mínima de AgNPs B e Q necessárias para inibir 50% da formação de biofilme (CIMB₅₀) e 80% da formação de biofilme (CIMB₈₀) foi determinada de acordo com metodologias descritas anteriormente (KASPAROVÁ *et al.*, 2021; YAP *et al.*, 2023). Para determinar a CIMB, seis concentrações de AgNP B abaixo da CIM foram diluídas em série (1:2) e testadas em placas de 96 poços, conforme o método descrito no item 3.4.1. As placas foram incubadas por 18-20h a 37°C e a DO do crescimento microbiano foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 570 nm. Os biofilmes bacterianos não tratados serviram como grupo controle, representando 0% de inibição do biofilme.

A porcentagem de biofilme foi calculada usando a seguinte equação, descrita anteriormente (YAP *et al.*, 2023):

$$\% \text{ Biofilme} = \frac{(\text{DO grupo controle} - \text{DO amostra})}{\text{DO grupo controle}} \cdot 100$$

3.4.3 Inibição da formação de biofilme de *C. albicans*

A atividade de inibição de biofilmes de *C. albicans* ATCC14053 e ATCC10231 foi avaliada em presença de AgNP B e Q, seguindo metodologias descritas anteriormente (PIERCE *et al.* 2008; GULATI *et al.* 2018; ABOUALIGALEHDARI *et al.*, 2016).

No primeiro dia, as cepas foram semeadas por esgotamento em placas de MHA e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. No segundo dia, de oito a dez colônias isoladas das placas foram transferidas para um volume de 20 mL de caldo MHB, e incubadas sob agitação a 180 rpm por 18 a 24 horas até o crescimento maciço. No terceiro dia, as células foram centrifugadas a 3000 g por cinco minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento (*pellet*) ressuscitado em um volume de 20 mL de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) gelado e estéril, seguido de vórtex vigoroso até completa solubilização. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em um volume de 5 mL de RPMI 1640 pré-aquecido a 37°C. A partir desta suspensão, foi feita a padronização para escala 0,5 de McFarland, sendo a cultura posteriormente diluída na proporção 1:100. Em placas de 96 poços, um volume de 200 µL das culturas diluídas foi adicionado a cada poço, juntamente com as AgNPs nas concentrações previamente determinadas abaixo da CIM, além dos controles de RPMI 1640 puro e cultura sem AgNPs. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas sem agitação. No quarto dia, o sobrenadante foi cuidadosamente removido com pipeta, sem tocar no fundo dos poços, seguido de três lavagens delicadas com solução salina para remover células não aderidas. A placa foi, então, invertida sobre papel absorvente por 45 minutos em temperatura ambiente, para remoção do excesso de solução. Em seguida, um volume de 200 µL de cristal violeta foi adicionado a cada poço, e, após 45 minutos, o corante foi descartado. Cada poço foi lavado pelo menos quatro vezes com água destilada estéril até que os poços brancos (somente com meio) estivessem limpos. Posteriormente, um volume de 200 µL de etanol a 95% foi adicionado a cada poço por 45 minutos, sendo um volume de 100 µL transferido para uma nova placa para leitura da densidade ótica a 595 nm.

A capacidade de formação de biofilmes foi analisada comparando-se a absorbância das amostras com a do controle positivo de *C. albicans* formador de biofilme, sendo a formação classificada como fortemente aderente ($\geq 75\%$ da

biomassa do controle), moderadamente aderente (25-74%) ou fraca ($\leq 24\%$) (ABOUALIGALEHDARI *et al.*, 2016).

3.4.4 Degradação do biofilme pré-formado e Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB)

Para avaliar o potencial de degradação do biofilme pelas AgNPs, os biofilmes de MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923 foram estabelecidos em placas de 96 poços, conforme descrito no item 3.4.1. Em seguida, seguiu a metodologia conforme o protocolo de Haney, Trimble e Hancock (2021). Resumidamente, após o biofilme ser formado por 20h, o sobrenadante foi removido, e o biofilme lavado delicadamente para retirar as células não aderidas. Foi adicionado um volume de 100 μ L das AgNPs B e Q, separadamente, em concentrações iguais a CIM. As AgNPs foram adicionadas aos poços delicadamente, por gotejamento na lateral dos poços da placa. As placas foram novamente incubadas por 30min, 1h, 1h30min, 2h, 4h e 20h à 37°C e os procedimentos posteriores de leitura do biofilme foram iguais aos citados no item 3.4.1.

Para determinar o CMEB, seis concentrações de AgNP B abaixo da CIM foram diluídas serialmente e testadas em placas de microtitulação de 96 poços, conforme descrito acima, com incubação por 20 h a 37°C. O CMEB₅₀ foi identificado como a menor concentração de AgNP B que causou uma redução de 50% nas células do biofilme, enquanto o CMEB₈₀ causou uma redução de 80%.

3.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As alterações morfológicas na estrutura do biofilme de MRSA BMB9393 foram observadas por microscópio eletrônico de varredura Zeiss FIB-SEM Auriga 40® de acordo com Portes e colaboradores (2020). Este experimento foi realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em colaboração com as pesquisadoras Débora Foguel e Márcia Attias.

Resumidamente, o biofilme foi crescido conforme descrito no item 3.4.1 em lâminulas redondas estéreis, tratadas com 0,1% de poli-L-lisina e incubado por 24h à 37°C. Após formado, as AgNPs B e Q foram adicionadas e incubadas por 4h, junto com o grupo controle sem tratamento. As amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão cacodilato 0,1M por 2h.

Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M e pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio com 2,5% de ferrocianeto de potássio e lavadas novamente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de etanol e secas em ponto crítico em CO₂ líquido em um aparelho Leica EM CPD300, e submetidas ao *sputtering* de uma camada de platina de 2 nm de espessura no equipamento Quorum Q150V Plus.

3.4.6 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando two-way ANOVA, seguida pelo teste t de Student, no GraphPad Prism 10.4.1 (GraphPad Software, Inc., <https://www.graphpad.com>).

3.5 ATIVIDADE VIRUCIDA

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de virologia aplicada, coordenado pela Profa. Gislaine Fongaro da UFSC. Antes de realizar o ensaio virucida, a citotoxicidade das amostras de AgNPs B e Q foram avaliadas usando o ensaio colorimétrico de sulforodamina B (PAVI *et al.*, 2023). Para isso, foram utilizadas placas de cultura de 96 poços contendo a linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar humano (A549). A atividade virucida foi avaliada pelo método quantitativo de suspensão, de acordo com a norma europeia DIN EN 14476 (<https://www.din.de/en>), utilizando uma cepa de Adenovírus Humano Tipo 5 propagada na linha celular A549/ATCC. O teste foi realizado na presença de AgNP B e Q, comparando a quantidade de vírus nas células expostas e não expostas à substância (MICHELON *et al.*, 2022). Para controle interno, poços também foram deixados na placa de cultura celular para controle celular (sem amostras adicionadas) e controle viral (somente a suspensão viral adicionada) (PAVI *et al.*, 2023). As concentrações das AgNPs testadas foram: 30µg/mL, 15µg/mL, 7,5µg/mL, 3,75µg/mL, 1,88µg/mL, 0,94µg/mL, 0,47µg/mL, 0,22µg/mL e 0,11µg/mL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 A AgNP B APRESENTA MAIOR ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA EM COMPARAÇÃO COM A AgNP Q.

AgNP B demonstrou atividade antimicrobiana em concentrações mais baixas (2,44 µg/mL – 19,53 µg/mL) contra bactérias susceptíveis e resistentes a antibióticos, em comparação com AgNP Q (39,06 µg/mL – 156,25 µg/mL), apoiando a hipótese de biocompatibilidade (QUINTEROS *et al.*, 2019), conforme mostrado na tabela 1. As cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e MRSA 16007 apresentaram os menores valores de CIM/CBM para AgNP, indicando maior sensibilidade, enquanto MRSA 17030 e *K. pneumoniae* KPC+ exibiram os maiores valores de CIM/CBM para AgNP.

Com relação às cepas de *C. albicans*, AgNP B demonstrou menor CIM (39,06 µg/mL) em comparação com a AgNP Q, atingindo 156,25 µg/mL (tabela 1). Os valores de CIM das leveduras foram maiores que os valores de CIM para todas as cepas bacterianas testadas. As células fúngicas têm uma parede espessa rica em polissacarídeos, composta principalmente de betaglicanos e quitina, que pode atuar reduzindo a penetração de NPs (HERNANDEZ-CUELLAR *et al.*, 2022). Em contraste, as paredes celulares bacterianas são mais permeáveis, o que pode facilitar a interação e absorção das NPs (JAIN *et al.*, 2021; MASIMEN *et al.*, 2022).

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) de AgNP B (biogênica) e AgNP Q (química) testadas contra diferentes cepas microbianas e isolados clínicos.

CEPA	AgNP	CIM	CBM/CFM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	B	2,44	4,88
	Q	39,06	39,06
<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC700603	B	9,76	19,53
	Q	156,25	312,5
<i>K. pneumoniae</i> KPC+	B	19,53	19,53
	Q	156,25	156,25
<i>S. aureus</i> ATCC25923	B	9,76	19,53
	Q	78,12	156,25
MRSA 17022	B	9,76	19,53
	Q	156,25	156,25
MRSA 16007	B	4,88	9,76
	Q	39,06	39,06
MRSA 17041	B	9,76	19,53

	Q	156,25	312,5
MRSA BMB9393	B	9,76	19,53
	Q	39,06	78,12
MRSA 17030	B	19,53	19,53
	Q	156,25	156,25
<i>P. aeruginosa</i> cepa clínica multirresistente	B	9,76	9,76
	Q	19,53	39,06
<i>C. albicans</i> ATCC14053	B	39,06	39,06
	Q	156,25	312,5
<i>C. albicans</i> ATCC10231	B	39,06	39,06
	Q	156,25	156,25
		µg/mL	µg/mL

Fonte: elaborado pela autora

Os resultados confirmam o papel das AgNPs no combate a patógenos multirresistentes a antibióticos, destacando a superioridade da AgNP B (CUNHA *et al.*, 2023). Estudos apontam que NPs biogênicas produzidas por cepas bacterianas podem atingir CIM tão baixa quanto 3,3 µg/mL e 2,0 µg/mL contra *P. aeruginosa*, comparável aos 2,44 µg/mL observados para AgNP B neste estudo, e de 10 µg/mL para *S. aureus* comparáveis aos 9,76 µg/mL encontrado (KARLEY; SHUKLA; RAO, 2024; TUFAIL *et al.*, 2022). Outro estudo também relatou eficácia semelhante contra MRSA, reforçando seu potencial como alternativa aos desinfetantes e antimicrobianos convencionais (CUNHA *et al.*, 2023). A variação na eficácia entre as cepas, como a maior sensibilidade de *P. aeruginosa* ATCC9027 e MRSA 16007, está ligada a funcionalização das NPs e sua interação com as membranas bacterianas (GHOSH *et al.*, 2021). AgNP B tem menor toxicidade e maior biocompatibilidade, características essenciais para terapias mais seguras contra infecções relacionadas a microrganismos resistentes a antimicrobianos (CHUY *et al.*, 2022; QUINTEROS *et al.*, 2019; TUFAIL *et al.*, 2022).

Diversos estudos relatam que várias moléculas antimicrobianas apresentam maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, devido à sua parede celular mais exposta e permeável. Em contraste, as Gram-negativas tendem a ser mais resistentes, pois possuem uma membrana externa adicional, composta por lipopolissacarídeos, que dificulta a entrada de agentes antimicrobianos e contribui para a resistência intrínseca (JAIN *et al.*, 2021). Além disso, esses microrganismos frequentemente apresentam bombas de efluxo eficientes, que reduzem a acumulação

de compostos tóxicos em seu interior (COSTA, 2019). No entanto, em nosso estudo, esse padrão não foi observado, já que a AgNP B demonstrou alta atividade contra patógenos Gram-negativos, como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, sugerindo que esses nanomateriais podem atuar por mecanismos distintos dos antimicrobianos convencionais.

Outros estudos indicam que NPs menores possuem maior capacidade de penetração celular (GHOSH *et al.*, 2021), o que pode justificar a eficácia da AgNP B, cujo tamanho médio é de 32 nm, em comparação à AgNP Q, com 52 nm (CHUY *et al.*, 2022; IWUJI *et al.*, 2024). No entanto, essa hipótese ainda é incerta, e a influência do tamanho na atividade antimicrobiana precisa ser melhor investigada. Apesar dos resultados promissores, os avanços nos métodos de funcionalização podem expandir as aplicações clínicas e ambientais desses NPs.

A análise dos valores de CIM das AgNPs B e Q, em conjunto com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos convencionais (quadro anexo), revela que não há uma correlação direta entre a resistência das cepas aos antibióticos e a sua susceptibilidade às NPs. Embora algumas cepas multirresistentes, como MRSA 17022 e *K. pneumoniae* KPC+, tenham apresentado CIMs elevadas frente as AgNPs, indicando menor susceptibilidade, outras cepas com o mesmo perfil, como a MRSA BMB9393, foram inibidas por concentrações consideravelmente menores, evidenciando boa atividade das NPs. Além disso, cepas menos resistentes, como *S. aureus* ATCC25923 e *K. quasipneumoniae* ATCC700603, apresentaram CIMs comparáveis ou até superiores às de algumas cepas multirresistentes. Esses dados sugerem que a eficácia das NPs não depende necessariamente do padrão clássico de resistência antimicrobiana, reforçando seu potencial como alternativa terapêutica.

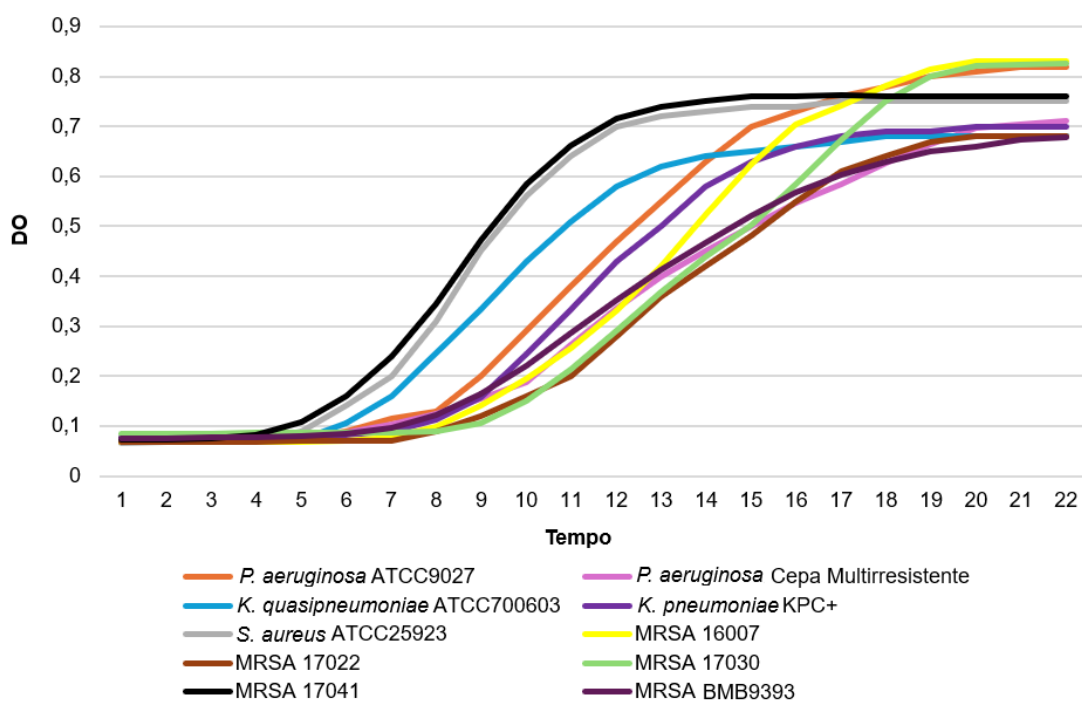
Para uma análise mais detalhada da atividade antimicrobiana sob o aspecto biológico, o tempo de geração e a velocidade de crescimento (tabela 2) de cada cepa/isolado bacteriano foram determinados exclusivamente durante a fase de crescimento exponencial, com base em sua curva de crescimento (figura 5). Ao comparar as fases de crescimento bacteriano entre as cepas, observaram-se algumas diferenças.

Tabela 2 – Tempo de geração (TG) em minutos e a velocidade de crescimento (VC) das 10 cepas bacterianas utilizadas no estudo.

CEPA	TG (min)	VC μ (h ⁻¹)
<i>P. aeruginosa</i> cepa clínica multirresistente	56,39	0,227
<i>K. pneumoniae</i> KPC+	45,14	0,301
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	41,61	0,294
<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC700603	38,18	0,280
<i>S. aureus</i> ATCC25923	34,47	0,277
MRSA 17022	57,08	0,275
MRSA 16007	45,28	0,275
MRSA 17030	51,16	0,204
MRSA 17041	32,51	0,252
MRSA BMB9393	42,52	0,256

Fonte: elaborado pela autora

Figura 5 – Curva de crescimento das 10 cepas bacterianas utilizadas no estudo.



Fonte: elaborado pela autora

Cepas com um tempo de geração mais curto alcançam a fase exponencial mais rapidamente, exibindo alta atividade metabólica e produção intensificada de biomoléculas essenciais, como proteínas e constituintes da parede celular. Consequentemente, essas células podem apresentar maior vulnerabilidade a antimicrobianos que atuam nesses processos biológicos ativos (LI *et al.*, 2017). Embora as AgNPs apresentem múltiplos mecanismos de ação, sua eficácia pode ser influenciada pelo estado fisiológico da célula. Durante a fase exponencial, as células estão metabolicamente ativas e podem internalizar mais AgNPs por processos como endocitose ou transporte passivo, o que potencializa os efeitos citotóxicos. Além disso, a maior demanda por divisão celular pode amplificar o impacto das AgNPs na integridade da parede celular e na replicação do DNA (SHIRALIYEV; ORMAN, 2024). No entanto, cepas com crescimento mais lento ou em fase estacionária podem apresentar mecanismos de tolerância ou resistência, como o aumento na expressão de bombas de efluxo, redução da permeabilidade da membrana e indução de respostas antioxidantes para neutralizar EROs geradas pelas AgNPs (SEBASTIAN; FINKEL, 2022). Ao comparar os valores de CIM com os tempos de geração das cepas/isolados, não foi possível estabelecer uma relação direta entre esses parâmetros. Cepas com maior CIM não apresentaram necessariamente menor tempo de geração, nem aquelas com menor CIM exibiram, de forma consistente, tempos de geração mais longos. No entanto, a cepa MRSA 17030, que apresentou uma CIM baixa, também exibiu um tempo de geração elevado. Por outro lado, *K. pneumoniae* KPC+, que teve uma das maiores CIM, e MRSA 16007, que apresentou uma das menores CIM, mostraram tempos de geração bastante semelhantes (45,14 e 45,28 minutos, respectivamente). Os resultados sugerem que não há uma relação significativa entre o tempo de geração das cepas e sua sensibilidade as AgNPs B e Q, indicando que o perfil de crescimento bacteriano não é um bom preditor de resistência frente a estes compostos.

A avaliação dos valores de CIM das AgNPs B e C contra diferentes cepas de fungos filamentosos, apresentada na tabela 3 e documentadas na figura 6, revelou diferenças na eficácia das NPs testadas. A cepa de *R. stolonifer* apresentou menor CIM da AgNP B (CIM de 9,76 µg/mL), enquanto as cepas de *A. niger* e *F. oxysporum* demonstraram menor sensibilidade (CIM de 78 µg/mL). Para três das quatro cepas testadas, a AgNP Q não apresentou atividade antifúngica para todas as

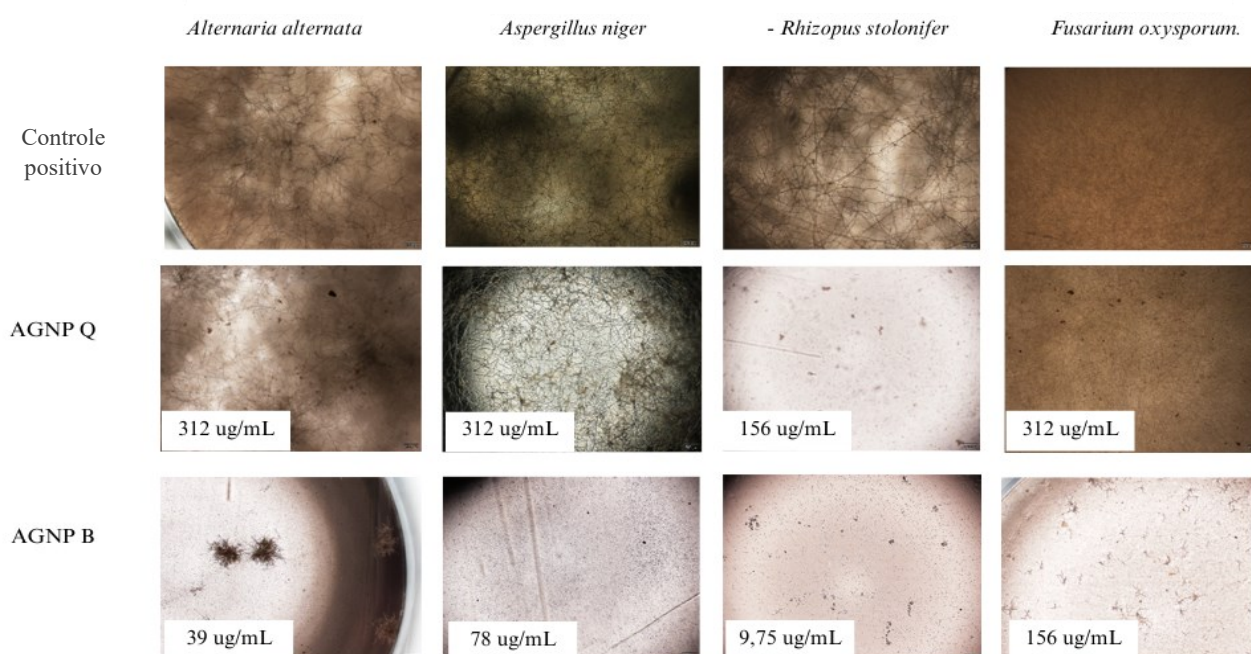
concentrações testadas. Esses resultados sugerem que a composição e as propriedades físico-químicas das AgNPs influenciam diretamente na atividade antifúngica.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) de AgNP B e AgNP Q testada contra diferentes cepas de fungos filamentosos. SI = sem inibição até 312,5 µg/mL de AgNPs.

CEPA	AgNP	CIM
<i>A. alternata</i> CCT2816	B	39,06
	Q	SI
<i>R. stolonifer</i> CCT0276	B	9,76
	Q	156,25
<i>A. niger</i> DR02	B	78,12
	Q	SI
<i>F. oxysporum</i> MUCL909	B	78,12
	Q	SI
		µg/mL

Fonte: elaborado pela autora

Figura 6 – Imagens microscópicas obtidas em microscópio invertido em um aumento de 400X dos cultivos dos fungos em meio RPMI1640 a 28°C por 72 horas.



Fonte: elaborado pela autora

Os resultados destacam o potencial das AgNPs como agentes antifúngicos, apoiando estudos anteriores sobre seu impacto em microrganismos potencialmente patogênicos (GÓRKA; KUBINSKI, 2024). As espécies de fungos testadas podem estar associadas a infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, como aspergilose e mucormicose. *A. alternata* pode causar alergias respiratórias e infecções de pele, enquanto *F. oxysporum* está relacionado a infecções raras, como ceratite e infecções subcutâneas (ABEL-FERNANDEZ *et al.*, 2023; IQBAL *et al.*, 2014; MANESS; ZUBOV, 2019).

Estudos sugerem que a geração de EROs por AgNPs induz estresse oxidativo e destruição da membrana celular, explicando sua atividade antifúngica (KORA; RASTOGLI, 2018). Valores mais altos de CIM por AgNP B contra *A. niger* e *F. oxysporum* podem ser atribuídos à espessura da parede celular destes fungos, composta por quitina e glucanos, que podem dificultar a penetração da NP (NETALA *et al.*, 2018). Por outro lado, *R. stolonifer*, com paredes celulares menos robustas, apresentou maior sensibilidade, refletida em menores valores de CIM. A diferença entre os NPs testados destaca a influência de fatores físico-químicos, como tamanho e revestimento. Evidências sugerem que NPs menores que 40 nm apresentam maior interação com membranas celulares (RAI *et al.*, 2021). No presente estudo, a AgNP B possui 32 nm (CHUY *et al.*, 2022), enquanto a AgNP Q apresenta um tamanho maior, variando entre 52 e 58 nm (dados não publicados). Essa diferença de tamanho é uma das hipóteses para explicar a variação na atividade antimicrobiana entre as duas. No entanto, não está claro se essa diferença é determinante para a atividade das AgNPs analisadas. Além disso, as evidências mais robustas indicam que o revestimento das AgNPs biogênicas com moléculas microbianas melhora sua estabilidade e biodisponibilidade, aumentando sua eficácia contra células microbianas em comparação com a AgNP Q (LI *et al.*, 2022; RAI *et al.*, 2021).

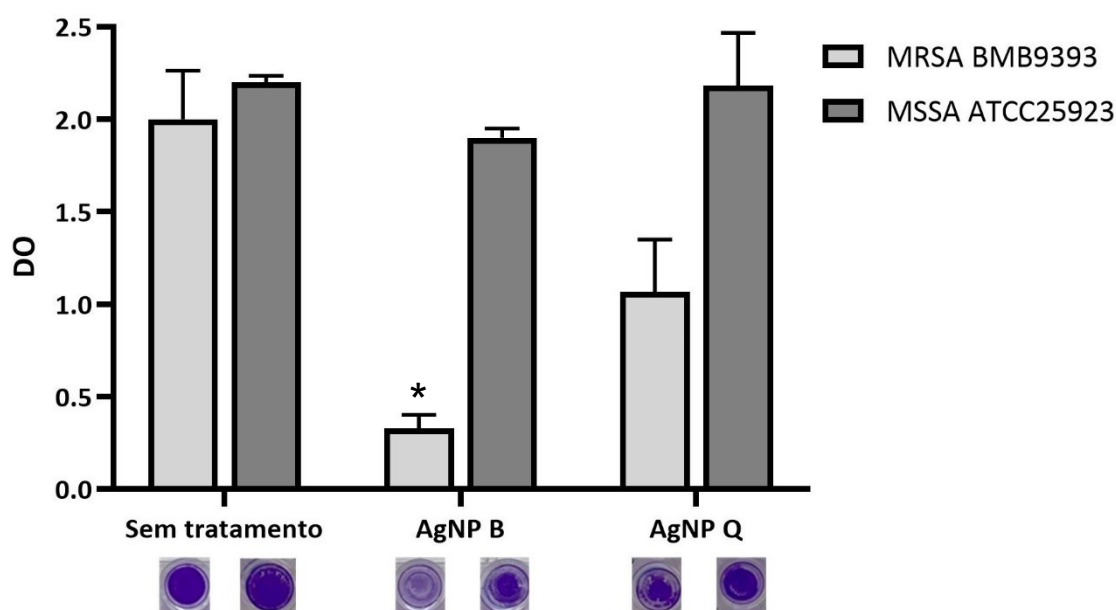
4.2 A AgNP B EXIBE ATIVIDADE ANTIBIOFILME, PREVENINDO A FORMAÇÃO E DEGRADANDO BIOFILMES PRÉ-FORMADOS.

A AgNP B reduziu a formação de biofilme de MRSA em maiores níveis ($p = 0,0101$) em comparação com a AgNP Q ($p = 0,2969$), em relação ao controle não tratado, conforme mostrado na figura 7. No entanto, para a cepa MSSA, o tratamento

com AgNPs não foi eficaz para impedir a formação do biofilme, conforme mostrado no quadro 2.

Figura 7 – Gráfico de comparação da atividade antibiofilme entre AgNP B e AgNP Q, em relação ao controle não tratado, na formação de biofilme pela cepa MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923 após 24h de incubação. Os poços de microplacas abaixo das barras mostram os biofilmes formados em cada teste.

DO=densidade ótica.



Fonte: elaborado pela autora

Quadro 2 – **Inibição do biofilme.** Classificação dos biofilmes tratados e não tratados de MRSA BMB9693 e MSSA ATCC25923, de acordo com os valores da DO (densidade ótica). fraca = fracamente aderente; e forte = fortemente aderente.

CEPA	Sem Tratamento	AgNP B	AgNP Q
MRSA BMB9393	Forte	fraca	forte
MSSA ATCC25923	Forte	forte	forte

Fonte: elaborado pela autora

O gráfico apresentado na figura 7 mostra o efeito das AgNPs B e Q na formação do biofilme de MRSA e MSSA após 24 horas de interação. Os controles correspondendo a poços não tratados com NPs, confirmou a robustez do modelo

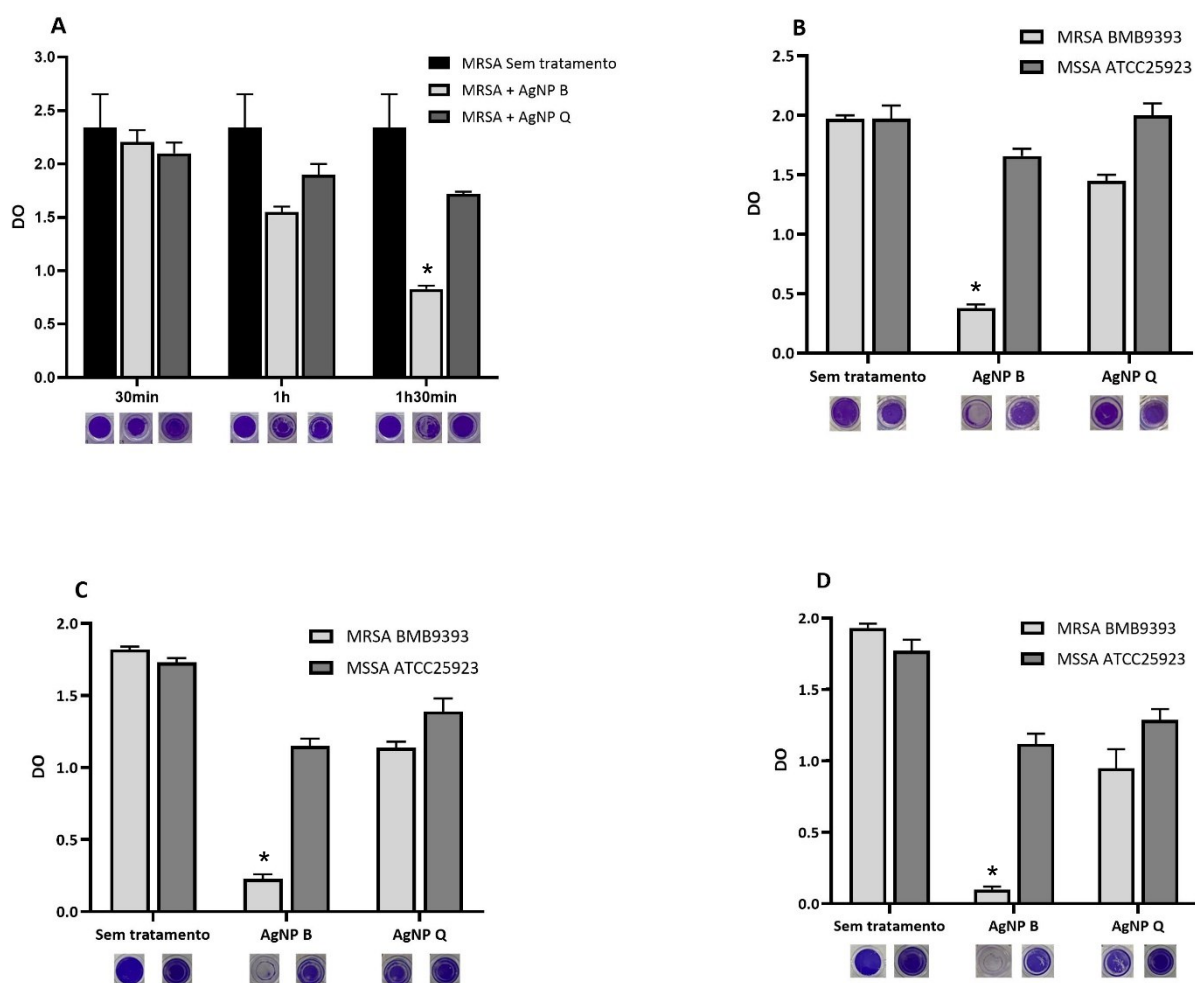
experimental, enquanto o controle negativo, de uma cepa não formadora de biofilme (*S. aureus* ATCC29213), demonstrou a ausência de formação de biofilme. A análise estatística revelou uma redução na formação de biofilme de MRSA nos tratamentos com AgNP B em comparação com poços não tratados ($p=0,01$). Esses achados indicam a eficácia do AgNP B, particularmente na inibição da formação de biofilme de MRSA.

As AgNPs demonstraram capacidade de inibir a formação do biofilme em MRSA (predominantemente *ica*-independente), mas não em MSSA (predominantemente *ica*-dependente). Esses resultados podem ser explicados, a princípio, devido às diferenças estruturais e composição entre os biofilmes: os biofilmes *ica*-dependentes são predominantemente mediados pela adesão intercelular de polissacarídeos como PIA ou PNAG, enquanto os biofilmes *ica*-independentes são compostos majoritariamente por proteínas (FIGUEIREDO *et al.*, 2017). A adesão no MRSA pode ser influenciada pela expressão aumentada de proteínas como a fibronectina (FnBP), facilitando sua ligação à AgNP B, devido a interações com proteínas da membrana externa da *K. quasipneumoniae* presentes na AgNP B após o processo de síntese (CHUY *et al.*, 2022), enquanto em polissacarídeos essa interação parece não ocorrer, pelo menos nas cepas estudadas.

A dinâmica da degradação do biofilme MRSA ao longo do tempo revelou que a degradação do biofilme começou após 1h30min de contato com AgNP B ($p = 0,0430$), enquanto apenas uma degradação limitada foi observada com AgNP Q ($p = 0,1222$) (figura 8A). Em 2 horas de interação (figura 8B), os AgNPs degradaram a maior parte do biofilme MRSA pré-formado, resultando em nenhum biofilme visível após 20 horas (figura 8D). Esses achados destacam a superioridade sustentada do tratamento com AgNP B por longos períodos. Essas diferenças não ocorrem ao longo do tempo no biofilme de MSSA.

Figura 8 – Gráficos demonstrando a degradação do biofilme em 6 diferentes tempos de contato com as AgNPs B e Q. O **gráfico (A)** sendo os tempos de 30min, 1h e 1h30min e sido testado apenas na cepa MRSA BMB9393. O **gráfico (B)** no tempo de 2h, o **gráfico (C)** no tempo de 4h e o **gráfico (D)** no tempo de 20h, sendo esses três últimos tempos testados em MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923.

DO=densidade ótica.



Fonte: elaborado pela autora

O quadro 3 detalha as classificações dos biofilmes tratados e não tratados, reforçando a superioridade do tratamento com AgNP B em tempos prolongados.

Quadro 3 – **Degradação do biofilme.** Classificação dos biofilmes tratados e não tratados de MRSA BMB9393 e MSSA ATCC25923 de acordo com os valores da DO (densidade ótica), onde NA = não aderente; fraco = fracamente aderente; moderado = moderadamente aderente e forte = fortemente aderente.

CEPA	30min	1h	1h30min	2h	4h	20h
MRSA Sem tratamento	forte	forte	Forte	forte	forte	forte
MRSA + AgNP B	forte	forte	moderado	fraco	NA	NA
MRSA + AgNP Q	forte	forte	Forte	forte	forte	forte
MSSA Sem tratamento	-	-	-	forte	forte	forte
MSSA + AgNP B	-	-	-	forte	forte	forte
MSSA + AgNP Q	-	-	-	forte	forte	forte

Fonte: elaborado pela autora

Os resultados demonstraram que a degradação do biofilme pré-formado foi mais eficaz após 4 horas de exposição à AgNP B, ocorrendo apenas no biofilme de MRSA. Isso corrobora estudos que indicam que as AgNPs penetram biofilmes ricos em proteínas, interrompem a matriz extracelular e promovem o colapso estrutural (QUINTEROS *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020). Além disso, há indícios de que tamanhos menores de NPs se mostraram mais eficazes devido à maior relação superfície/volume (HAMIDA *et al.*, 2020).

Além dessa hipótese inicialmente levantada, há outras possíveis explicações que podem justificar a maior suscetibilidade do biofilme de MRSA à AgNP B em comparação ao biofilme de MSSA. Uma delas está relacionada às diferenças na permeabilidade da matriz extracelular. Os biofilmes de MSSA, ricos em polissacarídeos, podem atuar como uma barreira mais eficaz contra a penetração das AgNPs, dificultando sua interação direta com as células bacterianas. Em contrapartida, os biofilmes de MRSA, predominantemente compostos por proteínas, podem apresentar uma estrutura mais permeável, facilitando a difusão das NPs e aumentando sua atividade (ABRANTES; NOGUEIRA, 2022).

Outro fator relevante envolve a variação na carga superficial da matriz e das células. As proteínas presentes no biofilme de MRSA podem interagir mais eficientemente com a superfície das AgNPs devido a diferenças na carga elétrica, favorecendo sua adesão e consequente degradação do biofilme. Já a matriz polissacarídica do MSSA pode criar uma repulsão eletrostática ou dificultar a adesão

das AgNPs, reduzindo sua eficácia antimicrobiana (FULAZ *et al.*, 2020; HAYLES *et al.*, 2024).

Além disso, a expressão diferenciada de fatores de resistência ao estresse pode desempenhar um papel importante. MSSA pode apresentar mecanismos mais eficientes de tolerância a íons de Ag ou EROs geradas pelas AgNPs, como sistemas de efluxo e enzimas detoxificantes, incluindo catalases e superóxidos dismutases. Em contrapartida, MRSA pode ser mais susceptível devido a uma menor regulação desses mecanismos de defesa, tornando-o mais vulnerável à ação das NPs (SANTOS *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016).

Esses fatores, em conjunto, podem contribuir para a discrepância observada na atividade antibiofilme da AgNP B frente aos biofilmes de MRSA e MSSA, reforçando a necessidade de investigações adicionais para compreender os mecanismos específicos que governam essa seletividade que ainda não são bem esclarecidos.

A tabela 4 mostra as porcentagens de inibição do biofilme MRSA e degradação do biofilme por AgNP B, em diferentes concentrações, após 20 horas de contato. Inibição de até 87% foi observada na concentração de 4,88 µg/mL, considerando-se uma CIMB₈₀ de 2,44 µg/mL e uma CIMB₅₀ de 0,30 µg/mL. A degradação de até 98% foi observada na concentração de 4,88 µg/mL, considerando um CMEB₈₀ de 2,44 µg/mL e um CMEB₅₀ de 0,30 µg/mL.

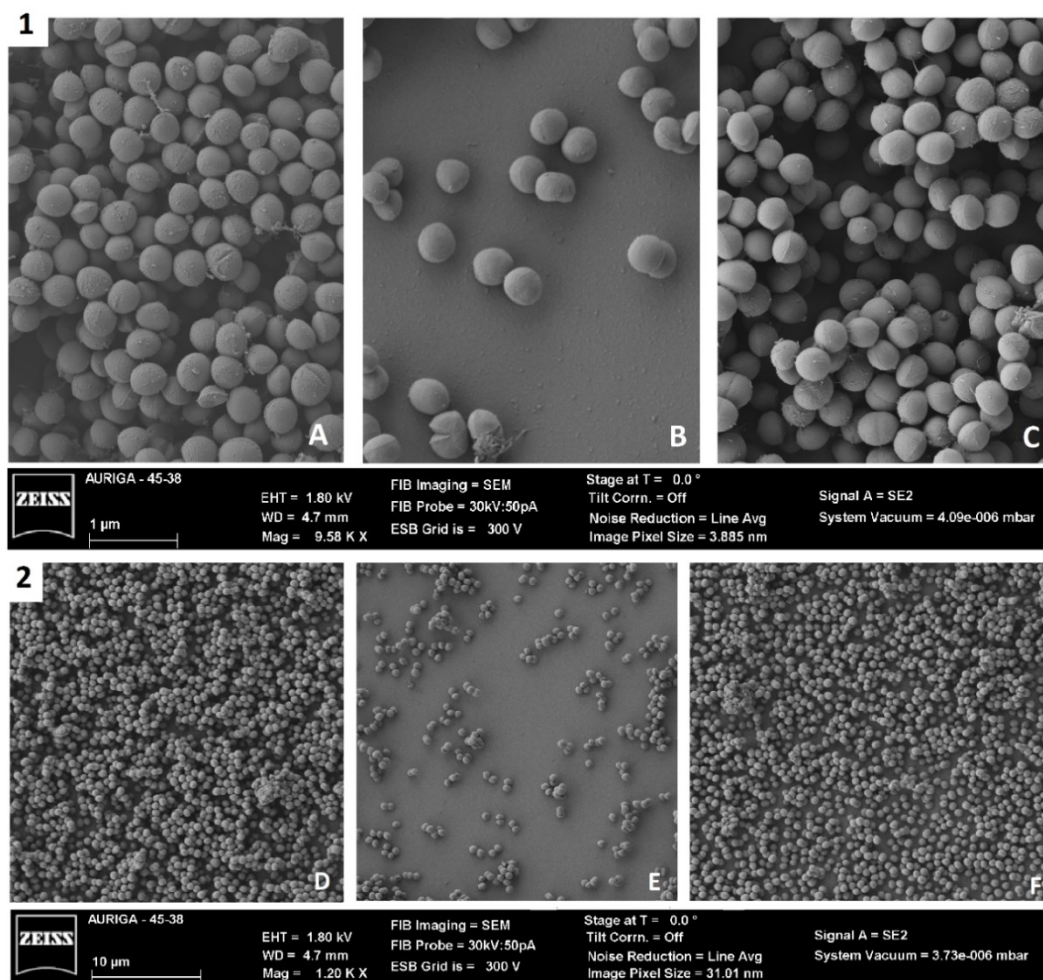
Tabela 4 – CIMB e CMEB de MRSA BMB9393 após 20 horas de contato com AgNP B.

Concentração	% inibição	% degradação
Grupo controle (sem tratamento)	0%	0%
4,88 µg/mL	87%	98%
2,44 µg/mL	84%	96%
1,22 µg/mL	79%	65%
0,61 µg/mL	74%	63%
0,30 µg/mL	69%	54%
0,15 µg/mL	43%	39%

Fonte: elaborado pela autora

Após 4 horas de exposição às AgNPs B e Q, a degradação de MRSA BMB9393 biofilme é mostrada nas imagens de MEV (figura 9). O controle não tratado (figura 9A e 9D) mostra o biofilme de MRSA tipicamente maduro, com células organizadas em uma matriz densa, indicando uma estrutura intacta. No tratamento com AgNP B (figura 9B e 9E), observa-se redução na densidade da matriz e desintegração da membrana celular. Isso sugere que a AgNP B pode interferir na estrutura do biofilme, promovendo a dispersão de aglomerados bacterianos e reduzindo a densidade da matriz celular. Uma hipótese é que as NPs podem enfraquecer as interações entre as células e a matriz, facilitando a desorganização do biofilme. Embora não sejam observados sinais aparentes de dano celular, como desintegração da membrana, não se pode descartar outros tipos de danos às células bacterianas. Apesar de não haver alteração no volume celular, houve alteração no arranjo, pois não é mais visível o arranjo estafilococos. Em contraste, o tratamento com AgNP Q (figura 9C e 9F) não demonstrou danos evidentes ao biofilme, semelhante ao controle não tratado.

Figura 9 – Imagens de microscópio eletrônico de varredura (MEV) ilustrando a degradação do biofilme MRSA pré-formado após 4 horas de tratamento com AgNP B (B e E) e AgNP Q (C e F). (A e D) Representa o controle não tratado, mostrando uma estrutura de biofilme intacta. (1) Barra de escala = 1 μm , ampliação de 9,58Kx; (2) Barra de escala = 10 μm , ampliação de 1,20Kx.

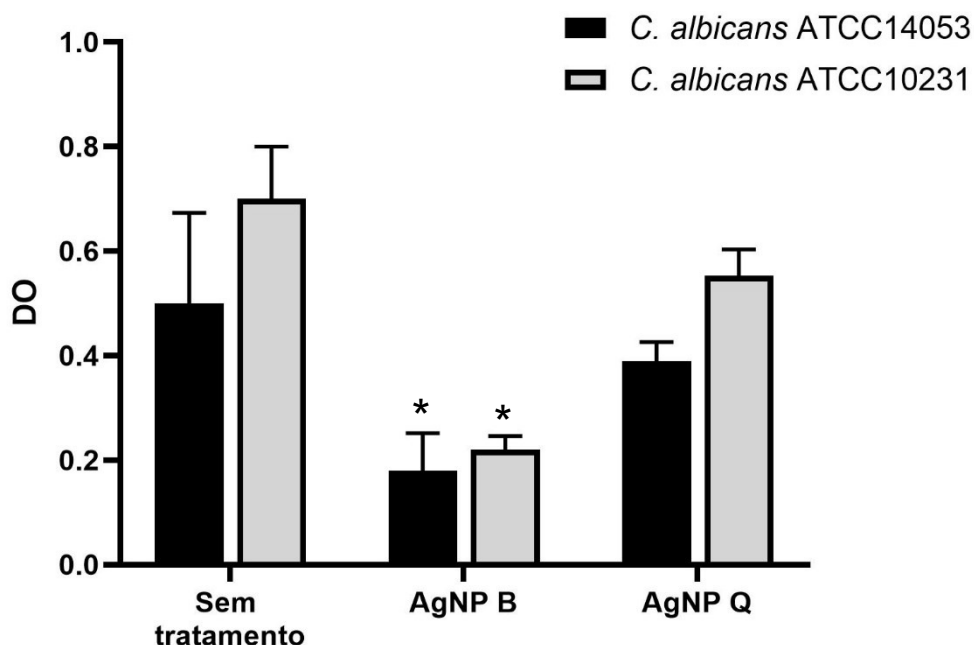


Fonte: elaborado pela autora

Comparando as imagens (B e E) e (C e F), pode-se inferir que a AgNP B exibe atividade superior em comparação com a AgNP Q, possivelmente devido a diferenças na composição, tamanho, morfologia ou revestimento de partículas. Esses fatores podem influenciar a interação dos NPs com a superfície bacteriana e sua capacidade de penetrar na matriz do biofilme.

Na análise de biofilme de *C. albicans*, a AgNP B apresentou desempenho superior, quando comparada à AgNP Q (figura 10).

Figura 10 – Gráfico de comparação da atividade antibiofilme entre AgNP B e AgNP Q, em relação ao controle não tratado, na formação de biofilme por cepas de *C. albicans* após 24 horas de incubação. DO=densidade ótica.



Fonte: elaborado pela autora

Ambos os isolados de *C. albicans*, sem tratamento, foram considerados como 100% de formação de biofilme. Com o tratamento com AgNP B para a cepa ATCC14053, observou-se 64% de redução na formação de biofilme, enquanto com o tratamento com AgNP Q, ocorreu apenas 22% desta redução. Para a cepa ATCC10231, o tratamento com AgNP B indicou 69% de redução no biofilme, enquanto o tratamento com AgNP Q resultou em 20% de redução. Esse efeito pode ser atribuído à interação de NPs com componentes lipídicos e proteicos da matriz extracelular fúngica.

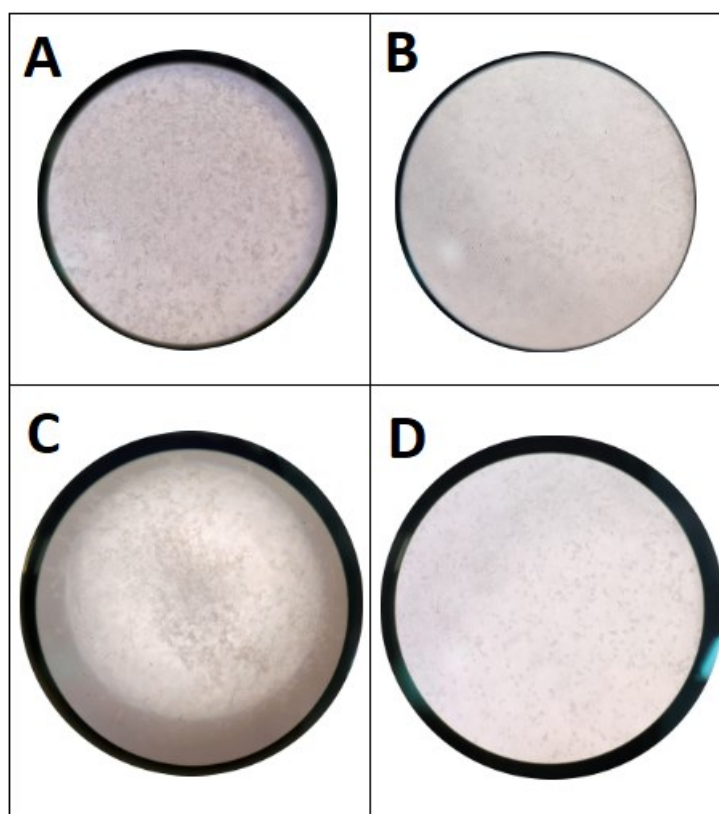
Os resultados destacam o potencial das AgNPs, especialmente as biogênicas sintetizadas a partir de *K. quasipneumoniae*, como agentes eficazes contra biofilmes *in vitro* de MRSA e *C. albicans*. A eficácia do AgNP B se deve a fatores específicos do processo de síntese, como a incorporação de proteínas de membrana de *K. quasipneumoniae* e metabólitos extracelulares, que promovem a interação com componentes de biofilmes bacterianos e fúngicos (YOUNIS; SEMARY; MOHAMED, 2021). Além disso, a falta de atividade significativa de AgNP Q contra biofilmes reforça

a importância da abordagem biogênica para a síntese de NP. Os metabólitos secundários de *K. quasipneumoniae* parecem ser essenciais para a eficácia da AgNP B, possibilitando maior interação com componentes proteicos da matriz extracelular em biofilmes bacterianos e fúngicos.

4.3 AgNPs NÃO REDUZIRAM A REPLICAÇÃO VIRAL EM CONCENTRAÇÕES NÃO CITOTÓXICAS

Observou-se que as maiores concentrações de AgNPs B e Q (30 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$, 3,75 $\mu\text{g/mL}$, 1,88 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram citotoxicidade, causando destruição significativa da camada celular. No ensaio virucida, as concentrações não citotóxicas (0,94 $\mu\text{g/mL}$, 0,47 $\mu\text{g/mL}$, 0,22 $\mu\text{g/mL}$, 0,11 $\mu\text{g/mL}$) não reduziram significativamente a replicação viral (menos de 90%), demonstrando apenas o efeito citopático do adenovírus, em comparação com o controle viral (figura 11). Assim, as AgNPs B e Q não apresentaram atividade relevante para inibir a replicação viral no modelo testado.

Figura 11 – Análise microscópica da atividade virucida da AgNP B. **(A)** Controle celular, com células íntegras e sem tratamento; **(B)** Controle celular com a AgNP B, sem alterações morfológicas aparentes; **(C)** Efeito citopático observado após a adição da AgNP B em células infectadas; **(D)** Controle viral, demonstrando a destruição celular causada pela infecção.



Fonte: elaborado pela autora

Estudos recentes sugerem que AgNPs interagem com proteínas de superfície ou capsídeos virais, impedindo os processos iniciais de entrada celular (LUCERI *et al.*, 2023; SALLEH *et al.*, 2020). No entanto, os vírus não envelopados, como os adenovírus, possuem capsídeos altamente estáveis, o que reduz a interação com NPs e, conseqüentemente, sua eficácia virucida em concentrações seguras para as células hospedeiras. Essa característica foi explorada em estudos que avaliaram o uso de adenovírus como modelo para desenvolver NPs destinados à desinfecção de superfícies (PFAFF *et al.*, 2019). Para esse tipo de aplicação, a escolha de vírus não envelopados é estratégica, pois são mais estáveis, e podem permanecer viáveis por longos períodos no ambiente. Por outro lado, os vírus envelopados apresentam menor resistência a agentes externos e, portanto, não seriam os tipos de vírus mais adequados para testes de formulação de desinfetantes, dada a sua rápida inativação em condições ambientais.

O efeito citotóxico observado em células A549 em concentrações mais altas de AgNPs pode ter aplicações terapêuticas específicas, como no tratamento antineoplásico, onde a citotoxicidade controlada é vantajosa. Um estudo recente sugere que as AgNPs induzem a morte celular programada (apoptose) em células tumorais por meio da geração de EROs e danos ao DNA, causando estresse oxidativo e interrompendo as vias metabólicas em células cancerígenas, destacando seu potencial como agentes quimioterápicos alternativos (KAŠPAROVÁ *et al.*, 2021). Metodologias específicas adaptadas para avaliar os efeitos anticancerígenos da AgNP B precisariam ser aplicadas para explorar ainda mais seu potencial como agentes anticancerígenos.

5 CONCLUSÃO

Este estudo contribuiu para o avanço no conhecimento de AgNPs biogênicas para o combate a patógenos multirresistentes e formadores de biofilme, preenchendo lacunas científicas relevantes no contexto da problemática da resistência aos antimicrobianos. AgNP B demonstrou notável eficiência antimicrobiana e antibiofilme, incluindo bactérias e fungos, mesmo em concentrações extremamente baixas, o que reforça seu potencial como uma alternativa promissora em comparação às AgNPs Q. A atividade significativa em doses reduzidas valoriza ainda mais sua aplicabilidade, possibilitando efeitos terapêuticos com menor toxicidade e menor impacto ambiental.

Além disso, a produção biogênica de AgNPs se alinha à demanda por soluções sustentáveis e ecologicamente corretas.

Embora o estudo tenha revelado que o AgNP B não demonstrou atividade virucida significativa em concentrações não citotóxicas, o efeito citotóxico observado nas células A549 sugere potenciais aplicações terapêuticas, incluindo o tratamento do câncer. Outras metodologias devem ser aplicadas para testagem das AgNPs como agentes terapêuticos antivirais.

A relevância deste estudo também reside em seu potencial de aplicação prática. Em ambientes hospitalares e industriais, a AgNP B pode mostrar-se promissora como agente de desinfecção de superfícies, enquanto sua atividade citotóxica controlada pode ser explorada em contextos terapêuticos anticarcinogênicos. Testes específicos para aplicação das AgNP B nestes contextos devem ser aplicados no futuro.

Apesar dos resultados promissores, o estudo apresenta algumas limitações, como a ausência de testes em condições de anaerobiose. Considerando que as cepas utilizadas são anaeróbicas facultativas, essa avaliação seria fundamental para entender melhor a eficácia das AgNPs em um ambiente mais próximo das condições clínicas, onde microrganismos podem estar sujeitos a baixos níveis de oxigênio. A eficiência de AgNP B foi limitada contra fungos com estruturas celulares mais resistentes, como *F. oxysporum* e contra MSSA. Além disso, a ausência de atividade virucida em concentrações seguras para células saudáveis destaca uma restrição em sua aplicabilidade para o combate a vírus em superfícies. O efeito citotóxico observado também requer mais investigações para garantir sua segurança em aplicações clínicas.

As perspectivas futuras incluem a otimização da funcionalização de AgNPs para aumentar sua eficácia e potenciais aplicações. O desenvolvimento de formulações combinadas pode aumentar sua eficiência e reduzir as doses terapêuticas. Além disso, a estabilidade das NPs biogênicas sob diferentes condições ambientais ainda precisa ser avaliada, incluindo variações de pH e resistência à presença de enzimas comuns no ambiente. Outra questão relevante é a análise da eficiência das NPs contra bactérias em diferentes fases da curva de crescimento, uma vez que sua atividade pode variar significativamente ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Marwan *et al.* Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**. v. 196, p. 453-472, 2014.

ABEL-FERNANDEZ, Eva *et al.* Going over Fungal Allergy: *Alternaria alternata* and Its Allergens. **Journal of Fungi**. v. 9, n. 5, 2023.

ABOUALIGALEHDARI, Elham *et al.* Anti-biofilm Properties of Peganum harmala against *Candida albicans*. **Osong Public Health and Research Perspectives**. v. 7, n. 2, p. 116-118, 2016.

ABRANTES, Jaime; NOGUEIRA, Joseli. Biofilm and persister cells: from persistence to microbial resistance. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**. v. 54, n. 3, p. 228-234, 2022.

AHMED, Mohammed; BAPTISTE, Keith. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. **Microbial Drug Resistance**. v. 24, n. 5, p. 590-606, 2018.

ARAÚJO, Tiago *et al.* In: Congresso Brasileiro de Química, 59º, 2019, João Pessoa – PB.

ATCC – American Type Culture Collection. Type Strains. 2025. Disponível em: <<https://www.atcc.org/microbe-products/type-strains>>

BENVENGA, Vanni *et al.* Historic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: expanding current knowledge using molecular epidemiological characterization of a Swiss legacy collection. **Genome Medicine**. v. 16, n. 23, 2024.

BLOOMFIELD, Samuel *et al.* Genomic characterization of *Pseudomonas spp.* on food: implications for spoilage, antimicrobial resistance and human infection. **BMC Microbiology**. v. 24, n. 20, 2024.

CAMERON, David *et al.* Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YycHI activation of the WalRK essential two-component regulatory system. **Scientific Reports**. v. 6, n. 30823, p. 1-11, 2016.

CASCIOFERRO, Stella *et al.* Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections. **ChemMedChem**. v. 16, n. 1, p. 65-80, 2020.

CENTELEGHE, Isabella *et al.* Dual species dry surface biofilms; *Bacillus* species impact on *Staphylococcus aureus* survival and surface disinfection. **Journal of Applied Microbiology**. v. 133, n. 2, p. 1130-1140, 2022.

CHUY, Gabriela *et al.* Green Nanoarchitectonics of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Activity Against Resistant Pathogens. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 32, p. 1213-1222, 2022.

CORREA, Tarcísio; PRESCILIANO Rogério; ABREU, Fernanda. Why Does Not Nanotechnology Go Green? Bioprocess Simulation and Economics for Bacterial-Origin Magnetite Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**. v. 21, n. 718232, 2021.

CÔRTEZ, Marina Farrel *et al.* The influence of different factors including *fnbA* and *mecA* expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. **International Journal Medical Microbiology**. v. 304, ed. 1, p. 140-147, 2015.

COSTA, Beatriz Sabbo. **Superbactérias e o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos**. 2019. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2019.

COSTA, Maiana Oliveira Cerqueira *et al.* Complete Genome Sequence of a Variant of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239 Lineage, Strain BMB9393, Displaying Superior Ability To Accumulate *ica*-Independent Biofilm. **ASM Journals**. v. 1, n. 4, 2013.

CUNHA, Kamila *et al.* Biogenic silver nanoparticles: in vitro activity against *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA) and multidrug-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS). **Biotechnology and Industrial Microbiology**. v. 54, p. 2641-2650, 2023.

DAS, Palashpriya; KARANKAR, Vijayshree. New avenues of controlling microbial infections through anti-microbial and anti-biofilm potentials of green mono-and multi-metallic nanoparticles: A review. **Journal of Microbiological Methods**. v. 167, n. 105766, p. 1-27, 2019.

DOMINSKI, Bruno Hech. **Caracterização molecular de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) isolados no estado de Santa Catarina**. 2018. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

DRALI, Rezak *et al.* Emergence of *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from seawater. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 90-94, 2018.

DUFF, Audrey *et al.* Oral and middle ear delivery of otitis media standard of care antibiotics, but not biofilm-targeted antibodies, alter chinchilla nasopharyngeal and fecal microbiomes. **npj Biofilms and Microbiomes**. v. 10, n.10, 2024.

DURÁN, Nelson *et al.* Nanotoxicology of silver nanoparticles: toxicity in animals and humans. **Química Nova**. v. 42, n. 2, p. 206-213, 2019.

EDWARD, Eva *et al.* Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. **BMC Microbiology**. v. 23, n. 161, 2023.

EGHBALIFAM, Naeimeh; SHOJAOSADATI, Seyed Abbas; HASHEMI-NAJAFABADI, Sameereh. Role of bioactive magnetic nanoparticles in the prevention of wound

pathogenic biofilm formation using smart nanocomposites. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 21, n. 161, 2023.

ESPINOSA-MOYANO, Isidoro *et al.* Study of the Distortion of the Indirect Angular Measurements of the Calcaneus Due to Perspective: In Vitro Testing. **Sensors**. v. 21, n. 8, 2021.

EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Disponível em: <<https://www.eucast.org/>>

FERNÁNDEZ-BILLÓN, Maria *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Biofilm**. v. 5, n. 100129, 2023.

FERREIRA, Fabienne Antunes *et al.* Comparison of in vitro and in vivo systems to study *ica*-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**. v. 88, iss. 3, p. 393-398, 2012.

FIGUEIREDO, Inês Marie Sá *et al.* The role of biofilms in persistent infections and factors involved in *ica*-independent biofilm development and gene regulation in *Staphylococcus aureus*. **Critical Reviews in Microbiology**. 2017.

FREIRES, Marinete Souza.; RODRIGUES JÚNIOR, Omero Martins. Resistência bacteriana ao uso indiscriminado de azitromicina versus Covid-19: uma revisão integrativa. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**. v. 11, n. 1, p. e31611125035, 2022.

FULAZ, Stephanie *et al.* Tailoring Nanoparticle-Biofilm Interactions to Increase the Efficacy of Antimicrobial Agents Against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**. v. 15, p. 4779-4791, 2020.

GAREEV, Kamil *et al.* Biomimetic Nanomaterials: Diversity, Technology, and Biomedical Applications. **Nanomaterials**. v. 12, n. 2485, 2022.

GHORBANI, Hamid Reza. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Escherichia coli*. **Asian Journal of Chemistry**. v. 25, n. 3, p. 1247-1249, 2013.

GHOSH, Shubhrima *et al.* Microbial Nano-Factories: Synthesis and Biomedical Applications. **Frontiers in Chemistry**. v. 9, iss. 626834, 2021.

GÓRKA, Kamila; KUBINSKI, Konrad. Antifungal Activity against Human and Plant Mycopathogens, and Green Synthesis of Silver Nanoparticles Exhibiting Such Activity. **Applied Sciences**. v. 14, n. 1, 2024.

GRIES, Casey *et al.* *Staphylococcus aureus* Fibronectin Binding Protein A Mediates Biofilm Development and Infection. **Infection and Immunity**. v. 88, iss. 5, 2020.

GULATI, Megha *et al.* In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. **Current Protocols in Microbiology**. v. 50, n. 1, 2018.

HAMIDA, Reham *et al.* Novel Biogenic Silver Nanoparticle-Induced Reactive Oxygen Species Inhibit the Biofilm Formation and Virulence Activities of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. v. 8, 2020

HANEY, Evan; TRIMBLE, Michael; HANCOCK, Robert. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. **Nature Protocols**. v. 16, p. 2615-2632, 2021.

HAYLES, Andrew *et al.* *Staphylococcus aureus* surface attachment selectively influences tolerance against charged antibiotics. **Acta Biomaterialia**. v. 175, p. 369-381, 2024.

HERNANDEZ-CUELLAR, Eduardo *et al.* Characterization of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilm on different surfaces. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 39, iss. 2, p. 36-43, 2022.

HUH, Ae Jung; KWON, Jovem Jik. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**. v. 156, iss. 2, p. 128-145, 2011.

IQBAL, Mudassar *et al.* Antimicrobial, Cytotoxic and Phytotoxic Potency of Ethyl Acetate Extract of *Rhizopus stolonifer* Culture. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 13, n. 1, p. 87-92, 2014.

IWUJI, Chika *et al.* Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their promising antimicrobial effects. **Chemical Physics Impact**. v. 9, iss. 100758, 2024.

JAIN, Ashvi *et al.* Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 21, 2021.

KARLEY, Dugeshwar; SHUKLA, Sudhir; RAO, Subba. Biosynthesis of silver nanoparticle using *Bacillus licheniformis* culture-supernatant for combating pathogenic biofilms. **Microbial Pathogenesis**. v. 194, iss. 106833, 2024.

KAŠPAROVÁ, Petra *et al.* Antibiofilm agent pterostilbene is able to enhance antibiotics action against *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Pathogenesis**. v. 152, n. 104632, 2021.

KHAN, Azmat Ali *et al.* Pomegranate peel induced biogenic synthesis of silver nanoparticles and their multifaceted potential against intracellular pathogen and cancer. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 28, iss. 8, p. 4191-4200, 2021.

KHASAWNEH, Ashraf *et al.* Status of Biofilm-Forming Genes among Jordanian Nasal Carriers of Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Iranian Biomedical Journal**. v. 24, n. 6, p. 386-398, 2020.

KORA, Aruna; RASTOGI, Lori. Green synthesis of palladium nanoparticles using gum ghatti (*Anogeissus latifolia*) and its application as an antioxidant and catalyst. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 11, iss. 7, p. 1097-1106, 2018.

LAMRET, Fabien *et al.* Antibiotic Tolerance of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Periprosthetic Joint Infections and Antibiofilm Strategies. **Antibiotics**. v. 9, n. 547, 2020.

LESHEM, Tamar *et al.* Incidence of biofilm formation among MRSA and MSSA clinical isolates from hospitalized patients in Israel. **Journal of Applied Microbiology**. v. 133, n. 2, p. 922-929, 2022.

LI, Jun *et al.* Antimicrobial Activity and Resistance: Influencing Factors. **Frontiers in Pharmacology**. v. 8, n. 364, 2017.

LI, Li *et al.* The antifungal activity and mechanism of silver nanoparticles against four pathogens causing kiwifruit post-harvest rot. **Frontiers in Microbiology**. v. 13, iss. 988633, 2022.

LUCERI, Angelica *et al.* Silver Nanoparticles: Review of Antiviral Properties, Mechanism of Action and Applications. **Microorganisms**. v. 11, n. 3, 2023.

MacFADDEN, Derek *et al.* Antibiotic resistance increases with local temperature. **Nature Climate Change**. v. 8, p. 510-514, 2018.

MAHAWAR, Lovely *et al.* Silicon nanoparticles: Comprehensive review on biogenic synthesis and applications in agriculture. **Environmental Research**. v. 232, n. 116292, 2023.

MANESS, Lisa; ZUBOV, Tanya. The Inhibitory Effect of Essential Oils on *Rhizopus stolonifer*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *Microsporum gypseum*. **Laboratory Medicine**. v. 50, n. 2, p. 18-22, 2019.

MARRANA, Mariana. Chapter 3 - Epidemiology of disease through the interactions between humans, domestic animals, and wildlife. *In*: MARRANA, Mariana. **One Health**. Paris: Elsevier Inc., 2022, p. 73-111.

MASIMEN, Mohammed Asyraf Adhwa *et al.* Overcoming Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Using Antimicrobial Peptides-Silver Nanoparticles. **Antibiotics**. v. 11, n. 951. p. 1-16, 2022.

McCARRON, Pauraic *et al.* Unprecedented *in Vitro* Antitubercular Activity of Manganese(II) Complexes Containing 1,10-Phenanthroline and Dicarboxylate Ligands: Increased Activity, Superior Selectivity, and Lower Toxicity in Comparison to Their Copper(II) Analogs. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, 2018.

MICHELON, William *et al.* Virucidal activity of microalgae extracts harvested during phycoremediation of swine wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 29, p. 2856-28571, 2022.

MORIMACHI, Masashi *et al.* Successful Endoscopic Removal of a Biliary Stent with Stent-Stone Complex after Long-Term Migration. **Case Reports Gastroenterology**. v. 13, n. 1, p. 113-117, 2019.

MOUANGA-NDZIME, Yann *et al.* Epidemiology of community origin of major multidrug-resistant ESKAPE uropathogens in a paediatric population in South-East Gabon. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. v. 12, n. 47, 2023.

MOURDIKOUDIS, Stefanos; PALLARES, Roger; THANH, Nguyen. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**. v. 10, p. 12871-12934, 2018.

NAGHAVI, Mohsen *et al.*, Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**. v. 404, iss. 10459, p. 1199-1226, 2024.

NEELY, Alice; MALEY, Matthew. Survival of *Enterococci* and *Staphylococci* on Hospital Fabrics and Plastic. **J Clin Microbiol**. v. 38, n. 2, p. 724, 726, 2017.

NEOPANE, Puja *et al.* In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International Journal of General Medicine**. v. 11, p. 25-32, 2018.

NETALA, Vesudeva *et al.* Biogenesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Indigofera hirsuta* L. and their potential biomedical applications (3-in-1 system). **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. v. 46, p. 1138-1148, 2018.

NISAR, Parveen *et al.* Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. v. 24, iss. 7, p. 929-941, 2019.

OTEO, Jesús; ARACIL, María Belén. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 33, n. 2, p. 27-33, 2015.

OTTER, Jonathan *et al.* Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. **American Journal of Infection Control**. v. 41, iss. 5, 2013.

PFAFF, Florian *et al.* Tungsten carbide nanoparticles show a broad spectrum virucidal activity against enveloped and nonenveloped model viruses using a guideline-standardized in vitro test. **Letters in Applied Microbiology**. v. 69, n. 4, p. 302-309, 2019.

PANÁČEK, Aleš *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. **Nature Nanotechnology**. v. 13, p. 65-71, 2018.

PATEL, Alok *et al.* Integrating biometallurgical recovery of metals with biogenic synthesis of nanoparticles. **Chemosphere**. v. 263, n. 128306, 2020.

PATIL, Shivaprasadagouda *et al.* Investigation of Biogenic Silver nanoparticles Concentrations Impact on Novel Benzofuran Derivative and Their Electrochemical Study. **BioNanoScience**. v. 13, p. 744-759, 2023.

PAVI, Catielen *et al.* Amazonian medicinal plants efficiently inactivate Herpes and Chikungunya viroses. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 167, iss. 115476, 2023.

PIERCE, Christopher *et al.* A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**. v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PORTES, Juliana *et al.* *Toxoplasma gondii* Mechanisms of Entry Into Host Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, 2020.

PRATHEESYA, Talin *et al.* Enhanced antibacterial and photocatalytic activities of silver nanoparticles anchored reduced graphene oxide nanostructure. **Materials Research Express**. v. 6, n. 7, 2019.

QUINTEROS, Melisa *et al.* Biogenic nanoparticles: Synthesis, stability and biocompatibility mediated by proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 184, n. 110517, 2019.

RAI Himanshu; GUPTA, Rajan Kumar. Biogenic fabrication, characterization, and assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles of a high altitude Himalayan lichen - *Cladonia rangiferina* (L.) Weber ex F.H. Wigg. **Tropical Plant Research**. v. 6, n. 2, p. 293-298, 2019.

RAI, Mahendra *et al.* Biogenic Silver Nanoparticles: What We Know and What Do We Need to Know? **Nanomaterials**. v. 11, n. 11, 2021.

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep; MANDAL, Manabendra. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 52, n. 4, p. 1701-1718, 2021.

RICHTER, Angelika *et al.* Reasons for antimicrobial treatment failures and predictive value of *in-vitro* susceptibility testing in veterinary practice: An overview. **Veterinary Microbiology**. v. 245, n. 108694, 2020.

SALLEH, Atiqah *et al.* The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. **Nanomaterials**. v. 10, n. 8, 2020.

SANTOS, Marjory *et al.* Differences in virulence factors of methicillin-sensistive and mithicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicine and Health Promotion**. v. 2, n. 3, p. 719-723, 2017.

SEBASTIAN, Hans; FINKEL, Steven. Absence of Ribosome Modulation Factor Alters Growth and Competitive Fitness of *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum Journal**. v. 10, n. 2, 2022.

SINGH, Anirudh *et al.* Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. **Biotechnology Reports**. v. 25, n. e00427, p. 1-11, 2020

SINGH, Ila *et al.* Evaluation of Virulence, Antimicrobial Resistance and Biofilm Forming Potential of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Bovine Suspected with Mastitis. **Current Microbiology**. v. 80, n. 198, 2023.

SHIRALIYEV, Rauf; ORMAN, Mehmet. Metabolic disruption impairs ribosomal protein levels, resulting in enhanced aminoglycoside tolerance. **eLife**. v. 13, 2024.

SHIVASHANKAR, Poojashree. Green Nanoparticles as Antibiofilm: A Review. **Letters in Applied NanoBioScience**. v. 10, iss. 1, 2021.

SHREE, Pallee *et al.* Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. **Medicine in Microecology**. v. 16, 2023.

- SOUZA, Camila *et al.* Toxigenic profile of methicillin-sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* isolated from special groups. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 15, n. 9, 2016.
- STOGIOS, Peter; SAVCHENKO, Alexei. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein Science**. v. 29, iss. 3, p. 654-669, 2020.
- TAHAEL, Seyyed Askhan Senobar *et al.* Correlation Between Biofilm-Formation and the Antibiotic Resistant Phenotype in *Staphylococcus aureus* Isolates: A Laboratory-Based Study in Hungary and a Review of the Literature. **Infection Drug Resistance**. v. 14, p. 1155-1168, 2021.
- TOLISANDO, Ciro; DEL BUONO, Daniele. Biobased: Biostimulants and biogenic nanoparticles enter the scene. **Science of The Total Environment**. v. 885, n. 163912, 2023.
- TUFAIL, Muhammad *et al.* Biogenic Synthesis, Characterization and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles against Human Pathogens. **Biochemistry and Biotechnology**. v. 71, iss. 2, p. 257-265, 2022.
- WANG, Chong *et al.* Evolution of resistance mechanisms and biological characteristics of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* strains selected in vitro. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.
- WANG, Liangliang *et al.* A fibronectin-binding protein (FbpA) of *Weissella cibaria* inhibits colonization and infection of *Staphylococcus aureus* in mammary glands. **Cellular Microbiology**. v. 19, iss. 8, 2017.
- WEBER, David *et al.* Biofilms on medical instruments and surfaces: Do they interfere with instrument reprocessing and surface disinfection. **American Journal of Infection Control**. v. 51, iss. 11, p. 114-119, 2023.
- WIESE-POSSELT, Miriam *et al.* Appropriate antibiotic use and antimicrobial resistance: knowledge, attitudes and behaviour of medical students and their needs and preferences for learning. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v. 12, n. 48, 2023.
- WIETERS, Imke *et al.* Reported antibiotic use among patients in the multicenter ANDEMIA infectious diseases surveillance study in sub-saharan Africa. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. v. 13, n. 9, 2024.
- YAP, Cheng Hong *et al.* Synthesis and *Staphylococcus aureus* biofilm inhibitory activity of indolenine-substituted pyrazole and pyrimido[1,2-b]indazole derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 95, n. 117485, 2023.
- YOUNIS, Nancy; SEMARY, Nermin; MOHAMED, Maged. Silver nanoparticles green synthesis via cyanobacterium *Phormidium* sp.: characterization, wound healing, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 25, n. 7, p. 3083-3096, 2021.
- ZHENG, Miaoyan *et al.* Folic Acid Reduces Tau Phosphorylation by Regulating PP2A Methylation in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 4, 2017.

ANEXO – PERFIS DE RESISTÊNCIAS

Quadro anexo – Origem clínica, ano de isolamento e perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas utilizadas no estudo.

Cepa	Origem clínica	Ano de isolamento	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Referência
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	Infecção do ouvido externo	1943	ERY, CFX, CFZ, SXT	ATCC 2025
<i>K. quasipneumoniae</i> ATCC700603	Urina de paciente hospitalizado	1994	AMP, AMX, CFX, CFZ, SXT	ATCC 2025
<i>K. pneumoniae</i> KPC+	ND	ND	KPC	ND
<i>S. aureus</i> ATCC25923	Isolado clínico	1945	PEN	ATCC 2025
MRSA 16007	Sangue	2016	FOX, CIP, CLI, ERY (MDR)	Dominski et al 2024
MRSA 17022	Fragmento de osso	2017	FOX, CIP, CLI, ERY, GEN, RIF, SXT (MDR)	Dominski et al 2024
MRSA 17030	Sangue	2017	FOX, CIP(I), ERY	Dominski et al 2024
MRSA 17041	Sangue	2017	FOX, CIP, ERY	Dominski et al 2024
MRSA BMB9393	Sangue	1993	FOX, CIP, CLI, ERY, RIF, GEN, SXT (MDR)	Costa et al 2013
<i>P. aeruginosa</i> cepa clínica multirresistente	ND	ND	AMP, AMX, CLO, CPT, CTX, FOX, GEN, SXT (MDR)	ND

LEGENDA: ND: não disponível; AMP: ampicilina; AMX: amoxicilina; CIP: ciprofloxacino; CFX: cefalexina; CFZ: cefazolina; CLI: clindamicina; CLO: cloranfenicol; CPT: cefalotina; ERY: eritromicina; FOX: ceftioxima; PEN: penicilina G; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina; SXT: trimetoprima-sulfametoxazol. KPC: *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase; MDR: multirresistente a drogas, classificado quando a bactéria é resistente a pelos menos três classes diferentes de antimicrobianos, além da resistência aos beta-lactâmicos.

Fonte: elaborado pela autora