



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"



“Estudo dos efeitos das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*”

Rafael Bianchini Fulindi

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara

2020

“Estudo dos efeitos das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*”

Rafael Bianchini Fulindi

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara

2020

F963e

Fulindi, Rafael Bianchini.

Estudo dos efeitos das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* / Rafael Bianchini Fulindi. – Araraquara, 2020.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

1. Nanopartículas. 2. Biofilme Bacteriano. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Klebsiella oxytoca*. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Título.

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Adilson César Abreu Bernardi, nacionalidade brasileira, inscrito no CIC sob nº **099.025.598-08**, portador da cédula de identidade RG nº **16.872.477-SP**, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

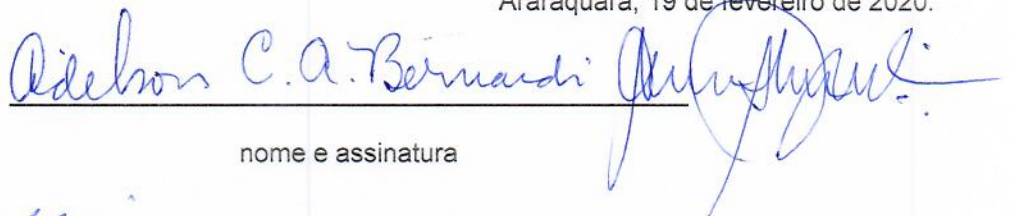
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.


nome e assinatura


TESTEMUNHA
Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA
Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Paulo Inácio da Costa, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº **02655172817**, portador da cédula de identidade RG nº **14.213.969-5**, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

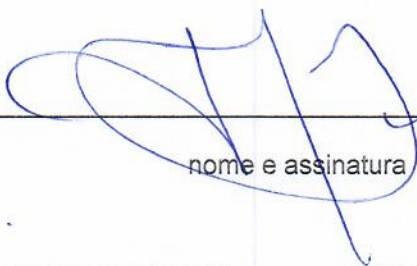
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.



nome e assinatura



TESTEMUNHA
Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA
Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Maria Luiza Silva Fazio, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº **255.738.828-99**, portador da cédula de identidade RG nº **24.503.485-7**, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.

Maria Luiza Silva Fazio
 MARIA LUIZA SILVA FAZIO
 nome e assinatura

TESTEMUNHA
 Nome: Aniele Vilella
 CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA
 Nome:
 CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Felipe de Almeida La Porta, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 088.438.046-77, portador da cédula de identidade RG nº 39.031.302-6, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

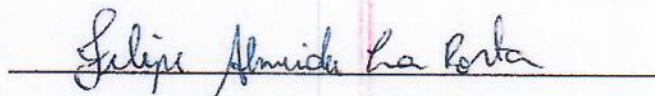
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.



Felipe de Almeida La Porta

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Felipe de Almeida La Porta, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 088.438.046-77, portador da cédula de identidade RG nº 39.031.302-6, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

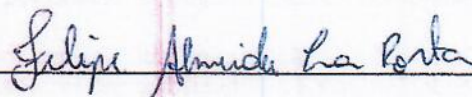
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.



Felipe de Almeida La Porta

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Juliana Domingues Rodrigues, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 316.870.738-48 portador da cédula de identidade RG nº 30.152.253-4, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella oxytoca**", desenvolvida pelo mestrando **RAFAEL BIANCHINI FULINDI** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

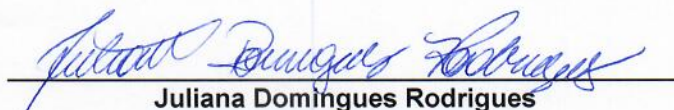
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.


Juliana Domingues Rodrigues

TESTEMUNHA

Nome: Aniele Vilella
CPF/MF: 368.997.328-74

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo dos efeitos das nanopartículas metálicas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes bacterianos e alterações metabólicas em *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*

AUTOR: RAFAEL BIANCHINI FULINDI

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA

Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FELIPE DE ALMEIDA LA PORTA

Departamento de Química / Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR/ Londrina

Prof. Dr. ADILSON CÉSAR ABREU BERNARDI

Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020

Agradecimentos Pessoais

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade.

Agradeço primeiramente a Deus pela realização deste sonho, agradeço a Ele pelo dom da vida, pela saúde e pela sua infinita graça (2 Cor 12:9). Agradeço a minha família, que sempre esteve ao meu lado em todas as escolhas que fiz na vida. Aos meus pais Edivaldo e Marisa, que me ensinaram os valores da vida e fazem tudo para realizar cada sonho que tenho. Todas as minhas vitórias devo a eles. Dedico essa conquista ao meu irmão Jonas, meu primeiro tutor no mundo acadêmico, pelo apoio desde os tempos de Física e além

À minha avó Maria Lurdes “Lurdinha” (*in memoria*) por não medir esforços para que eu fosse um dia chamado de “Doutor”.

Às companheiras de laboratório Rute Lopes, Moema Santana e Isabela Haddad pelo carinho, atenção e principalmente pela paciência, me ajudando a ser um pesquisador.

À Juliana Domingues Rodrigues pelos ensinamentos e atenção recebidos, desde “limpar um fluxo” até os desenhos didáticos das placas, com paciência fui ensinado a como entrar e sair de um laboratório.

À sessão técnica de pós-graduação, pessoas que sempre educadamente me atenderam e me ajudaram.

Aos demais amigos que a cidade de Araraquara me proporcionou, que são muitos, o meu muito obrigado.

Agradecimentos

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara e ao Departamento de Alimentos e Nutrição por todo carinho, atenção, suporte, confiança e fraternidade que eu recebi no decorrer deste projeto.

Ao meu Orientador Professor Doutor Paulo Inácio da Costa pela atenção, paciência, dedicação e carinho sempre presentes neste projeto e em outras áreas da minha jornada. Agradeço pelos conselhos, ensinamentos e principalmente pela sua sabedoria que fizeram a diferença na minha vida como pesquisador e como pessoa.

Ao Professor Doutor Adílson César Abreu Bernardi pelos conselhos, carinho e suporte como pesquisador e amigo.

À Professora Doutora Juliana Álvares Duarte Bonini Campos pela ajuda oferecida como amiga e coordenadora deste programa.

À Doutora Camila Cristina de Foggi pelas orientações, auxílio e ajuda nos momentos agudos deste trabalho.

“A Sorte Favorece os Audazes”

Alexandre, O Grande.

Resumo

Introdução: A formação de biofilmes é a capacidade que algumas bactérias têm para sobreviver em condições hostis. Esses biofilmes geram um ambiente que aumenta a resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* são exemplos de bactérias capazes de produzir biofilmes. As Nanopartículas estão surgindo como novas soluções antimicrobianas devido às suas propriedades sobre bactérias e biofilmes. **Objetivo:** Estudar o efeito das nanopartículas, Óxido de Zinco e Sulfeto de Zinco, sobre o crescimento bacteriano, Gram positiva *S. aureus* e Gram negativas *P. aeruginosa* e *K. oxytoca*, e formação de biofilmes. **Métodos:** Suspensões bacterianas em meio de cultivo líquido Müller-Hinton, contendo 10^2 - 10^8 UFC.mL⁻¹, foram tratadas com diferentes concentrações das NPs-Zn durante 24 horas a 37°C e, posteriormente, avaliadas quanto à viabilidade celular com XTT/Menadiona. O efeito bactericida foi analisado após cultivo de 24h a 37°C em placas contendo ágar Müller-Hinton e a concentração inibitória mínima obtida através dos dados analisados. A confirmação da atividade inibitória das nanopartículas de zinco sobre a formação de biofilmes foi realizada com auxílio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura à laser após determinação da concentração inibitória mínima para cada linhagem bacteriana estudada. **Resultados:** Aplicação das nanopartículas de óxido de zinco e, principalmente as de sulfeto de zinco, apresentaram efeitos inibidores da formação de biofilmes bacterianos, Gram positivas e negativas, a partir de inóculos contendo 10^5 e 10^3 UFC.mL⁻¹ respectivamente. As concentrações inibitórias e bactericidas das nanopartículas foram respectivamente, 1,0 mg.mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus* e de 4,0 mg.mL⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*. Nas concentrações das nanopartículas correspondentes a 50% de viabilidade os biofilmes demonstraram padrões irregulares de crescimento observados pela microscopia confocal. **Conclusão:** Estes resultados corroboram para a aplicabilidade de nanopartículas de óxido de zinco e sulfeto de zinco no revestimento de superfícies de recipientes industriais para conservação de alimentos ou em materiais de contato contínuo com epitélios, como sondas ou implantes crônicos; ambos com possibilidade de formação de biofilmes e desenvolvimento de infecções.

Palavras-chave: Nanopartículas; Biofilme Bacteriano; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella oxytoca*.

Abstract

Introduction: The formation of biofilms is the ability that some bacteria have to survive in hostile environments. These biofilms generate an environment that increases antimicrobial resistance. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella oxytoca* are examples of bacteria capable of producing biofilms. Nanoparticles are emerging as new antimicrobial solutions due to their properties on bacteria and biofilms. **Objective:** To study the effect of nanoparticles b(Zinc Oxide and Zinc Sulfide) on bacterial growth, Gram positive *S. aureus* and Gram negative *P. aeruginosa* and *K. oxytoca*, and biofilm formation. **Methods:** Bacterial suspensions in Müller-Hinton liquid culture medium, containing 10^2 - 10^8 CFU.mL⁻¹, were treated with different concentrations of NPs-Zn for 24 hours at 37 ° C and subsequently evaluated for cell viability with XTT / Menadione. The bactericidal effect was analyzed after 24-hour cultivation at 37°C in plates containing Müller-Hinton agar and the minimum inhibitory concentration obtained from the analyzed data. The confirmation of the inhibitory activity of zinc nanoparticles on biofilm formation was carried out with the aid of scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy after determining the minimum inhibitory concentration for each bacterial strain studied. **Results:** Application of zinc oxide nanoparticles and, especially those of zinc sulfide, showed inhibitory effects on the formation of bacterial biofilms, Gram positive and negative, from inoculants containing 10⁵ and 10³ UFC.mL⁻¹ respectively. The inhibitory and bactericidal concentrations of the nanoparticles were, respectively, 1.0 mg.mL⁻¹ for *Staphylococcus aureus* and 4.0 mg.mL⁻¹ for *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella oxytoca*. At concentrations of nanoparticles corresponding to 50% viability, biofilms showed irregular growth patterns observed by confocal microscopy. **Conclusion:** These results corroborate the applicability of zinc oxide and zinc sulfide nanoparticles in the coating of surfaces of industrial containers for food preservation or in continuous contact materials with epithelia, such as probes or chronic implants; both with the possibility of biofilm formation and development of infections.

Keywords: nanoparticles; Bacterial Biofilm; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella oxytoca*.

Lista de Abreviaturas

AI	Auto Indutores
AgNP	Nanopartícula de Prata
CACH	Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia
CAPES Superior	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMDF	Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais
CRD	Centro de Referência de Diagnóstico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPS	Substâncias poliméricas Extracelulares
FCFar	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
IC50	Half Maximal Inhibitory Concentration
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
K.o	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>K. Oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a laser
MDR	Cepas Microbianas Multirresistentes
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
NAC	Núcleo de Apoio à Comunidade
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NPs	Nanopartículas

Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PR	Paraná
QS	<i>Quorum sensing</i>
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCV	Teste de Cristal Violeta
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
ZnS	Sulfeto de Zinco

Lista de Figuras

Figura 01 – Esquematização da formação de biofilmes.....	14
Figura 02 – – Exemplo de locais onde o biofilme bacteriano apresenta um real problema à saúde (unidades de terapia intensiva, equipamentos de uso hospitalar, maquinas de diálise e etc) e às indústrias (encaixes, fissuras, canulações, roscas e etc). A – Catéteres de sonda nasogástricas; B – Indústria de laticíneos).....	16
Figura 03 – Fotomicrografia de <i>S. aureus</i> feita por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 vezes).....	17
Figura 04 – Fotomicrografia de <i>P. aeruginosa</i> por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 vezes).....	18
Figura 05 - Fotomicrografia de <i>K. oxytoca</i> feita por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 vezes).....	19
Figura 06 - Geometria dos clusters de ZnS. (a) Clusters Zn ₄ S ₄ e (b) Zn ₆ S ₆ foram selecionados para representar a mistura de zinco cúbica e a wurtzita hexagonal, respectivamente.....	22
Figura 07 - Estruturas de cristal de ZnO: rochas cúbicas (a), mistura de zinco cúbica (b) e Wurtzite hexagonal (c). As esferas cinza e preta sombreadas representam átomos de zinco e oxigênio respectivamente.....	23
Figura 08 – Reação de redução do sal de tetrazol no sistema óxido-redução NAD/NADH com participação do carreador de elétrons (CE).....	28
Figura 09 – Esquematização da metodologia de padronização do inóculo bacteriano.	28
Figura 10 – Esquematização da metodologia de plaqueamento.....	29
Figura 11 – Esquematização da diluição das nanopartículas.....	30
Figura 12 - Representação dos efeitos das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre as diferentes diluições bacterianas (A) e crescimento bacteriano em ágar MH (B).....	35
Figura 13 – Quantificação da viabilidade celular (%) dos biofilmes formados por <i>S. aureus</i> na presença de ZnO 1000 µg.mL ⁻¹	36
Figura 14 – Quantificação da viabilidade celular (%) dos biofilmes formados por <i>S. aureus</i> na presença de ZnO e ZnS a 500 µg.mL ⁻¹	36
Figura 15 – Viabilidade celular (%) de <i>S. aureus</i> tratada com ZnO e ZnS.....	37
Figura 16 – Viabilidade celular (%) de <i>P.aeruginosa tratada com ZnO e ZnS</i>	38

Figura 17 – Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas das Zn-Nps a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para <i>P. aeruginosa</i>	39
Figura 18 – Viabilidade celular (%) da <i>K.oxytoca</i> tratada com ZnO e ZnS.....	39
Figura 19 – Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas das Zn-Nps a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para <i>K. oxytoca</i>	40
Figura 20 – Determinação da massa (%) dos biofilmes formados por diferentes concentrações de <i>S. aureus</i> sob tratamento com ZnO e ZnS a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	41
Figura 21 – Massa do biofilme (%) de <i>S. aureus</i> tratada com ZnO e ZnS.....	41
Figura 22 – Determinação da massa (%) dos biofilmes formados por <i>P.aeruginosa</i> (A) e <i>K.oxytoca</i> (B) em função da concentração bacteriana na presença de ZnO a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	42
Figura 23 – Comparação entre as Zn-NPs na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para <i>P.aeruginosa</i> (<i>P.a</i>) e <i>K.oxytoca</i> (<i>K.o</i>).....	43
Figura 24 – Biofilme de <i>S.aureus</i> de 24 horas obtido por Microscopia Confocal de Varredura a laser Colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007.....	45
Figura 25 – Biofilmes de <i>K.oxytoca</i> e <i>P.aeruginosa</i> de 24 horas obtido por Microscopia Confocal de Varredura a laser, Colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007.....	45
Figura 26 – Biofilmes de <i>K.oxytoca</i> e <i>P.aeruginosa</i> de 24 horas obtido por Microscopia Confocal de Varredura a laser, Colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007.....	46
Figura 27 – Fotomicrografia por MEV das bactérias <i>S. aureus</i> (A), <i>K. oxytoca</i> (B) e <i>P. aeruginosa</i> (C) com aumento de 2.500; 7.000 e 20.000 vezes.....	47
Figura 28 – Fotomicrografia por MEV das bactérias <i>S. aureus</i> (A), <i>K. oxytoca</i> (B) e <i>P. aeruginosa</i> (C) após o tratamento de ZnO, com aumentos de 1.000 (I), 2.500(II) e 7.000 (III) vezes.....	49
Figura 29 – Fotomicrografia por MEV das bactérias <i>S. aureus</i> (A), <i>K. oxytoca</i> (B) e <i>P. aeruginosa</i> (C) após tratamento com ZnS, com aumentos de 1.000, 2.500 e 7.000 vezes.....	50

Lista de Imagens

- Imagem representativa 01:** Óxido de Zinco (A), tamanho de aproximadamente 500 μm ; Sulfeto de Zinco (B), tamanho aproximadamente de 150 μm27
- Imagem representativa 02** – Estrutura do corpo de prova de acrílico.....35

Sumário

Resumo	6
Abstract.....	7
Lista de Abreviaturas	8
Lista de Figuras.....	10
Lista de Imagens.....	12
I. Introdução	15
2.0 Objetivos	26
3.0 Material e Métodos	27
3.1 Obtenção das Nanopartículas de Zinco.....	27
3.2 Obtenção das Cepas Bacterianas	28
3.3 Padronização do inóculo bacteriano	28
3.4 Preparação dos inóculos bacterianos	28
3.5 Padronização das suspensões da NPs ZnS e ZnO	29
3.6 Formação dos biofilmes bacterianos sobre superfície de poliestireno.	29
3.6.1 Desenvolvimento do teste de XTT – Viabilidade celular	29
3.6.1.1 Preparo do XTT	29
3.6.1.2 Padronização da Concentração Inicial bacteriana e tratamento com NPs	30
3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas sobre a formação de biofilmes em substrato de poliestireno.....	31
3.7.1 Diluição das NPs.....	31
3.8 Quantificação do biofilme.....	32
3.8.1 Teste do Cristal Violeta – TCV	32
3.9 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	33
3.10 Microscopia eletrônica de varredura - MEV	34
4.0 Análise Estatística.....	35
5.0 Resultados e Discussão	36

5.1 Triagem Inicial	36
5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas ..	38
5.2 Avaliação da Massa de Crescimento Bacteriano: Teste do Cristal Violeta - TCV	42
5.3 Avaliação da Qualidade dos Biofilmes Bacterianos por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	46
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
IV Considerações finais	53
Referências	54

I. Introdução

A percepção de mundo tem sido alterada através dos séculos. Descobertas feitas pela ciência no campo da astronomia começaram a mudar a visão de como o ser humano enxerga a si mesmo e ao resto do mundo. O mundo microscópico foi um dos importantes passos para o desenvolvimento e evolução da humanidade, assim, o marco histórico para tal foi o primeiro microscópio e, assim, o início da caminhada da ciência rumo ao mundo que até outrora era inimaginável. O primeiro pesquisador a visualizar esses seres foi o comerciante e microscopista amador holandês Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) (1). Ele descobriu “animáculos” no tártaro de seus próprios dentes e mesmo após uma limpeza robusta, esse remanescente opaco ainda era espesso e continha vários de várias formas, o que hoje é conhecido como placa dentária, sendo a primeira evidência documentada da existência de biofilmes microbianos (1,2). Apesar dessas importantes evidências, somente no início dos anos de 1940 que o conhecido “Efeito Garrafa” em microrganismos marinhos foi observado por H. Heukelekian e A. Heller (3), onde o crescimento bacteriano aumentava consideravelmente quando este era disposto sobre uma superfície, comprovando assim a formação do biofilme.

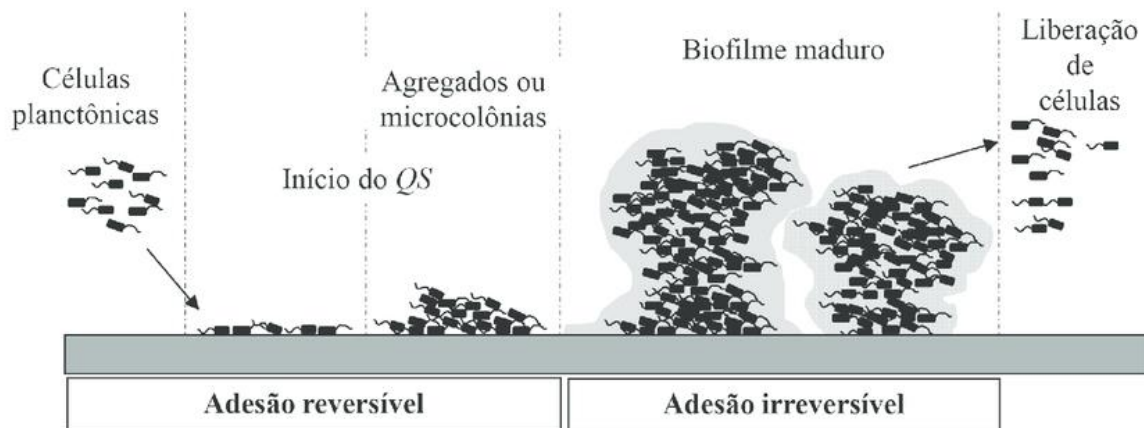
Antes de 1978, os biofilmes haviam sido descritos em poucos sistemas, mas a proporção de bactérias em um determinado ecossistema que crescia nessas populações aderentes não era geralmente determinada. Em 1978, Geesey, Iwaoka e Griffiths (4) adaptaram uma série de métodos de recuperação quantitativa para determinar as bactérias de biofilmes em um riacho de montanha e comparar seus números e sua atividade com os de bactérias livres do mesmo sistema aquático (4,5). A partir deste momento percebeu-se, com base em análises detalhadas de centenas de sistemas aquáticos, que as populações bacterianas presentes em biofilmes predominavam com nutrientes suficientes, independente da geometria do sistema ou do tipo do ecossistema. Ao extrapolar essas observações para o organismo humano, notou-se que os fluidos corporais poderiam fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano e, portanto, foi previsto que a maioria das superfícies ou plásticas de dispositivos médicos poderia estar repleta de biofilmes na presença de bactérias. Nos dias de hoje sabe-se que essa previsão era real, assim, na indústria de alimentos e em dispositivos de uso crônico como

cateteres e outros equipamentos da área médica, a formação de biofilme tem se tornado um problema real (6–8).

Os biofilmes possibilitam a formação de um ambiente que aumenta a resistência antimicrobiana. As substâncias poliméricas extracelulares contêm consideráveis quantidades de polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (9); as quais são responsáveis por manter a integridade estrutural do biofilme e proporcionar uma matriz ideal para o crescimento das células. Ainda, as interações intercelulares servem para fortalecer a estabilidade mecânica das substâncias poliméricas extracelulares e a sobrevivência dos microrganismos (10).

Bactérias em suas formas planctônicas circulam livres e isoladamente, e quando aderem a uma superfície, sendo esta biótica ou abiótica, formam os biofilmes (ou células sésseis) (Figura 01) (9,10).

Figura 01 – Esquemática da formação de biofilmes. Células Livres (plantônicas) se aderem a uma superfície e dá-se início ao *Quorum Sensing*. Após a adesão irreversível e maturação do biofilme, ocorre a liberação de células bacterianas que realizarão o ciclo novamente.



Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

A origem do biofilme ocorre após a transição da união reversível de células planctônicas, para o estado irreversível com a produção de biopolímero extracelular produzido pelo próprio microrganismo, e posteriormente, contribuindo para a formação de microcolônias dentro do biofilme maduro e aderência em superfícies (13). As forças atrativas e repulsivas entre a superfície e os microrganismos, estão envolvidas com a adesão de bactéria à superfície, incluindo as forças de Van Der Waals e forças eletrostáticas, além de ligações iônicas e forças hidrofóbicas. A

adesão irreversível ocorre quando as forças atrativas são maiores do que as forças de repulsão (14).

No interior dessas microcolônias são formadas estruturas tridimensionais complexas como canais de água e poros, onde a densidade populacional do biofilme é controlada e quando este atinge seu limite, ocorre a dispersão celular para o ambiente circulante com o retorno bacteriano para o estado planctônico (15).

O biofilme confere uma resistência às variações ambientais, incluindo antibióticos e resposta imune do hospedeiro (16). As substâncias poliméricas extracelulares (EPS) contêm consideráveis quantidades de polissacarídeos, ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos, e estas substâncias são responsáveis por manter a integridade estrutural do biofilme. As interações intercelulares servem para fortalecer a estabilidade mecânica das EPS e a sobrevivência dos microrganismos (17).

As comunicações intra e interespecies microbianas são realizadas de forma complexa, coordenada e de modo unificado, sendo o termo usado para descrever este processo de comunicação denominado *Quorum Sensing* (QS) (16). O QS trata-se de um recurso onde bactérias são capazes de se comunicar atuando como unidades multicelulares. Este processo consiste na produção, liberação e detecção de moléculas de sinalização química e regulação da expressão gênica. Os sinais químicos de comunicação entre os microrganismos são denominados auto indutores (AI), as moléculas de sinalização química são produzidas no interior do citoplasma, segregadas para dentro da matriz extracelular, e acumulam-se nas suas imediações. As bactérias podem responder a uma grande variedade de moléculas de sinalização químicas produzidas pelas mesmas espécies, bem como outros gêneros de bactérias, proporcionando uma plataforma para interespecies. As interações interespecies são facilitadas por moléculas de sinalização como proteínas, RNAs e enzimas de sinalização (18,19).

A produção de biofilmes por bactérias encontradas no dia a dia representam constante perigo a saúde da população (20). Os biofilmes bacterianos representam um constante risco em ambientes hospitalares, principalmente para pacientes submetidos a canulações crônicas principalmente para alimentação via sondas enterais, veiculação de fármacos ou de drenagens (21).

As infecções bacterianas afetam cerca de 300 milhões de pessoas por ano no mundo, destas, dois milhões resultam em óbito em crianças. A resistência

bacteriana aos efeitos dos agentes antimicrobianos é atualmente uma séria questão de saúde pública, pois essas bactérias multirresistentes são mais difíceis de serem controladas (22,23). Esse aumento limita a abordagem terapêutica aos pacientes, provocando um aumento na probabilidade de falha do tratamento com antibióticos e a possível morte dos indivíduos (23). Além de doenças agudas, as infecções bacterianas podem resultar em doenças crônicas, principalmente como consequência da formação de comunidades bacterianas estruturadas em complexas matrizes exopolissacarídicas, denominadas de biofilmes. A complexidade da matriz do biofilme faz com que doenças associadas a este polímero sejam clinicamente mais desafiadoras tanto no diagnóstico quanto no tratamento (24). A produção de biofilmes por bactérias representam constante perigo à saúde humana e animal e prejuízos à indústria alimentícia (Figura 02) (20). Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiela oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonela ssp.* e *Listeria monocytogenes* formam biofilmes e representam um perigo à integridade dos alimentos e conseqüentemente aos consumidores (21).

Figura 02 – Exemplo de locais onde o biofilme bacteriano apresenta um real problema à saúde (unidades de terapia intensiva, equipamentos de uso hospitalar, maquinas de diálise e etc) e às indústrias (encaixes, fissuras, canulações, roscas e etc). A – Catéteres de sonda nasogástricas; B – Indústria de laticíneos

A



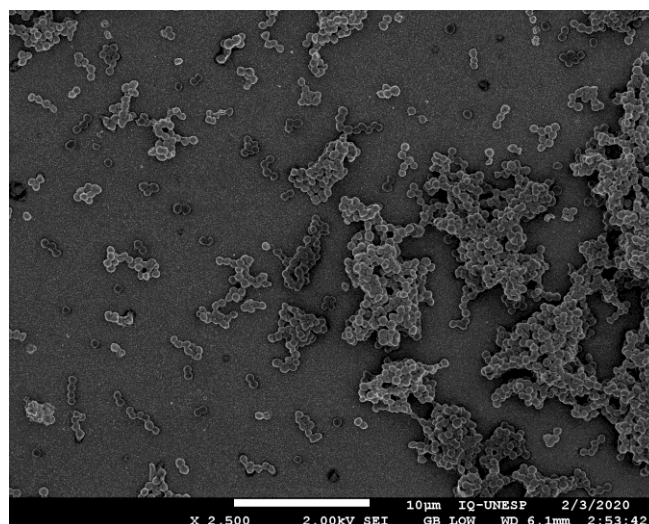
B



Entre as bactérias Gram (+), *S. aureus*, é uma bactéria comumente encontrada na microbiota da pele humana. *Staphylo* descreve o arranjo em cacho das células desta bactéria; coccus indica que as células têm a forma semelhante a esferas. O *S. aureus* são Gram, catalase e coagulase positivos, imóveis, não esporulados e podem ser observados em agrupamentos irregulares semelhantes a “cachos de uva” (25). Biofilmes de *S. aureus* podem ser encontrados em sondas e

cateteres (cateter venoso central de acesso à nutrição parenteral e hemodiálise), em implantes de dispositivos cardíacos, pacientes em unidades de terapia intensiva, incluindo unidades de terapia neonatal. Também é responsável por causar infecções cutâneas crônicas como foliculite, impetigo, e até infecções sistêmicas provocadas pela bacteremia e também é causador de intoxicação alimentar (26–30). É o patógeno humano mais importante do gênero *Staphylococcus*, sendo que as cepas de *S. aureus* multirresistentes ou meticilina resistentes (MRSA) são mais comuns em ambientes hospitalares. Espécie caracterizada por ser termo resistente, não formadora de esporos, e que sobrevive por longos períodos (31). Apesar de ser encontrado na microbiota da pele e mucosa nasal de indivíduos saudáveis, é uma bactéria de interesse que pode estar associada com diversas infecções hospitalares, quando as barreiras naturais do hospedeiro são comprometidas por algum trauma ou cirurgia (32). Biofilmes de *S. aureus* podem ser encontrados em sondas e cateteres (cateter venoso central de acesso à nutrição parenteral e hemodiálise) em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (7). Pode causar diversos processos infecciosos em certos grupos de pessoas com maior risco, que inclui portadores de condições crônicas como: pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA); diabéticos; pacientes com insuficiência renal submetidos à diálise ou hemodiálise; e, queimados. Além de ser uma bactéria causadora de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), responsável por grande parte dos surtos destas doenças no Brasil e no mundo pois a produção do biofilme aproveita-se de moléculas orgânicas dos alimentos para se fixar estruturalmente (Figura 03).

Figura 03 – Fotomicrografia de *S. aureus* feita por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 Vezes)

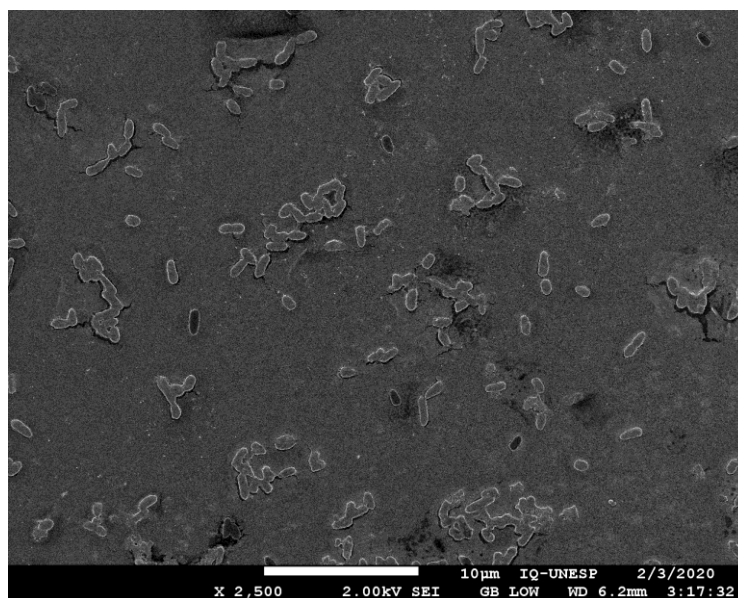


Fonte: Autoria Própria.

O *S. aureus* ressurgiu como clinicamente relevante devido a sua resistência a antibióticos, MRSA, e aumento na produção de toxinas e biofilmes (33). A virulência do *S. aureus* está associada à capacidade de produção de toxinas, por exemplo, a coagulase A, e os próprios componentes da superfície celular, como a cápsula e proteínas que o protegem contra a fagocitose (34).

Outro gênero bacteriano de importância clínica e na indústria alimentícia produtora de biofilmes, Gram (-) é o gênero das *Pseudomonas*. Pertencente à família das *Pseudomonadaceae*, é Gram-negativa, aeróbia, não formadora de endosporos, possui a forma de bastonete reto ou ligeiramente curvo e, principalmente, um modo de inserção polar dos flagelos que lhe confere mobilidade (25). A *P. aeruginosa* pode ser encontrada na maior parte dos tecidos e ambientes existentes, desde plantas, tecido mamário, comida pronta para consumo, lesões teciduais e superfícies (35,36). Presente também na indústria de laticínios, no leite cru e tanques de aço inox, a *P. aeruginosa* tem como características fornecer abrigo e auxiliar no crescimento e desenvolvimento de biofilmes de outras bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, que é um patógeno alimentar psicotrófico associado também à indústria de laticínios (37,38) (Figura 04).

Figura 04 – Fotomicrografia de *P. aeruginosa* por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 vezes).

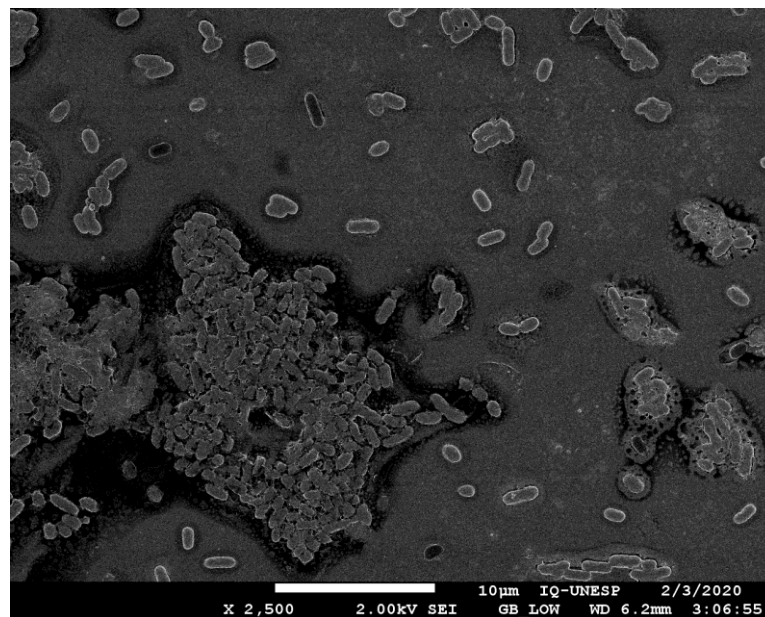


Fonte: Autoria Própria.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* participam dos processos de adesão e formação de biofilmes, ocasionando sérios prejuízos às diferentes superfícies de ambientes alimentares, domésticos e industriais. Na indústria de alimentos, constituem riscos higiênico-sanitários e causam perdas econômicas (39,40); enquanto que na medicina, contribuem para o aumento de riscos de infecções devido a sua capacidade de adesão e crescimento em cateteres e outros dispositivos (7,41).

Outro importante patógeno associado às indústrias alimentícia e biomédica é a bactéria do gênero *Klebsiella*. Pertencente à família das enterobacteriaceae, possui formato bacilar, Gram-negativa, aeróbia e anaeróbia facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, não-movel e capsulada. Ocorre normalmente no trato gastrointestinal, em isolamentos clínicos, na água, no solo, em vegetais, frutas e nos cereais (42). Uma das principais espécies desse gênero é a *K.oxytoca* (Figura 05), que apresenta atualmente um problema na indústria de laticínios e de produtos alimentícios, sendo utilizada, juntamente com outras bactérias, como indicador de higiene em processamento de produtos alimentícios (43).

Figura 05 - Fotomicrografia de *K. oxytoca* feita por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 2.500 vezes).



Fonte: Autoria Própria

Na busca por novas substâncias antimicrobianas que não desencadeiam resistência bacteriana, as nanopartículas (NPs) são uma realidade na área biotecnológica devido às suas propriedades físicas e químicas únicas e da possibilidade de sua preparação em nanoescala fundamentais tanto para controle do crescimento bacteriano flutuante, planctônico, quanto sésil (biofilmes) (44).

O termo nanotecnologia foi introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi, para especificar uma nova tecnologia além do controle de materiais e da engenharia em escala micro. Anteriormente, a microtecnologia era o limite da ciência em escalas menores. O sonho da manipulação em nano escala é antigo, o físico Richard Feynman já havia dito que a microtecnologia era um limite para ser forçado à baixo como as fronteiras da alta pressão, baixa temperatura ou o alto vácuo. Em 1959 na marcante palestra "There's Plenty of Room at the Bottom" ("Há muito espaço na parte inferior" em tradução livre), o físico sugere que máquinas normais poderiam construir máquinas menores, que por sua vez, construiriam máquinas cada vez menores, trabalhando passo a passo para atingir o nível molecular (45). Atualmente o termo está mais adaptado após a sua popularização por Eric Drexler, que corresponde à metodologia de processamento envolvendo a manipulação átomo a átomo (46). Assim, a nanotecnologia refere-se ao estudo de fenômenos e manipulações de sistemas físicos em uma escala conhecida como nano (10^{-9} m = 1 nm) com dimensões típicas que não excedam 100 nm em pelo menos uma dimensão. Portanto, a nanotecnologia foca o projeto, caracterização, produção e aplicação de sistemas e componentes em nano escala (47).

A nanotecnologia integra diversas disciplinas como a física, química, biotecnologia e engenharia. Nano materiais ou materiais nano estruturados exibem características diferentes das apresentadas em escala típica (48). Nesse nível, as propriedades e funções dos sistemas vivos e antropogênicos são redefinidas, as estruturas exibem propriedades físico-químicas e biológicas consideravelmente novas e melhoradas, bem como fenômenos e funcionalidades distintas como resultado do tamanho da nano escala. Esse tamanho em nano escala geralmente confere maiores áreas de superfície às nanopartículas (NPs) em comparação com partículas de tamanho macro (49). As NPs são conhecidas como partículas controladas ou manipuladas no nível atômico (1-100 nm). Eles mostram propriedades relacionadas ao tamanho significativamente diferente dos materiais a

granel. Dado ao seu pequeno tamanho, as NPs têm estruturas maiores em comparação com suas contrapartes. Esta propriedade distinta permite aplicação em muitas áreas (50).

Na agricultura, a nanotecnologia gera uma esperança, já que a inovação contínua é fortemente necessária devido ao aumento dos desafios globais de segurança alimentar e mudança climática. No passado, a agricultura se beneficiou de muitas inovações tecnológicas, incluindo variedades híbridas, produtos químicos sintéticos e biotecnologia, e os cientistas agora buscam na nanotecnologia uma nova fonte para melhorias agrícolas (51). A medicina moderna utiliza a nanotecnologia desde a detecção de patógenos a veículos de fármacos. Recentemente, a remoção de uma vasta gama de patógenos foi demonstrada utilizando um dispositivo de diálise extracorpórea; o tempo de contato entre o fluido e as esferas magnéticas fica limitado a alguns minutos. O princípio por trás desta técnica de separação e purificação sanguínea é que as partículas magnéticas executam um papel de se ligar a patógenos e assim, posteriormente, removidos por separação magnética (52). O uso da nanotecnologia na segurança alimentar ganhou atenção crescente. Os sistemas de detecção baseados na nanotecnologia variam em seus mecanismos e projetos, mas compartilham o mesmo objetivo: detecção oportuna e precisa de patógenos, traços ou outros contaminantes (53).

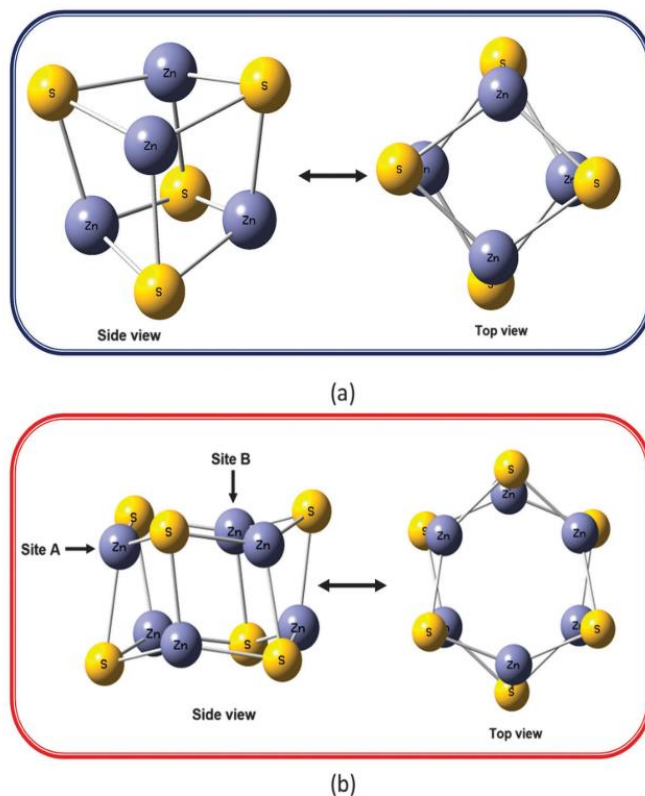
A maioria das indústrias tem se beneficiado com as descobertas inovadoras advindas da nanotecnologia. O consumidor irá se beneficiar pela diversidade de produtos produzidos pela nanotecnologia que melhoraram a qualidade de vida das pessoas em todo o mundo. Esforços consideráveis estão sendo dedicados ao projeto e fabricação de estruturas de biomateriais em nano escala sintéticas capazes de atuar em nível molecular. Para atender a essas expectativas, os pesquisadores estão tentando desenvolver e empregar uma variedade de nano materiais, como pontos quânticos semicondutores, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de sílica (53,54).

As NPs vêm despertando um singular interesse devido ao seu amplo espectro de aplicação com novos biofármacos. Algumas partículas apresentam características antissépticas e antimicrobianas (55). Entre as NPs mais comuns no controle do crescimento microbiano destacam-se as de zinco (óxido de zinco) e de

prata (AgNPs) (49,56). Por outro lado, nenhum relato tem sido feito em relação às nanopartículas contendo de sulfeto de zinco (NP-ZnS).

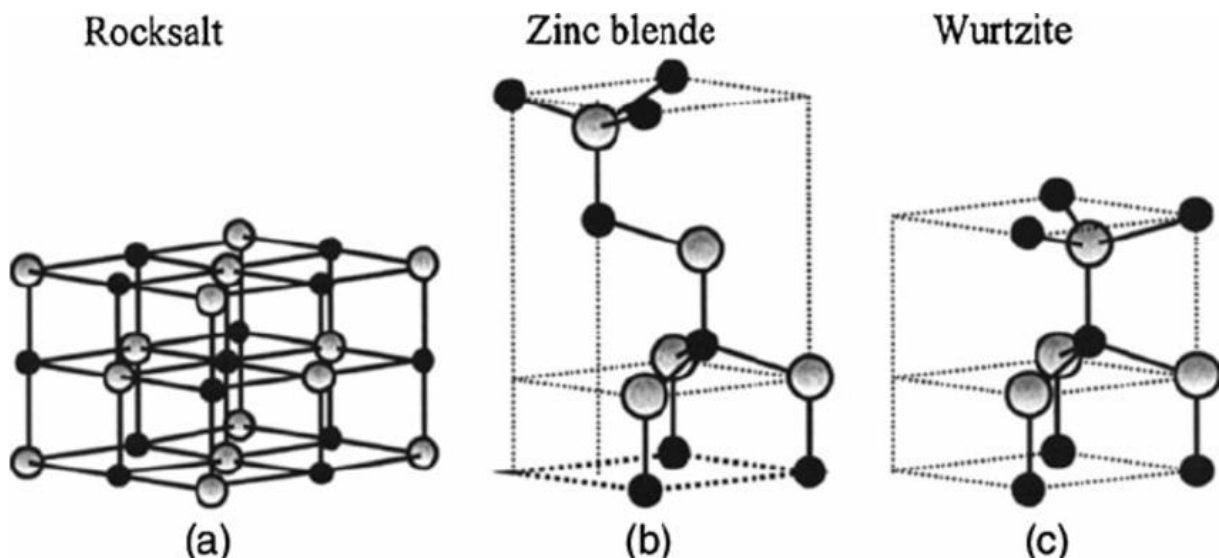
O ZnS é um composto inorgânico, com propriedade semicondutora, apresentado diferentes aplicações em eletrônica, sensores e *lasers*. Possui propriedades catalíticas, fosforescentes e eletroluminescentes (57). O interesse pelos nanomateriais de Sulfeto de Zinco (ZnS) vem aumentando principalmente pelas suas aplicações em diferentes áreas como dispositivos luminescentes optoeletrônicos e células fotovoltaicas (58). A maneira que os nanocristais de ZnS podem ser feitos e ajustados além de fornecer as propriedades físicas importantes também é crucial para desenvolvê-las em blocos de construção de futuros dispositivos (59). Como as demais NPs, as NPs-ZnS também possuem propriedades diferenciadas quando em escala nanométrica, devido à elevada área superficial e ao tamanho estas NPs são usadas em diferentes aplicações inclusive como marcadores celulares (Figura 06). Porém, ainda não existem muitos relatos acerca das NPs-ZnS em relação a sua possível atividade antimicrobiana (59,60).

Figura 06 - Geometria dos clusters de ZnS. (a) Clusters Zn_4S_4 e (b) Zn_6S_6 foram selecionados para representar a mistura de zinco cúbica e a wurtzita hexagonal, respectivamente.



Por outro lado, as NPs-ZnO pertencem ao grupo de semicondutores do tipo *n* e *band gap*, quando puras, apresentam coloração branca (61). O óxido de zinco (ZnO) é um material promissor na área da nanotecnologia devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas, como as ações bactericida e fungicida importantes (62,63). Muito do que se tem relato sobre o uso de NPs inorgânicas de óxidos de zinco como bactericidas, na literatura, diz respeito às suas vantagens como: maior eficácia bactericida sobre cepas microbianas multirresistentes (MDR); potencial aplicável à terapêutica e uma promissora alternativa em substituição aos antibióticos, embora apresente uma toxicidade seletiva para os sistemas biológicos (Figura 07) (64).

Figura 07 - Estruturas de cristal de ZnO: rochas cúbicas (a), mistura de zinco cúbica (b) e Wurtzite hexagonal (c). As esferas cinza e preta sombreadas representam átomos de zinco e oxigênio respectivamente.



Fonte: Özgür et al. (2005)

A compreensão do conceito de biofilmes microbianos e de aspectos inerentes a sua estrutura e composição, bem como seu processo de formação são fundamentais para desenvolver estratégias de controles efetivos; além de permitir o entendimento dos riscos que tais estruturas produzem: à indústria de alimentos (corrosão de equipamentos e contaminação de alimentos), aos alimentos e alteração

de suas propriedades nutricionais, à toxinfecção alimentar, resistência aos sanitizantes e aos antibióticos, resistência ao sistema imunológico com possibilidade de bacteremia e septicemia, e, portanto, o alto risco à saúde humana e animal (65–68).

Assim, propõe-se estudar os efeitos das NPs de Óxido e Sulfeto de Zinco sobre a inibição do crescimento bacteriano e formação de biofilmes de *S. aureus*, *P.aeruginosa* e *K.oxytoca*.

2.0 Objetivos

Estudar o efeito das nanopartículas ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes e metabolismo energético bacteriano de bactérias Gram (+) *S. aureus* e Gram (-) *P. aeruginosa* e *K. oxytoca*.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar as sensibilidades bacterianas frente aos diferentes tratamentos com as suspensões de NP-Zn;
- Avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas de ZnO e ZnS sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. oxytoca* em superfícies de poliestireno;
- Avaliar por fluorescência em microscopia confocal as estruturas dos biofilmes formados na presença e ausência das NP-Zn e principais alterações metabólicas dos biofilmes tratados;
- Avaliar por Microscopia eletrônica de varredura as estruturas dos biofilmes formados na presença e ausência das NP-Zn em superfície de poliestireno.

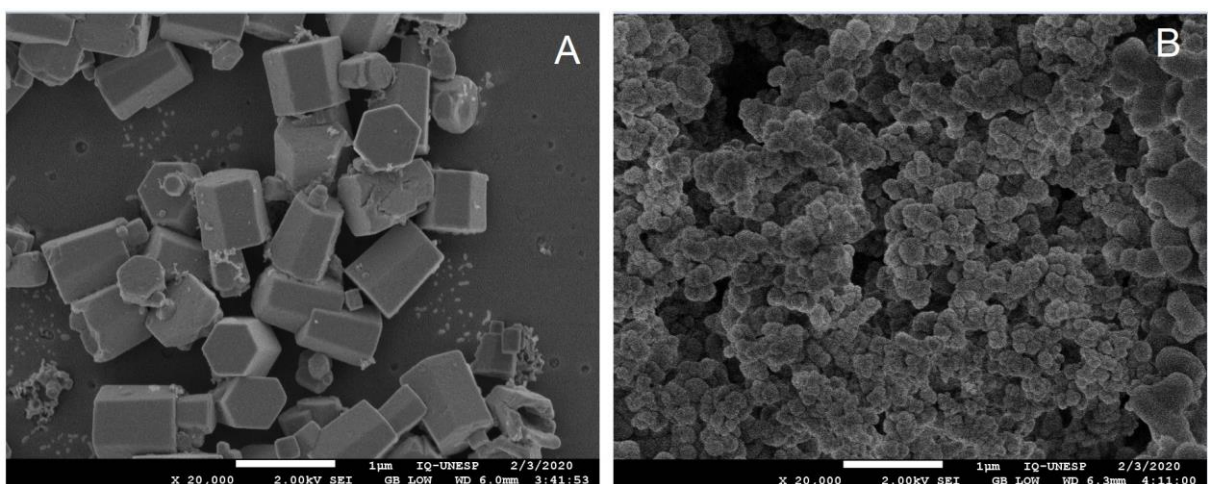
3.0 Material e Métodos

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia Clínica do Centro de Referência Diagnóstica “Prof. Dr. Antônio Longo” (CRD) da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia (CACH-NAC-FCF) e Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular do Departamento de Análises Clínicas e CACH da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) – Unesp Araraquara – S.P.

3.1 Obtenção das Nanopartículas de Zinco

As nanopartículas de ZnO e ZnS (imagem representativa) estudadas neste trabalho foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelos seguintes professores: ZnO, Profa. Dra. Maria Aparecida Zaghete Bertochi, do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CMDf), Depto. de Tecnologia Química, Instituto de Química de Araraquara – Unesp; e o ZnS, Prof. Dr. Felipe de Almeida La Porta, Grupo de Nanotecnologia e Química Computacional, Depto. de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina – PR.

Imagem representativa 01: Óxido de Zinco (A), tamanho de aproximadamente 500µm; Sulfeto de Zinco (B), tamanho aproximadamente de 150 µm.



Fonte: Autoria própria

3.2 Obtenção das Cepas Bacterianas

As cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. oxytoca* ATCC 13182 foram mantidas em estoque no laboratório de Microbiologia Clínica-CACH-NAC-FCF-UNESP/CAr. e semeadas em placas contendo ágar Müller-Hinton para reativação dos microrganismos.

3.3 Padronização do inóculo bacteriano

As cepas plaqueadas conforme item 3.2, foram reativadas em ágar Müeller-Hinton, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após este período, com auxílio de uma alça de inoculação estéril, colônias isoladas e uniformes foram transferidas para um tubo cônico contendo 10mL de caldo Müeller Hinton esterilizado, para a obtenção de uma suspensão bacteriana com base na escala nefelométrica de *Mc Farland* 0,5. A turbidez do inóculo bacteriano foi verificada medindo a absorvância da suspensão em espectrofotômetro até que atingisse uma $DO_{625\text{ nm}}$ entre 0.08–0.13, correspondendo a 10^8 UFC.mL⁻¹ (69).

3.4 Preparação dos inóculos bacterianos

Para avaliar se os efeitos das NPs eram dependentes da quantidade de bactéria (UFCs), a suspensão bacteriana foi submetida a diluição seriada de forma a apresentar de 10^8 a 10 UFC.mL⁻¹. Resumidamente, em nove tubos cônicos foram acrescentados 9 mL do Caldo Müeller Hinton esterilizados e, a partir do inóculo preparado (correspondendo a 0,5 da escala *Mc Farland* ou 10^8 UFC.mL⁻¹ pela $DO_{625\text{ nm}}$)(70) foi transferido 1mL para o tubo 1, 1:10, contendo aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹, e assim, sucessivamente foi transferido 1mL para cada tubo subsequente; no ultimo tubo (tubo 9) a quantidade de bactérias foi de aproximadamente 10 UFC.mL⁻¹. Para a confirmação das quantidades bacterianas em cada tubo, uma alíquota de cada tubo foi plaqueada com auxílio de uma alça de inoculação calibrada de 10µL, por método de espalhamento em placas contendo ágar Müeller-Hinton esterilizado. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a contagem foi feita na placa que apresentou de 30 a 300 UFC para confirmação da padronização (25,70).

3.5 Padronização das suspensões da NPs ZnS e ZnO

As nanopartículas foram suspensas em dimetilsulfóxido (DMSO), dispersadas por sonicação (3 ciclos de 40% - Sonics & materials INC, VibraCell™) com homogeneizador ultrassônico e armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, caracterizando a suspensão estoque (1000 e 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Gram (+) e Gram (-) respectivamente). Esta suspensão foi utilizada para o preparo das concentrações utilizadas neste trabalho. As suspensões de uso das diferentes nanopartículas foram adicionadas em caldo Müller-Hinton.

3.6 Formação dos biofilmes bacterianos sobre superfície de poliestireno.

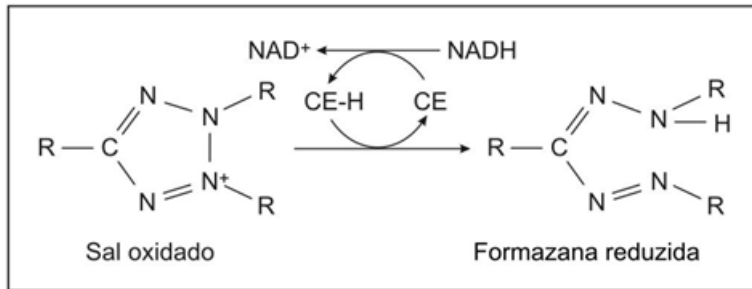
Para avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre o crescimento a formação de biofilmes bacterianos, uma concentração inicial das NPs de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi avaliada sobre biofilme de *S.aureus*. Este teste foi importante para ajustar as condições de crescimento bacteriano na microplaca e também para o tratamento com as NPs.

3.6.1 Desenvolvimento do teste de XTT – Viabilidade celular

3.6.1.1 Preparo do XTT

O teste de viabilidade celular pelo teste do XTT foi realizado conforme descrito por Peeters, Nelis e Coenye (2008). O XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) é um sal tetrazolico que pela ação de enzima desidrogenase mitocondrial dependente de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida - doador de elétrons) é reduzido a um composto formazana (Figura 08) que absorve luz no comprimento de onda de 490nm. A preparação da solução estoque de XTT (Sigma) é feita pela solubilização de 4mg do sal em 10mL de PBS 5mM, pH=7,2, preaquecido a 37°C. Esta solução é suplementada com 100 μL de menadiona (carreador de elétrons-CE) estoque preparada pela solubilização de 55mg de bissulfato de sódio menadiona (Sigma) em 100mL de acetona. O teste de viabilidade bacteriana, planctônica ou biofilme, por poço da microplaca, é feito pela adição de 100 μL de PBS e 100 μL da solução de XTT-menadiona, com incubação de 5 horas a 37°C ao abrigo da luz. A absorbância é lida em 490nm (71).

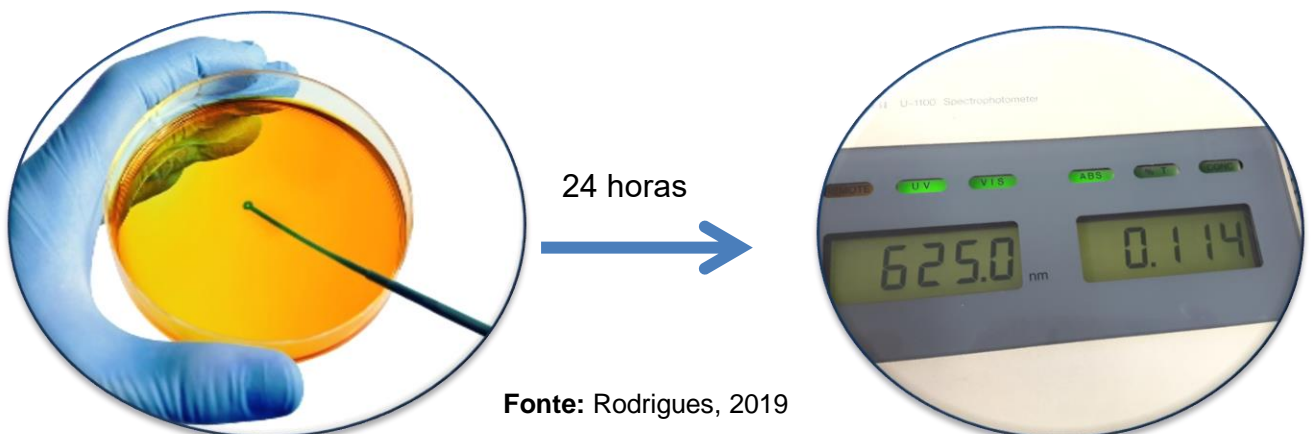
Figura 08 – Reação de redução do sal de tetrazol no sistema óxido-redução NAD/NADH com participação do carreador de elétrons (CE).



3.6.1.2 Padronização da Concentração Inicial bacteriana e tratamento com NPs

Uma alíquota de 100 μ L de cada suspensão preparada conforme item do inóculo bacteriano realizada anteriormente foi inoculado, posteriormente, acrescentado 100 μ L das NPs solubilizada em caldo de Mueller-Hinton. Interferente: uma alíquota de 100 μ L de Caldo Mueller Hinton com 100 μ L da nanopartícula. Controle positivo: uma alíquota de 100 μ L de inóculo bacteriano correspondente a escala meio *Mc Farland*, com 100 μ L de DMSO 1%. Controle negativo: alíquota de 100 μ L de inóculo bacteriano correspondente a escala meio *Mc Farland*, com 100 μ L de Mueller-Hinton. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 h. Posteriormente, um ensaio de viabilidade celular foi realizado com o XTT (72). Após o ensaio de viabilidade, a absorbância da placa da reação foi lida na absorbância de 490 nm (Elx800 – BioTek) e os dados foram analisados para a determinação da melhor concentração inicial de NPs. Um controle foi desenvolvido sem a adição da bactéria, neste caso denominado branco de reação, com o objetivo de subtrair o efeito background de cada poço de reação (Figura 09) (70).

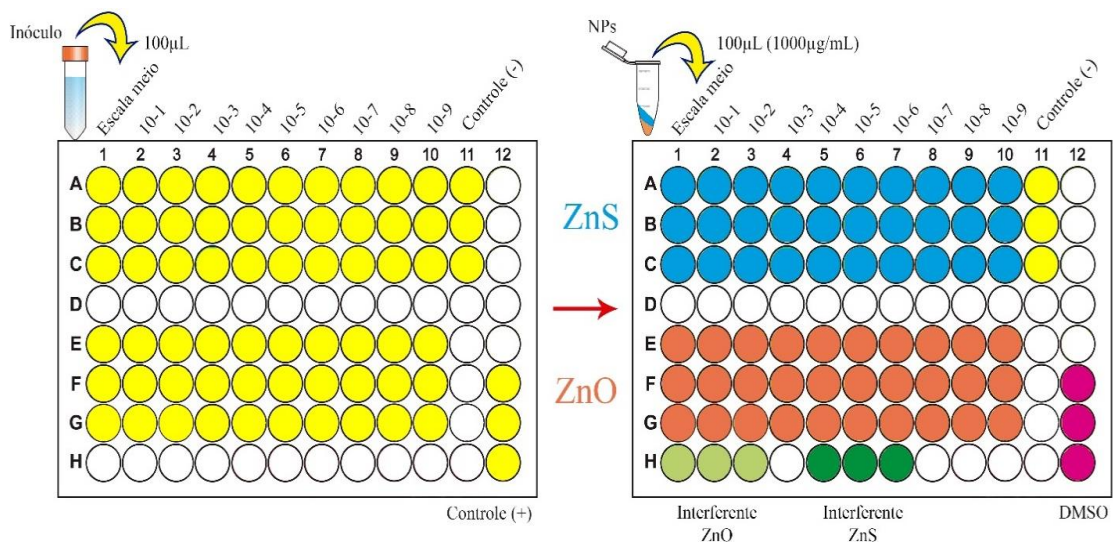
Figura 09 – Esquematização da metodologia de padronização do inóculo bacteriano



3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas sobre a formação de biofilmes em substrato de poliestireno

Os ensaios da concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas foram realizados de acordo com a diluição do inóculo que apresentou atividade antibacteriana na triagem inicial (após tratamento estatístico para a certificação da diluição ideal) (69). Os poços da microplaca foram preenchidos com 100 μL de caldo Müller-Hinton. Uma suspensão inicial (para *S.aureus*) de NP a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada previamente com a concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada em caldo Müller-Hinton. Desta solução contendo as NPs, por poço, foram adicionados 100 μL nos poços da coluna A, totalizando 200 μL e após a homogeneização da solução, transferiu-se 100 μL para os poços da linha B e assim sucessivamente até a coluna H, (Diluição 1:2). Posteriormente, 100 μL do inóculo bacteriano padronizado previamente (Item 3,4) foram adicionados por poço resultando numa concentração inicial na linha A de 1000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e, final de 7,8125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A a H, 8 vezes). Para as bactérias Gram negativas, a concentração inicial da solução de NPs foi de 16.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ao fim do experimento, na linha A conter uma concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até a linha H de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A a H, 8 vezes) (Figura 10).

Figura 10 – Esquemática da metodologia de plaqueamento

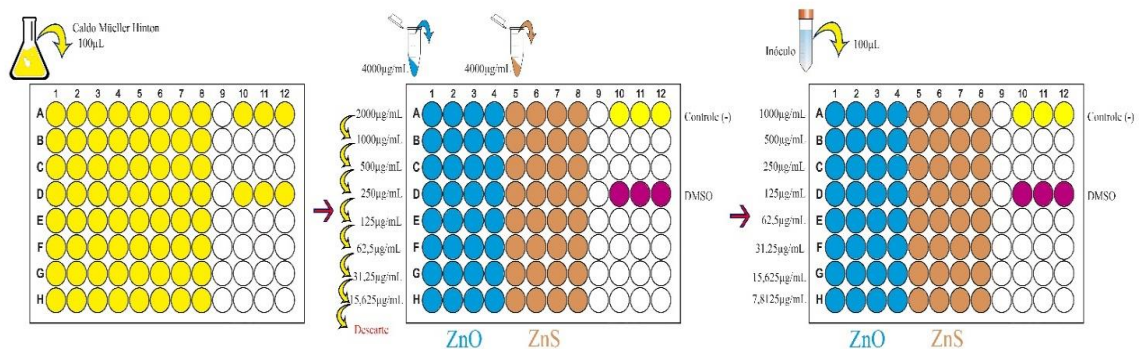


3.7.1 Diluição das NPs

Os poços da microplaca foram preenchidos com 100 μL de Caldo Müller-Hinton. A suspensão inicial de NP de 4000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em caldo Müller-Hinton. Em

seguida, um volume de 100 μL da suspensão inicial foi adicionado ao primeiro poço da microplaca (A), resultando na concentração de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após homogeneização, 100 μL desta diluição foi transferida para o poço B, e assim sucessivamente até o poço H, onde 100 μL foram descartados. Em seguida foram adicionados 100 μL do inóculo padronizado a todos os poços que continham as NPs, exceto nos poços para calcular o interferente (100 μL de Caldo Müller Hinton esterilizado, com 100 μL da nanopartícula em diluição seriada). Como Controle Positivo foi usado 100 μL de inóculo bacteriano e 100 μL DMSO a 1% sem NPs. Como Controle Negativo foi usado 100 μL de inóculo bacteriano, e 100 μL Caldo Müller-Hinton esterilizado. A microplaca foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e o ensaio de XTT (item 3.6.1.1). A concentração inibitória mínima (CIM) foi expressa como sendo a menor concentração de NPs capaz de inibir o crescimento bacteriano (Figura 11) (70).

Figura 11 – Esquematização da diluição das nanopartículas.



Fonte: Rodrigues, 2019

3.8 Quantificação do biofilme

3.8.1 Teste do Cristal Violeta – TCV

A massa produzida pelo biofilme foi quantificada pela coloração com cristal violeta (73). Foi realizado o TCV nas placas contendo as bactérias tratadas com as NPs e sem o tratamento (controle positivo). Para a formação dos biofilmes foram utilizadas microplacas de 96 poços com inóculo bacteriano e nanopartículas como descrito no item 3.6.1.2. com modificação para a concentração das NPs-Zn para *S.aureus*, de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para as Gram (-) de 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após os tratamentos com incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, o

meio de cultura foi removido cuidadosamente de cada poço e as células aderidas lavadas duas vezes com solução salina estéril. Em seguida foram adicionados 200 µL de metanol 100% (v/v,) e removido após 15 minutos. Após secar a temperatura ambiente, 200 µL da solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados e incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Os poços foram gentilmente lavados duas vezes com PBS até que o excesso de coloração fosse removido. Após secar a temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de ácido acético (33% v/v) em cada poço e a leitura das absorbâncias realizadas a 570 nm.

3.9 Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Para realização das análises de microscopia de fluorescência utilizou-se o kit de viabilidade celular BacLight™ LIVE/DEAD L7007 - (Molecular Probes by Life Technologies, EUA). Esse kit utiliza uma mistura com dois marcadores: o marcador verde fluorescente SYTO 9 (480/500 nm excitação/emissão) e o marcador vermelho fluorescente iodeto de propídeo (490/638 nm excitação/emissão) seguindo a metodologia proposta com algumas modificações (74) . O SYTO 9 marca todas as bactérias presentes na amostra, viáveis e não-viáveis. Por outro lado, o iodeto de propídeo penetra apenas em bactéria com a membrana celular danificada (não-viáveis), causando a redução do SYTO 9 quando ambos os corantes estão presentes. Desse modo, quando há uma mistura apropriada dos dois marcadores, as bactérias que apresentam membrana celular intacta (viáveis) são marcadas em verde fluorescente, enquanto as células que apresentam danos na membrana celular (não-viáveis) são marcadas em vermelho fluorescente.

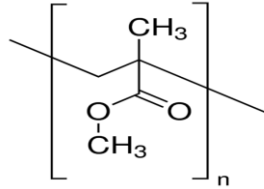
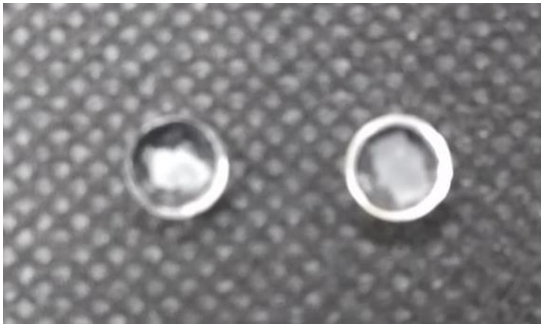
Para a realização do ensaio de Microscopia Confocal a Laser foram utilizadas placas de 96 poços contendo as três bactérias. O inóculo bacteriano utilizado para *S. aureus* foi de 10^4 UFC.ml⁻¹ com a concentração correspondente de ZnO e ZnS utilizada de 500 µg.mL⁻¹ (IC50) para *K.oxytoca* e *P.aeruginosa* de 10^3 UFC.ml⁻¹ e a concentração de ZnO e ZnS de 2000 µg.mL⁻¹ (IC50). Após 24 horas em estufa a 37°C, o sobrenadante foi retirado e as amostras foram coradas com o kit de Viabilidade Celular para realização das análises de microscopia de fluorescência de acordo com o protocolo experimental do fornecedor. Nos experimentos foram empregadas a proporção de 1:1 dos dois principais componentes do kit, sendo 1 µL do componente A (SYTO 9 - 3,34 mM) e 1 µL do componente B (Iodeto de Propídio -

20 mM) misturados a 1 mL de PBS e mantidos ao abrigo da luz. Após a retirada do sobrenadante, uma alíquota contendo a solução dos dois corantes foi adicionada em cada poço, suficiente para preencher o biofilme (50 μ L) e após o tempo de espera de 40 minutos como indicado pelo fornecedor, a leitura foi realizada no Laboratório de Microscopia Confocal no Instituto de Física da USP, IFUSP, Campus de São Carlos (Microscópio Confocal de fluorescência Zeiss, modelo LSM 780 invertido).

3.10 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Para análise da interação das NPs com as bactérias foi realizado o ensaio de microscopia eletrônica de varredura-MEV para assim observar se os tratamentos com as NPs resultariam: em completa morte das bactérias, ou apenas um descolamento destas da superfície abiótica de acrílico [poli(metil metacrilato)] (Imagem 2); se haveria uma descaracterização do formato do biofilme; ou se o biofilme permaneceria inalterado estruturalmente. Para a realização do ensaio MEV foram utilizadas placas de 96 poços contendo as três bactérias e os corpos de prova de acrílico. O inóculo bacteriano utilizado para *S. aureus* foi de 10^4 UFC.mL⁻¹ com a concentração correspondente de ZnO e ZnS utilizada de 500 μ g.mL⁻¹ (IC50); para *K. oxytoca* e *P. aeruginosa* o inóculo foi de 10^3 UFC.mL⁻¹ e a concentração de ZnO e ZnS de 2000 μ g.mL⁻¹ (IC50). Após 24 horas o protocolo segundo Zago *et al.*, 2015 (75) foi realizado com modificações. O sobrenadante foi gentilmente retirado e os corpos de provas contendo os biofilmes foram lavados com PBS 0,01M, pH 7,2, em seguida realizado a desidratação e fixação dos biofilmes em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 100%) por 10, 15 e 20 minutos respectivamente em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em dessecador a vácuo até a análise. Cada amostra foi revestida com ouro por spottering por 20 segundos sob pressão de 2×10^{-1} mBar, e examinadas no microscópio eletrônico de varredura em alta resolução (MEV) (Marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário retroespalhados). A análise MEV foi realizada no laboratório multiusuário do Instituto de Química, Unesp – Campus de Araraquara.

Imagem representativa 02 – Corpo de Prova em acrílico com sua estrutura molecular ao lado



Poli(metil metacrilato)
Densidade: 1,18g.cm³
Ponto de fusão: 180°C
Fórmula: (C₅O₂H₈)_n

4.0 Análise Estatística

Os experimentos foram delineados com no mínimo três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA One Way) e/ou Teste t de Student não pareado (Unpaired t test), utilizando nível de significância de 0,05%, realizados através do software Prisma (Graf Pad Software).

Capítulo 2

5.0 Resultados e Discussão

Após a reativação das cepas com auxílio de uma alça de inoculação estéril, colônias isoladas e uniformes foram transferidas para um tubo cônico contendo 10mL de caldo Müeller Hinton esterilizado. A turbidez do inóculo bacteriano foi verificada medindo a absorvância da suspensão a 625 nm, sendo que densidade ótica entre 0.08–0.13 corresponde a 10^8 UFC.mL⁻¹ (69). Após atingir a turbidez necessária, foi realizada uma diluição seriada para avaliar os nanocompostos, as diluições das suspensões foram semeadas em ágar Müeller Hinton por método de espalhamento com uma alça de inoculação calibrada de 10µL, com o objetivo de confirmar a quantidade de UFC.mL⁻¹ (25).

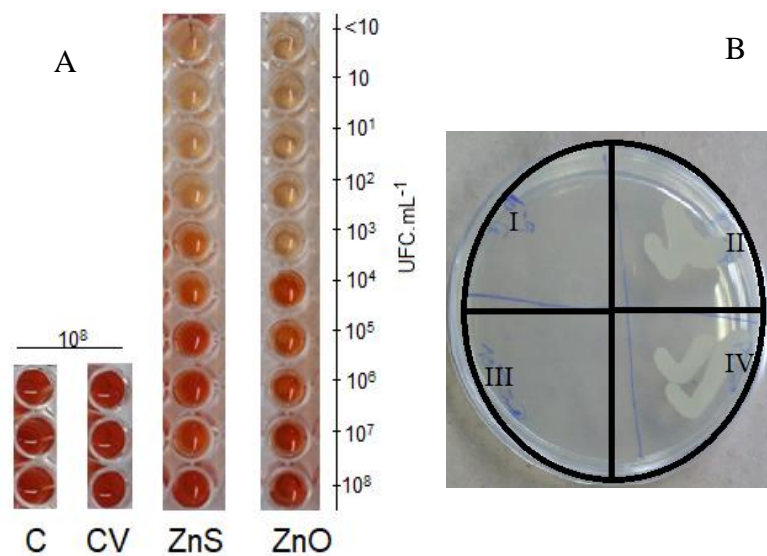
5.1 Triagem Inicial

A triagem inicial foi realizada com diluição seriada do inóculo bacteriano, partindo inicialmente da escala 0,5 *Mac Farland* (corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). A concentração de cada NPs foi de 1000 µg.mL⁻¹ para *S. aureus* e 4000 µg.mL⁻¹ para *K. oxytoca* e *P. aeruginosa* em cada suspensão bacteriana a ser testada. A partir dessa triagem, definiu a diluição que apresentou a inibição do crescimento bacteriano, para posteriormente prosseguir o estudo determinando a concentração inibitória mínima (CIM). Para a quantificação das células viáveis, ou seja, das bactérias vivas presentes nesses biofilmes foi utilizado o método de redução do sal de tetrazólio (XTT); um indicador colorimétrico de atividade metabólica das células.

A figura 12A mostra as diferentes diluições a partir de 1:10 (10^{-1} a 10^{-9}) em caldo MH das suspensões bacterianas a partir da concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹. Para efeito de demonstração do resultado do teste XTT, apenas foi apresentada uma tira da triplicata de cada diluição e tratamento com NP-ZnS e NP-ZnO. O aparecimento da cor avermelhada indica viabilidade celular e a cor amarela a morte celular. A figura 12B demonstra o plaqueamento realizado nos períodos de 24, 48 e 72 horas após o tratamento com as Zn-NPs para *S.aureus*. As NP-Zn afetaram não

somente a viabilidade celular como também demonstraram um efeito bactericida, mesmo após 72 horas não houve crescimento de UFC.

Figura 12- Representação dos efeitos das nanopartículas de ZnO e ZnS sobre as diferentes diluições bacterianas (A) e crescimento bacteriano de *S. aureus* em ágar MH (B).

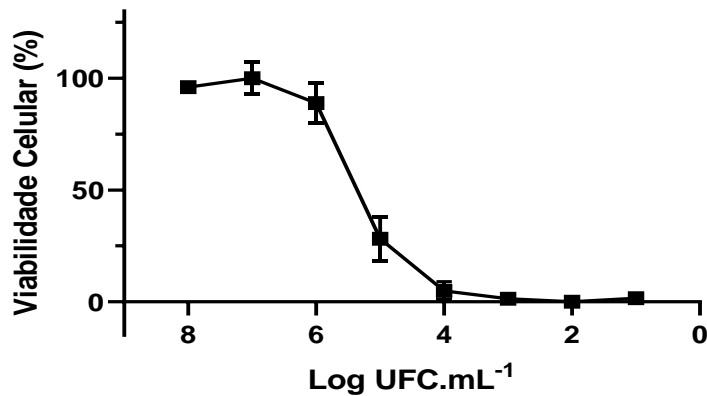


Fonte: Autoria própria

Legenda: (A): C = Controle; CV = Controle de veículo (Inóculo Bacteriano + caldo com DMSO a 2,5%); ZnO E ZnS em inóculo bacteriano em diluição seriada (de 10^8 a 10 UFC.mL^{-1}); (B) = Plaqueamento das suspensões bacterianas em UFC.mL^{-1} : 10^2 (II), 10^3 (IV), 10^4 (I) e 10^5 (III) após 72 horas da adição das NPs-Zn; Em I e III não houve crescimento de *S.aureus* na presença de NPs-Zn.

Para a avaliação da CIM (item 5.1) foi utilizada a diluição 10^{-4} que apresenta aproximadamente 10^4 UFC.mL^{-1} para *S. aureus* (Figura 13); e, para *K. oxytoca* e *P. aeruginosa* a diluição de 10^{-5} que apresenta aproximadamente 10^3 UFC.mL^{-1} (este resultado não está demonstrado).

Figura 13 – Quantificação da viabilidade celular (%) dos biofilmes formados por *S. aureus* na presença de ZnO 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

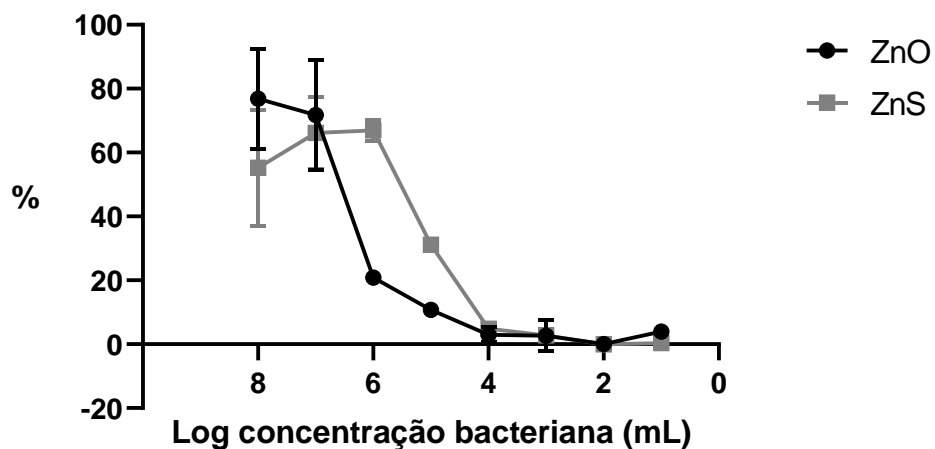


Legenda: Diluição seriada partindo de 10^8 até 10^0 UFC.ml⁻¹.

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas

No ensaio de microdiluição em caldo as NPs foram diluídas sucessivamente em microplaca a partir da concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até a concentração final de $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*. Para *K. oxytoca* e *P. aeruginosa* $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 24 horas de incubação em estufa microbiológica a 37°C e a utilização de XTT, foi determinada a CIM de cada nanopartícula.

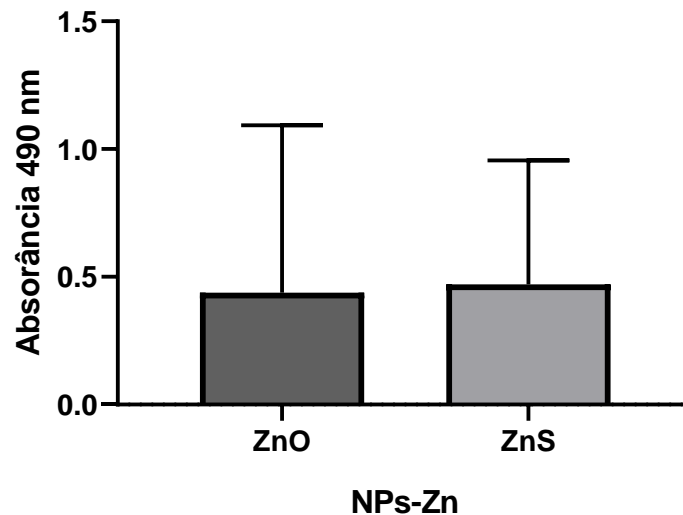
Figura 14 – Quantificação da viabilidade celular (%) dos biofilmes formados por *S. aureus* na presença de ZnO e ZnS a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$



Legenda: A suspensão de *S. aureus* correspondeu a 10^4 UFC.ml⁻¹.

A comparação entre o desempenho das NPs foi realizada aplicando do Teste t de Student não pareado (Unpaired t test). Conforme mostra a Figura 15, as duas NPs foram semelhantes e não demonstraram diferenças estatísticas ($P > 0.05$).

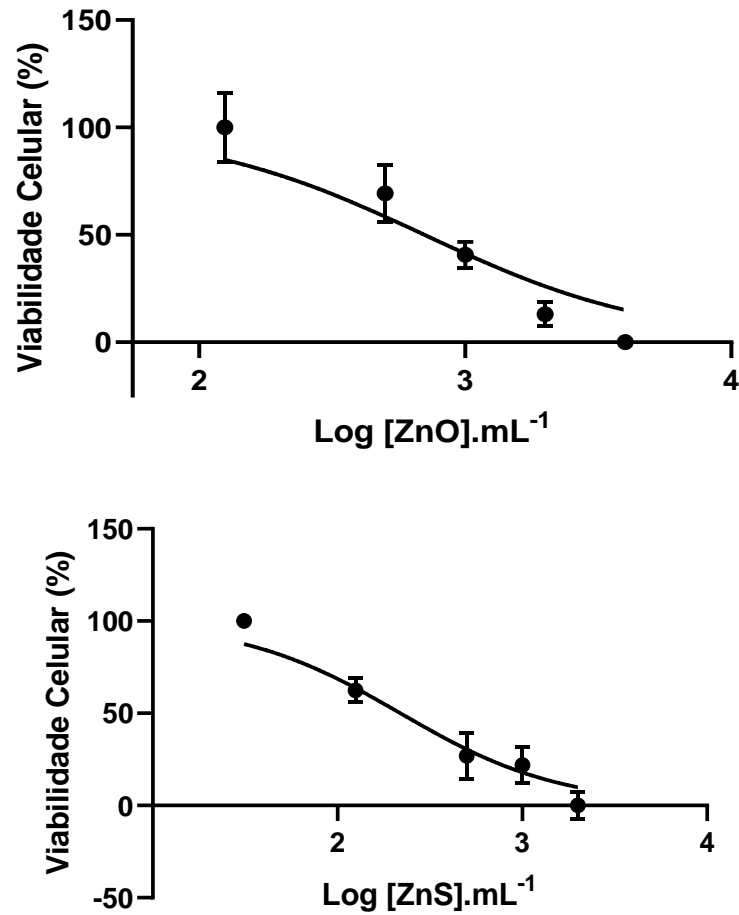
Figura 15 – Viabilidade celular (%) de *S. aureus* tratada com ZnO e ZnS.



Legenda: Teste t de student não pareado de NP-ZN com $p > 0.05$.

Para a *P. aeruginosa* foi utilizada a diluição de 10^{-5} ou de concentração igual a 10^3 UFC.mL⁻¹ e a CIM obtida foi de 4000 µg.mL⁻¹, como demonstrado na Figura 16.

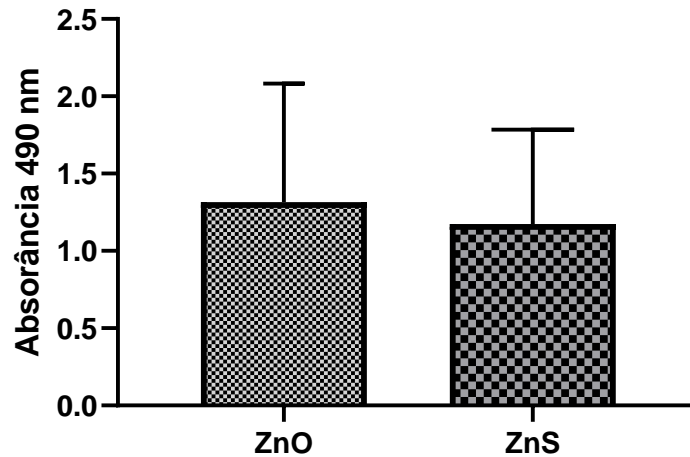
Figura 16 – Viabilidade celular (%) de *P.aeruginosa* tratada com ZnO e ZnS.



Legenda: CIM ZnO e ZnS = 4000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$

A comparação entre o desempenho das NPs foi realizada com aplicação do Teste t de Student não pareado (Unpaired t test). Conforme mostra a Figura 17, as duas NPs foram semelhantes e não demonstraram diferenças estatísticas ($P > 0.05$).

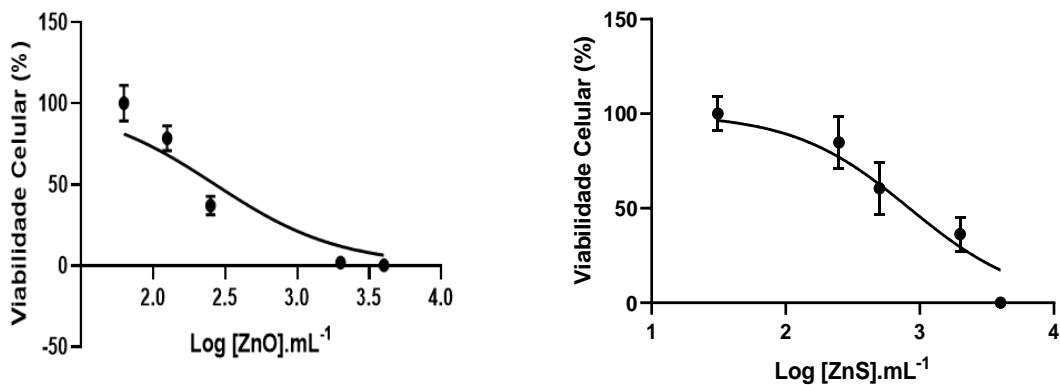
Figura 17 – Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas das Zn-Nps a $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*.



Legenda: Teste t de student não pareado de NP-ZN com $p > 0.05$.

Para *k. oxytoca* foi utilizada a diluição de 10^{-5} ou de concentração igual a 10^3 UFC.mL⁻¹ e a CIM obtida foi de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para o ZnO e ZnS, conforme mostra a Figura 18.

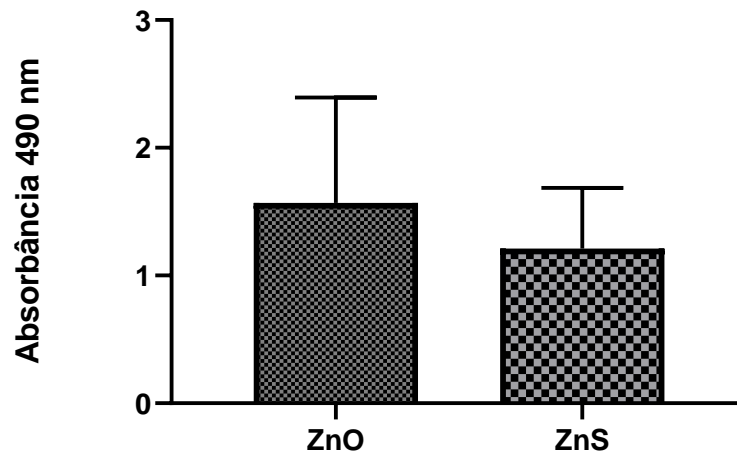
Figura 18 – Viabilidade celular (%) da *K.oxytoca* tratada com ZnO e ZnS.



Legenda: CIM ZnO e ZnS = 4mg.mL^{-1}

A comparação entre o desempenho das NPs foi realizada com aplicação do Teste t de Student não pareado (Unpaired t test). Conforme mostra a Figura 19, as duas NPs foram semelhantes e não demonstraram diferenças estatísticas ($P > 0.05$).

Figura 19 – Comparação entre as concentrações inibitórias mínimas das Zn-Nps a 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *K. oxytoca*.



Legenda: Teste t de student não pareado de NP-ZN com $p > 0.05$.

5.2 Avaliação da Massa de Crescimento Bacteriano: Teste do Cristal Violeta - TCV

Os resultados para a quantificação da massa do biofilme por TCV indicam uma significativa diminuição no biofilme com 24 horas de crescimento para as 3 bactérias, com destaque para *S.aureus*, neste caso, o biofilme foi praticamente eliminado quando a concentração bacteriana esteve abaixo de 10^6 UFC.mL⁻¹ (Figura 10), para uma concentração oito vezes menor em relação à concentração 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizada para as bactérias Gram-negativas (Figura 20).

A comparação entre o desempenho das NPs foi realizada com aplicação do Teste t de Student não pareado (Unpaired t test). Conforme mostra a Figura 21, as duas NPs foram semelhantes e não demonstraram diferenças estatísticas ($P > 0.05$).

Figura 20 – Determinação da massa (%) dos biofilmes formados por diferentes concentrações de *S. aureus* sob tratamento com ZnO e ZnS a $500\mu\text{g.mL}^{-1}$

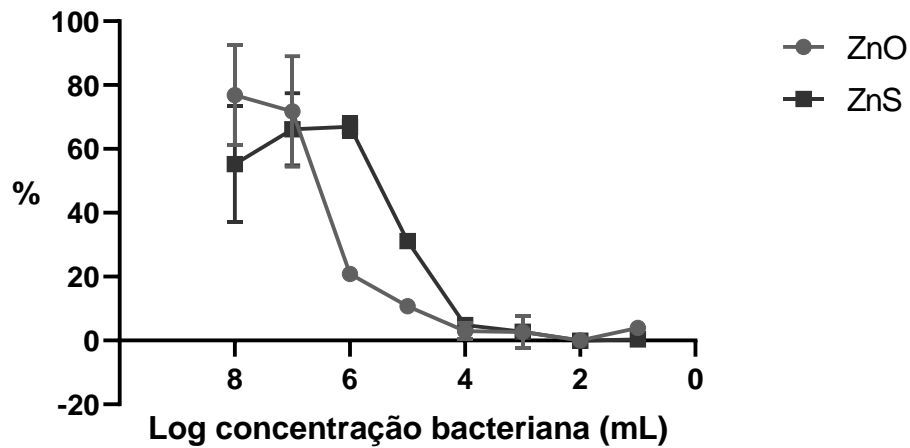
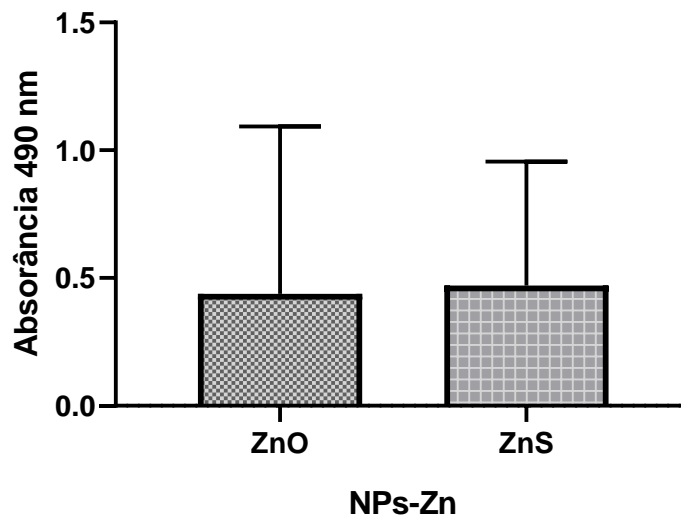


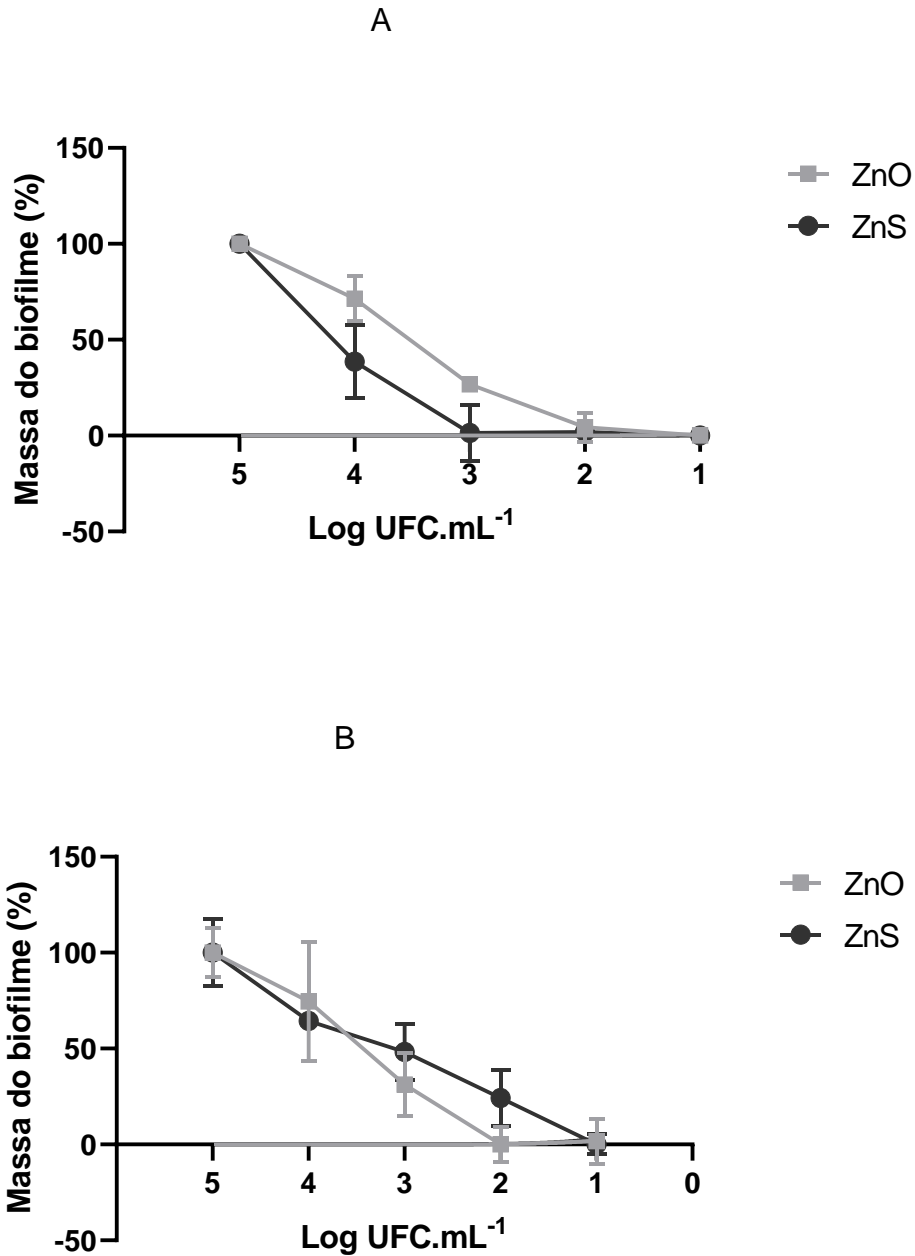
Figura 21 – Massa do biofilme (%) de *S. aureus* tratada com ZnO e ZnS.



Legenda: Teste t de student não pareado de NP-ZN com $p > 0.05$.

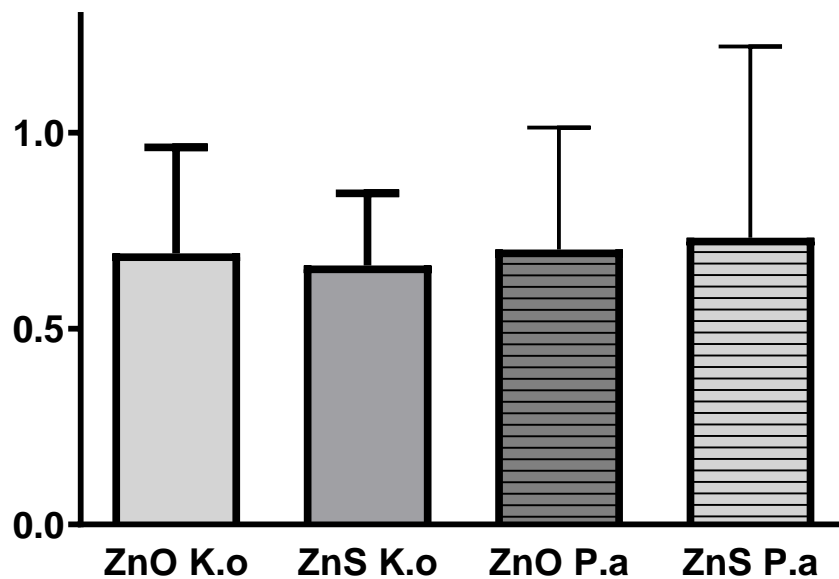
Para as bactérias Gram negativas, houve uma diminuição significativa também na proliferação e conseqüentemente na formação da massa do biofilme (Figura 22).

Figura 22 – Determinação da massa (%) dos biofilmes formados por *P.aeruginosa* (A) e *K.oxytoca* (B) em função da concentração bacteriana na presença de ZnO a $2000\mu\text{g.mL}^{-1}$



Para as bactérias Gram negativas os resultados foram verificados quanto à semelhança estatística entre a inibição do biofilme para *K.oxytoca* e *P.aeruginosa* utilizando ZnO e ZnS. Foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA OneWay) conforme mostra a Figura 23, não houve diferença estatística ao nível de 5%.

Figura 23 – Comparação entre as Zn-NPs na concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *P.aeruginosa* (*P.a*) e *K.oxytoca* (*K.o*).



Legenda: Análise de variância (ANOVA OneWay) para as bactérias Gram negativas com $p > 0.05$

Portanto para *S. aureus* a concentração inibitória mínima encontrada foi de $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ tanto para a viabilidade celular quanto para o metabolismo energético. Karvani e Chehrazi (2012) encontraram uma CIM de $1.500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (64) e Santana (2012) encontrou $2.000\mu\text{g.mL}^{-1}$ (62). Pelo método de disco difusão Saif e colaboradores (2019) encontraram um alo de inibição para o crescimento de *S.aureus* utilizando discos de papel *Whatman*, com concentração de $20\mu\text{g.mL}^{-1}$. Outro estudo realizado por Linhari e colaboradores (2019) com diferentes tamanho e superfícies de ZnO, constatou se que a atividade do nanocomposto frente ao microrganismos pode ser bactericida ou bacteriostático em diferentes concentrações (76). Assim, o ZnO e ZnS apresentaram resultados satisfatórios em relação aos encontrados na literatura para *S. aureus*.

Para as bactérias Gram negativas, resultados diferentes foram demonstrados na literatura em relação ao uso de ZnO para *P.aeruginosa*. Lee, 2014, encontrou uma CIM de $5,6\text{ mg.ml}^{-1}$ (77), Cavassin, 2013, utilizando NPs de prata e quitosana encontrou uma CIM de $13,5\text{ mg.mL}^{-1}$ (78), enquanto que Radzig et al. (2013) determinaram que a menor concentração inibitória de NPs de Ag para *P. aeruginosa*

foi de $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (79). Para *K. Oxytoca* a literatura referente aos efeitos das NPs-Zn são escassos, extrapolando assim, o resultado para bactérias Gram negativas, como a *P. aeruginosa*.

5.3 Avaliação da Qualidade dos Biofilmes Bacterianos por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

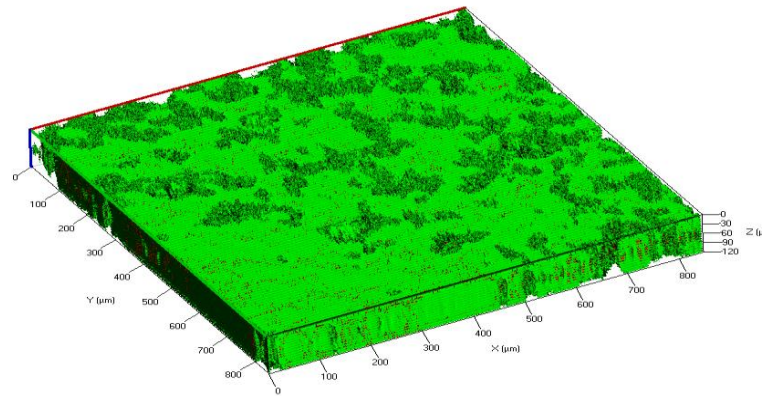
O ensaio para microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) foi conduzido para observar o biofilme na placa de poliestireno de 96 poços. Os poços utilizados como controle demonstraram que houve um excelente crescimento do biofilme em 24 horas (partindo de 10^4 UFC.mL^{-1} para *S.aureus* e de 10^3 UFC.mL^{-1} para *K.oxytoca* e *P.aeruginosa*). A concentração foi correspondente ao IC50 de todas as bactérias deste estudo e a placa foi incubada por 24 horas, após esse período, foi realizado o procedimento para a aplicação do kit de viabilidade celular BacLight™ LIVE/DEAD L7007 - (Molecular Probes by Life Technologies, EUA) como descrito no item 3.9, em seguida, foi realizada a leitura no microscópio confocal de fluorescência Zeiss, modelo LSM 780 invertido.

Como pode ser observado na Figura 24, o biofilme formado em 24 horas pela bactéria *S.aureus*, concentração inicial de 10^4 UFC.mL^{-1} , apresentou um excelente crescimento, atingindo $120 \mu\text{m}$ de espessura e preenchendo todo o fundo da micro poço.

As bactérias Gram negativas, com concentração inicial de 10^3 UFC.mL^{-1} , apresentaram aspectos diferentes dos biofilmes formados em 24 horas. O biofilme de *K.oxytoca* não preencheu todo o fundo do micro poço e a sua espessura foi de $60 \mu\text{m}$, porém o biofilme de *P.aeruginosa*, como pode ser visto na Figura 25, com apenas 24h de crescimento apresentou um biofilme de $160\mu\text{m}$ de espessura e praticamente todo o fundo do micro poço preenchido e com um tamanho maior que o biofilme de *S.aureus*, demonstrando assim, a importância do conhecimento sobre a formação e crescimento do biofilme em geral, principalmente de *P.aeruginosa*.

A Figura 26 mostra os resultados dos tratamentos com ambas as NP-Zn. Os tratamentos com as diferentes nanopartículas de zinco foram eficientes na redução do biofilme usando uma concentração correspondente a 50% de viabilidade (IC50), correspondendo a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S.aureus* e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente para *K.oxytoca* e *P.aeruginosa*.

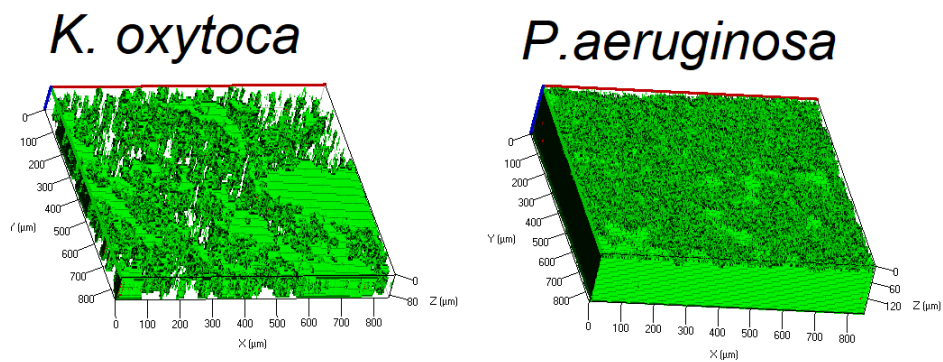
Figura 24 – Biofilme de *S.aureus* de 24 horas obtido por Microscopia Confocal de Varredura a laser Colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007



Fonte: Autoria própria

Legenda: Corte em 800x800 μm com espessura do biofilme 120 μm.

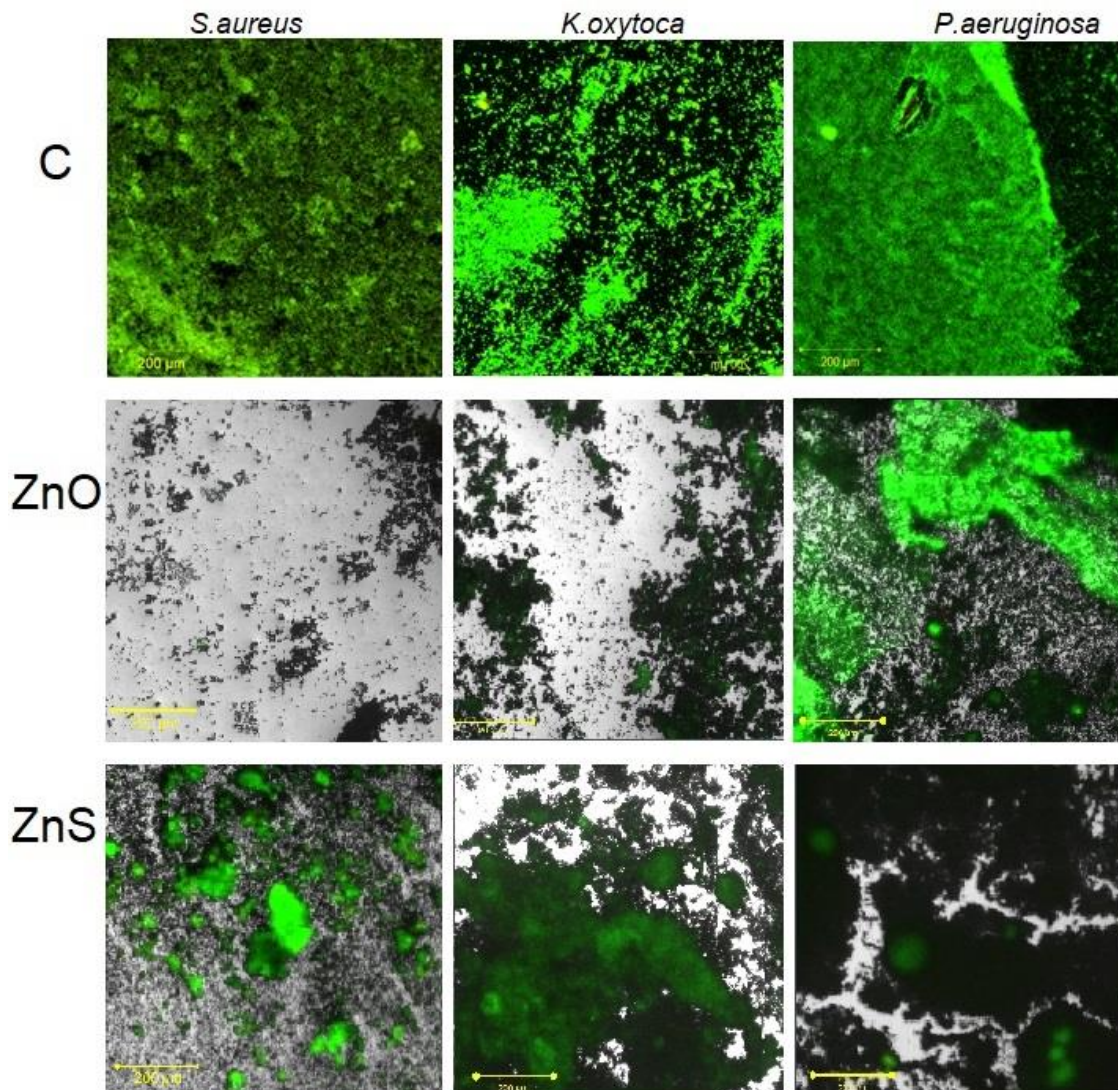
Figura 25 – Biofilmes de *K.oxytoca* e *P.aeruginosa* de 24 horas obtido por Microscopia Confocal de Varredura a laser, Colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007



Fonte: Autoria própria

Legenda: Corte em 800x800 μm com espessura do biofilme 80 e 160 μm para *K.oxytoca* e *P.oxytoca*

Figura 26 – Biofilmes de *K.oxytoca* e *P.aeruginosa* de 24 horas tratados com Nps-Zn obtido por MCVL, colorido com BacLight™ LIVE/DEAD L7007.



Fonte: Autoria própria

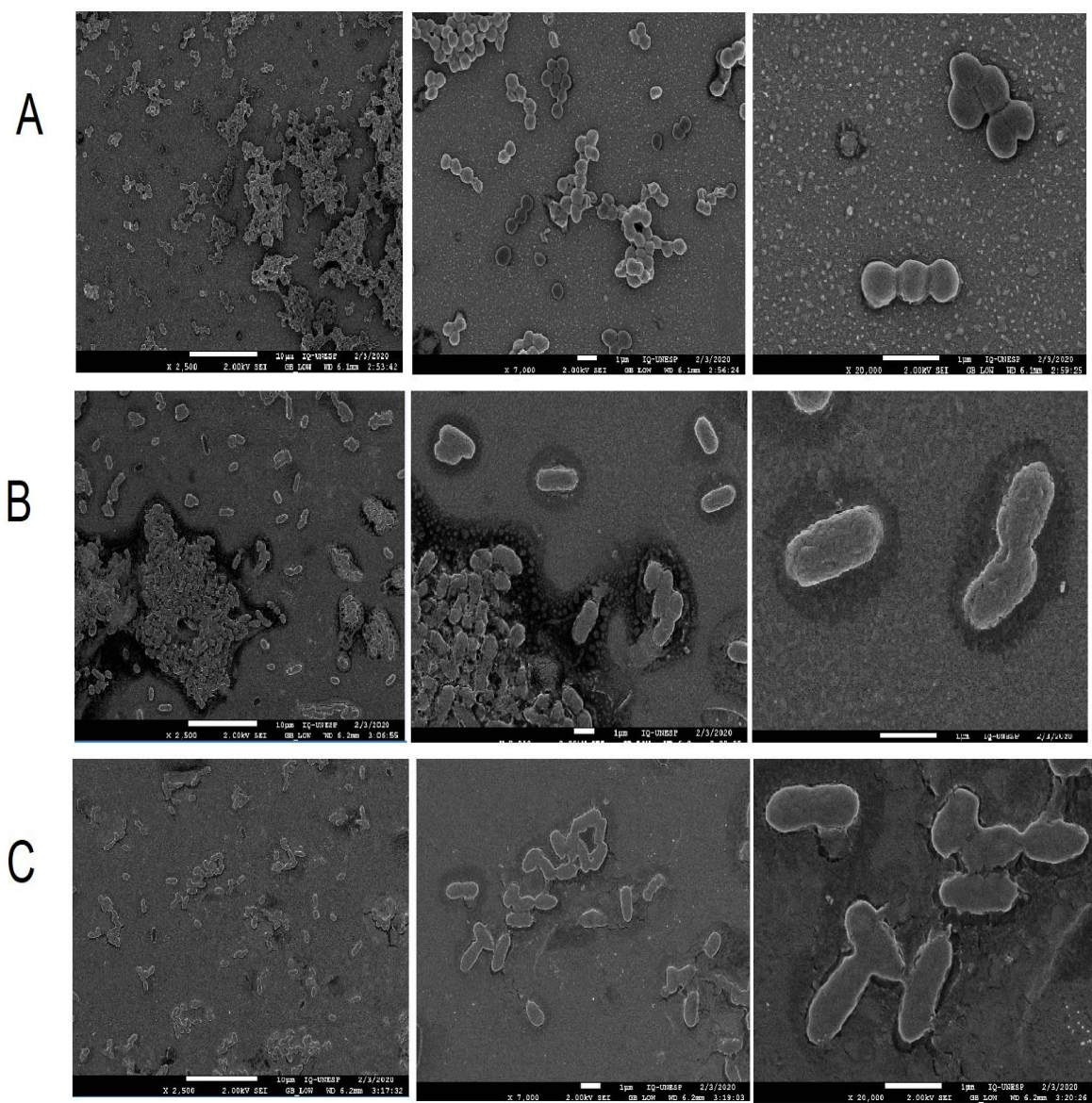
Legenda: C = controle; IC50 = 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S.aureus* e de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as Gram negativas; ZnO = Óxido de Zinco; ZnS = Sulfeto de Zinco.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As amostras foram preparadas conforme o item 3.10 e abaixo estão os resultados obtidos da análise MEV dos biofilmes bacterianos sem tratamento (controle) (Figura 27). Nos aumentos de x1000 e x2.500 podem ser observados os aspectos de crescimento bacteriano com áreas circunjacentes que podem corresponder à secreção do EPS em cada biofilme. Ao contrário dos aspectos dos biofilmes reportados por Brooks e Jefferson (2012) e Costa, Ferenz e Silveira (2016),

não observamos a formação de EPS em forma de teia. Provavelmente, estas estruturas possam ter sido alteradas pelo processo de fixação, mas não houve qualquer interferência em nossas análises. Todas as bactérias tiveram um excelente crescimento, com destaque para *P. aeruginosa* com o biofilme mais espesso, semelhante ao obtido por microscopia confocal mostrado na Figura 25.

Figura 27 – Fotomicrografia por MEV dos biofilmes de *S. aureus* (A), *K. oxytoca* (B) e *P. aeruginosa*(C) com aumento de 2.500; 7.000 e 20.000 vezes.



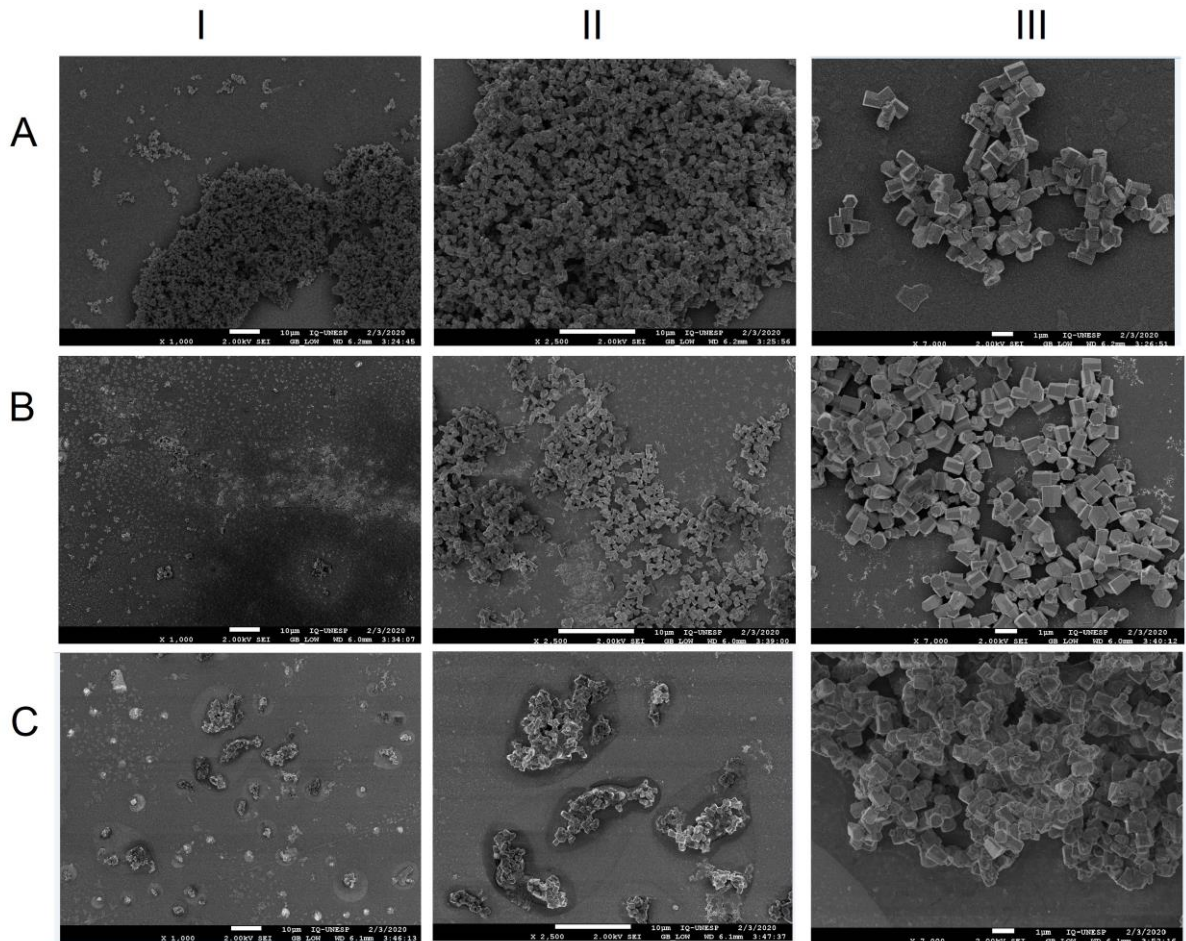
Fonte: Autoria própria.

As Figuras 28 e 29 mostram as imagens obtidas após os tratamentos com as NPs ZnO e ZnS, respectivamente, nos aumentos de 1.000, 2.500, e 7.000 vezes. Os tratamentos foram realizados conforme descrito no item 2.10 de material e métodos.

Observa-se que houve eliminação do biofilme nas concentrações das NPs correspondentes ao IC50 para as três bactérias. Estes resultados confirmam as observações feitas na microscopia confocal de varredura a laser. Entretanto, pela análise de fluorescência, pode ser observada a presença de bactérias, principalmente para *P. aeruginosa* (Figura 25), o que não foi observado na MEV. Provavelmente, isto se deve pela diferença dos processos de preparação das amostras para cada tipo de microscopia, embora a MCVL seja considerada como padrão ouro para amostras de biofilmes microbianos. Entretanto, as lavagens utilizadas para o sistema confocal por ser mais brandas podem ter contribuído para a manutenção de algumas bactérias nos poços da placa de reação.

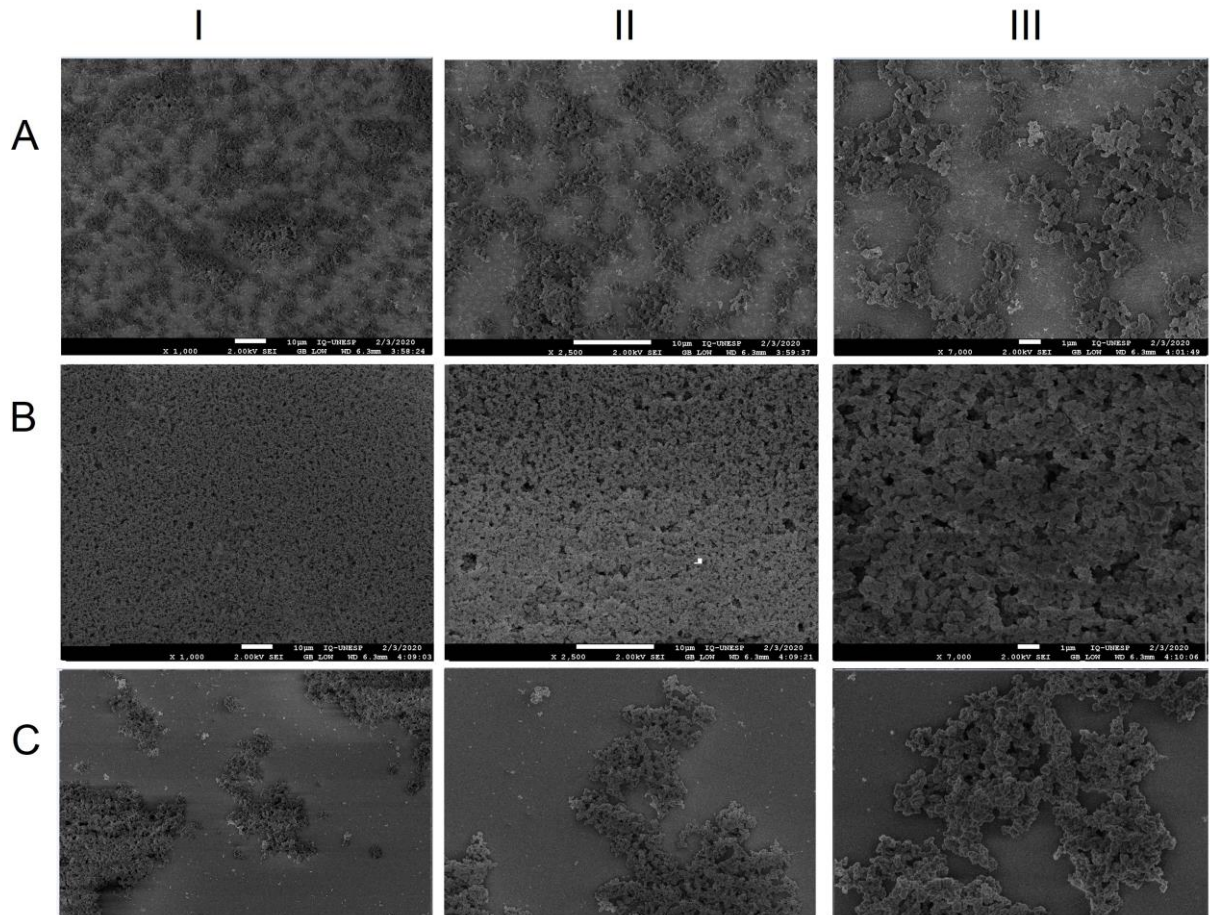
Nas imagens obtidas pela MEV podemos observar as diferenças estruturais das NPs-ZN, sendo as NPs de ZnS cerca de 4 vezes ou mais menores que a de ZnO, no entanto, em nossos experimentos demonstrando que ambas NPs apresentam resultados semelhantes sobre a eliminação de biofilmes bacterianos em superfície abiótica de acrílico. Para melhor entendimento da influência da superfície na maior ou menor adesão de biofilmes bacterianos, e a eficiência das NP-Zn, novos experimentos estarão sendo conduzidos em nosso laboratório para essas comprovações.

Figura 28 – Fotomicrografia por MEV dos biofilmes de *S. aureus* (A), *K. oxytoca* (B) e *P. aeruginosa* (C) após o tratamento de ZnO, com aumentos de 1.000 (I), 2.500(II) e 7.000 (III) vezes.



Fonte: Autoria própria.

Figura 29 – Fotomicrografia por MEV dos biofilmes de *S. aureus* (A), *K. oxytoca* (B) e *P. aeruginosa*(C) após tratamento com ZnS, com aumentos de 1.000, 2.500 e 7.000 vezes.



Fonte: Autoria própria.

IV Considerações finais

Neste trabalho foram determinadas as sensibilidades bacterianas frente aos diferentes tratamentos e alterações metabólicas com as suspensões de NP-Zn e a concentração inibitória mínima encontrada foi de $1,0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óxido de zinco e sulfeto de zinco para *S. aureus* (Gram positiva) e de $4,0\text{ mL}^{-1}$ para as Gram negativas (*P. aeruginosa* e *K. oxytoca*);

O emprego da microscopia confocal de varredura a laser permitiu avaliar as estruturas dos biofilmes bacterianos formados na presença ou ausência das NP-Zn, demonstrando assim, a capacidade de inibição da formação de biofilmes pelas duas nanopartículas de zinco;

A formação de biofilmes em superfícies de acrílico foi avaliada e as propriedades antibacterianas das NP-Zn foram as mesmas observadas na microscopia confocal, confirmando a eficiência das NPs-Zn no controle da formação de biofilmes.

As NPs de ZnS, devido ao seu tamanho (aprox.. 100nm) permite uma maior dispersão sobre a superfície abiótica, o que pode ser uma vantagem destas NPs no revestimento de superfícies, tanto aplicada à indústria de alimentos quanto a sondas usadas na área médica, diminuindo as áreas de não deposição ou criando solução de continuidade na superfície.

Referências

1. Costerton W. Biofilms and Veterinary Medicine [Internet]. Percival S, Knottenbelt D, Cochrane C, editors. October. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. (Springer Series on Biofilms; vol. 6). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-21289-5>
2. Costerton JW, Calkwell DE, Kober DR, M.Lappin-Scott H, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microsc.* 1995;49:711–45.
3. HEUKELEKIAN H, HELLER A. Organic Independent Precedes Growth. (1933) *Hand.* 1940;(1933):547–58.
4. Geesey GG, Iwaoka T, Griffiths PR. Characterization of interfacial phenomena occurring during exposure of a thin copper film to an aqueous suspension of an acidic polysaccharide. *J Colloid Interface Sci.* 1987;120(2):370–6.
5. Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How Bacteria Stick. *Sci Am* [Internet]. 1978 Jan;238(1):86–95. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/scientificamerican0178-86>
6. Wang C, Li X, Peng L, Gou X, Fan J. An update on recent developments in rupture of renal angiomyolipoma. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Apr;97(16):e0497. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.11.002>
7. Siddiq DM, Darouiche RO. New strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections. *Nat Rev Urol.* 2012;9(6):305–14.
8. Gu YQ, Li TT, Li HQ. Biofilm formation monitored by confocal laser scanning microscopy during startup of MBBR operated under different intermittent aeration modes. *Process Biochem* [Internet]. 2018;74(May):132–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.032>
9. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology.* 2001;147(1):3–9.
10. Chaw KC, Manimaran M, Tay FEH. Role of Silver Ions in Destabilization of Intermolecular Adhesion Forces Measured by Atomic Force Microscopy in

- Staphylococcus epidermidis Biofilms Role of Silver Ions in Destabilization of Intermolecular Adhesion Forces Measured by Atomic Force Microscop. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(12):4853–9.
11. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO, et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493–512.
 12. Pasternak J. Biofilmes: um inimigo (in) visível. *NasceCME Mag.* 2015;(Janeiro):4.
 13. Monteiro DR. Análise da ação de nanopartículas de prata sobre o biofilme de espécies de Candida. Universidade Estadual Paulista; 2012.
 14. Andre C. Adesão, formação e composição de biofilme por Staphylococcus aureus em Poliestireno na presença de Nisina. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa; 2015.
 15. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005;156(5–6):626–33.
 16. Remis JP, Costerton JW, Auer M. Biofilms: Structures that may facilitate cell-cell interactions. *ISME J.* 2010;4(9):1085–7.
 17. Chaw KC, Manimaran M, Tay EH. Destabilization of intermolecular adhesion forces in Staphylococcus epidermidis biofilms using silver ions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;12__ (12):4853–9.
 18. Araujo LV, Freire DMG, Nitschke M. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quim Nova.* 2013;36(6):848–58.
 19. Hooshangi S, Bentley WE. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(6):550–5.
 20. Sadiq FA, Flint S, Yuan L, Li Y, Liu TJ, He GQ. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from

- Chinese milk powders. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2017;262(January):89–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.015>
21. Srey S, Jahid IK, Ha S Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* [Internet]. 2013;31(2):572–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
 22. Smekalova M, Aragon V, Panacek A, Pucek R, Zboril R, Kvitek L. Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet J* [Internet]. 2016;209:174–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.10.032>
 23. Gupta A, Saleh NM, Das R, Landis RF, Bigdeli A, Motamedchaboki K, et al. Synergistic antimicrobial therapy using nanoparticles and antibiotics for the treatment of multidrug-resistant bacterial infection. *Nano Futur*. 2017;1(1):015004.
 24. Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. *Env Heal Perspect*. 2002;110(5):537–42.
 25. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10th ed. Artmed; 2012. 967 p.
 26. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *Apmis*. 2017;125(4):365–75.
 27. Machado CD, Antunes FS, Souza PA. Incidência De Infecções Primárias Na Corrente Sanguínea Em Uma Uti Neonatal. *Arq Catarinenses Med*. 2017;46(2):88–96.
 28. Oliveira AC, Oliveira de Paula A, Iquiapaza R, Sarmiento Gama C. Perfil dos microrganismos associados à colonização e infecção em Terapia Intensiva. *Rev Epidemiol e Control Infecção*. 2017;7(2):1–6.
 29. Macià MD, del Pozo JL, Díez-Aguilar M, Guinea J. Microbiological diagnosis of biofilm-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(6):375–81.

30. Greenspon AJ, Rhim ES, Mark G, Desimone J, Ho RT. Lead-associated endocarditis: the important role of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2008;31(5):548–53.
31. Moreira M, Medeiros EAS, Pignatari ACC, Wey SB, Cardo DM. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 1998 Dec;44(4):137–43.
32. Welch K, Cai Y, Strømme M. A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *J Funct Biomater* [Internet]. 2012 Jun 1;3(2):418–31. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4983/3/2/418>
33. Archer NK, Mazaitis MJ, William Costerton J, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445–59.
34. Linardi VR, Machado NCN, Araujo PL De, Silva EF da. Isolamento de *Staphylococcus aureus* MRSA entre os funcionários de um hospital da região Leste de Minas Gerais. *Rev Saúde Públ SUS/MG*. 2014;2:59–64.
35. Møretrø T, Langsrud S. Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. 2017;16:1022–41.
36. Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* signalling and biofilm formation for infection control. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12(e11):8.
37. Bremer P, Brooks J, Flint S, Palmer J, Burgess S, Lindsay D, et al. Biofilm Formation and Control in the Dairy Industry. *Ref Modul Food Sci* [Internet]. 2018;1–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965006399>
38. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front Microbiol*. 2016 Oct 18;7:1–21.

39. Caixeta DS. Sanitificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Universidade Federal de Lavras; 2008.
40. Flint S, Palmer J, Burgess S, Bremer P, Seale B, Brooks J, et al. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2018;84(January):47–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>
41. Storti A, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from Intensive care Unit Patients. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2005 Sep;36(3):275–80. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000300013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
42. Spagiari MS. Análise do comportamento de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em solução contendo cromo hexavalente. Centro Universitário La Salle - UNILASALLE; 2014.
43. Cai L, Wang H, Liang L, Wang G, Xu X, Wang H. Response of Formed-Biofilm of *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Citrobacter freundii* to Chlorite-Based Disinfectants. *J Food Sci* [Internet]. 2018 May;83(5):1326–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.14149>
44. Gupta A, Landis RF, Rotello VM. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Research*. 2016;5(0):364.
45. Editorial: “Plenty of room” revisited. *Nat Nanotechnol*. 2009;4(12):781.
46. Drexler KE. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1981;78(9):5275–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.9.5275>
47. AlKahtani RN. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *Saudi Dent J* [Internet]. 2018;30(2):107–16. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.01.002>

48. Bajpai VK, Kamle M, Shukla S, Mahato DK, Chandra P, Hwang SK, et al. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2018;26(4):1201–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011>
49. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett* [Internet]. 2015;7(3):219–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
50. Ficociello G, De Caris M, Trillò G, Cavallini D, Sarto M, Uccelletti D, et al. Anti-Candidal Activity and In Vitro Cytotoxicity Assessment of Graphene Nanoplatelets Decorated with Zinc Oxide Nanorods. *Nanomaterials* [Internet]. 2018;8(10):752. Available from: <http://www.mdpi.com/2079-4991/8/10/752>
51. Singh BN, Prateeksha, Rao C V., Rawat AKS, Upreti DK, Singh BR. Antimicrobial nanotechnologies: What are the current possibilities? *Curr Sci* [Internet]. 2015;108(7):1210–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.009>
52. Martin-Loeches I, Forster R, Prina-Mello A. Intensive care medicine in 2050: nanotechnology. Emerging technologies and approaches and their impact on critical care. *Intensive Care Med* [Internet]. 2018;44(8):1299–301. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-017-5002-y>
53. Krishna VD, Wu K, Su D, Cheeran MCJ, Wang JP, Perez A. Nanotechnology: Review of concepts and potential application of sensing platforms in food safety. *Food Microbiol* [Internet]. 2018;75:47–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.025>
54. Bitar A, Ahmad NM, Fessi H, Elaissari A. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discov Today* [Internet]. 2012;17(19–20):1147–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.06.014>
55. Hosseinkhani P, Zand AM, Rezayi M, Rezaei Zarchi S. Determining the

- antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteriae* (type 1). *Int J Nano Dim*. 2011;1(4):279–85.
56. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(3):789–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
 57. Travessini D. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de zinco. Universidade Federal de Santa Catarina; 2010.
 58. La Porta FA, Andrés J, Li MS, Sambrano JR, Varela JA, Longo E. Zinc blende versus wurtzite ZnS nanoparticles: Control of the phase and optical properties by tetrabutylammonium hydroxide. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(37):20127–37.
 59. La Porta FA, Nogueira AE, Gracia L, Pereira WS, Botelho G, Mulinari TA, et al. An experimental and theoretical investigation on the optical and photocatalytic properties of ZnS nanoparticles. *J Phys Chem Solids* [Internet]. 2017;103(September 2016):179–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpccs.2016.12.025>
 60. Labrenz M, Druschel GK, Thomsen-ebert T, Welch SA, Kemner KM, Logan GA, et al. Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of of Sulfate-Reducing Bacteria. *Science* (80-). 2000;290(5497):1744–7.
 61. Özgür Ü, Alivov YI, Liu C, Teke A, Reshchikov MA, Doğan S, et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices. *J Appl Phys*. 2005;98(4):1–103.
 62. Santana SV de. Nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestroturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas. Universidade Federal da Paraíba; 2012.
 63. Seil JT, Webster TJ. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomater* [Internet]. 2011 Jun;7(6):2579–84. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111001309>

64. Zarrindokht Emami-Karvani. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *African J Microbiol Res* [Internet]. 2012;5(18):1368–73. Available from: [http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract2011/18June/Emami-Karvani and Chehrazi.htm](http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract2011/18June/Emami-Karvani%20and%20Chehrazi.htm)
65. Miwa N, Kawamura A, Masuda T, Akiyama M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2001;64(3):361–6.
66. Liu Y, Jiang Y, Zhu J, Huang J, Zhang H. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation of sulfonated chitosan against *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2019;206(October 2018):412–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.015>
67. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(4):573–83.
68. Bai X, Li L, Liu H, Tan L, Liu T, Meng X. Solvothermal synthesis of ZnO nanoparticles and anti-infection application in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(2):1308–17.
69. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163–75.
70. CLSI. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. Vol. 23.
71. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):157–65.
72. Rodrigues JD. Estudo dos efeitos de nanopartículas de zinco sobre o controle

- do crescimento e formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*. Araraquara. 2019.
73. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*. 2009;47(7):681–9.
 74. Brentel AS, Kantorski KZ, Valandro LF, Fúcio SB, Puppim-Rontani RM, Bottino MA. Confocal laser microscopic analysis of biofilm on newer feldspar ceramic. *Oper Dent*. 2011;36(1):43–51.
 75. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CMI, Lordello VB, et al. Dynamics of biofilm formation and the Interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015;10(4):1–15.
 76. Linhari RC, Pietro R, Chiavacci LA. INCREASED ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ZnO NANOPARTICLES: INFLUENCE OF SIZE AND SURFACE MODIFICATION. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019;
 77. Lee JH, Kim YG, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res* [Internet]. 2014;169(12):888–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.005>
 78. Cavassin ED. Estudo da ação in vitro de nanopartícula de prata. Universidade de São Paulo; 2013.
 79. Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Lipasova VA, Khmel IA. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;102:300–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.039>