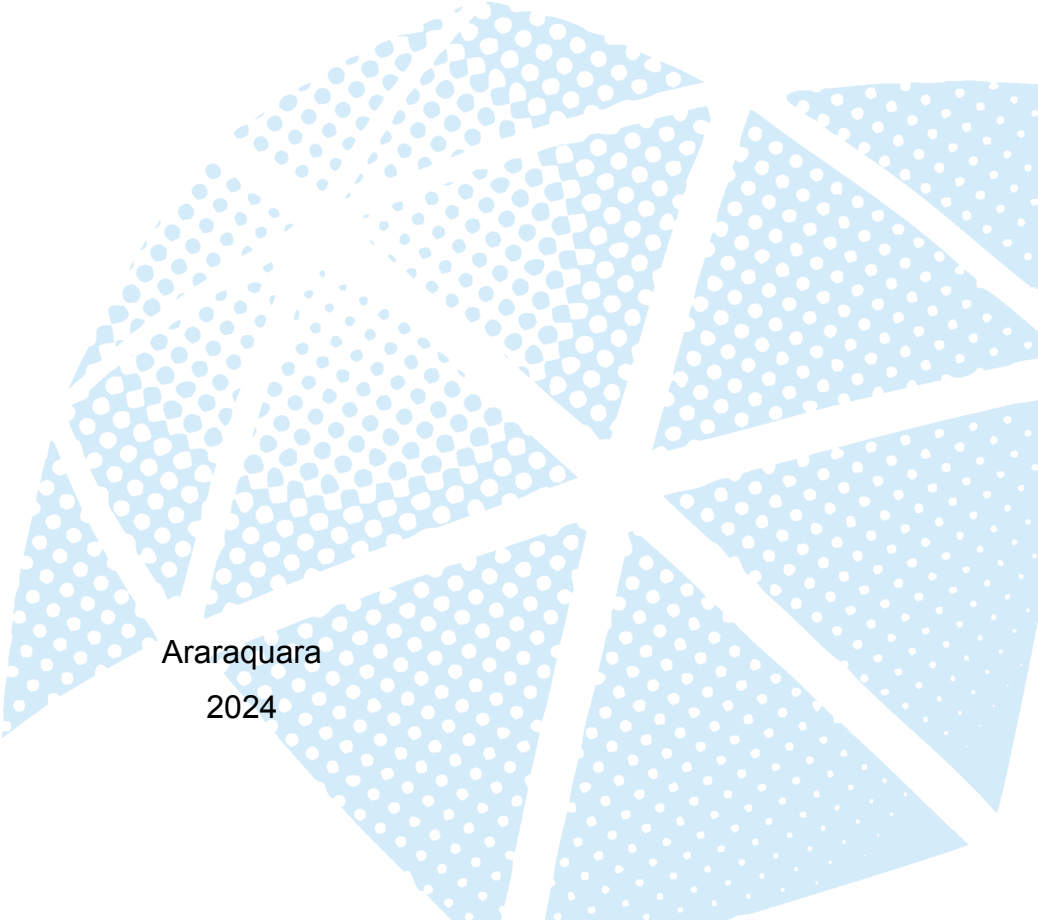


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

ANA BEATRIZ SAVOIA ORSATTI

Padronização de metodologia para avaliação da expressão diferencial de genes associados à via de formação de biofilmes em *Klebsiella oxytoca*

Araraquara
2024



ANA BEATRIZ SAVOIA ORSATTI

Padronização de metodologia para avaliação da expressão diferencial de genes associados à via de formação de biofilmes em *Klebsiella oxytoca*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Prof. Dr.
Paulo Inacio da Costa

Coorientador(a): Prof. Dr.
Rafael Bianchini Fulindi

Araraquara

2024

076p

Orsatti, Ana Beatriz Savoia.

Padronização de metodologia para avaliação da expressão diferencial de genes associados à via de formação de biofilmes em *Klebsiella oxytoca* / Ana Beatriz Savoia Orsatti. – Araraquara, 2024.

37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.

Coorientador: Rafael Bianchini Fulindi.

1. *Klebsiella oxytoca*. 2. Nanopartículas. 3. Biofilme. 4. XTT. 5. Concentração inibitória mínima. 6. ZnO. 7. ZnS. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Fulindi, Rafael Bianchini, coorient. III. Título.

ANA BEATRIZ SAVOIA ORSATTI

Padronização de metodologia para avaliação da expressão diferencial de genes associados à via de formação de biofilmes em *Klebsiella oxytoca*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 09/12/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Lorrane Brito de Toledo
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Rualdo Valderrama Filho
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho só foi possível graças ao apoio e colaboração de diversas pessoas e instituições, às quais expresso meu profundo agradecimento.

Primeiramente, agradeço aos meus pais e a minha irmã, pela paciência, incentivo, por acreditarem sempre em meu potencial, por me darem forças e sabedoria ao longo de toda a minha vida e por serem porto seguro em todos os momentos.

Aos meus avós paternos [in memoria] e maternos, que sempre me apoiaram e foram meus maiores exemplos e incentivadores.

Aos professores da Unesp Araraquara, que compartilharam conhecimentos e experiências valiosas, enriquecendo meu aprendizado ao longo dessa jornada. Aos amigos que conheci pelo caminho, que não me fizeram desistir, trouxeram alegria para cada passo do percurso e fizeram de Araraquara minha casa.

Agradeço, também, ao meu orientador Professor Doutor Paulo Inácio Costa e ao meu coorientador Dr. Rafael Fulindi Bianchini, pelo apoio técnico fornecido para a realização dos experimentos, pela dedicação de tempo e esforço para garantir o sucesso deste trabalho e por todo o conhecimento transmitido durante este caminho.

Por fim, deixo minha gratidão a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. A cada um, meu muito obrigada!

Resumo

O aumento das infecções nosocomiais por *K. oxytoca*, uma bactéria gram-negativa que afeta principalmente crianças, demanda a busca por novas substâncias antibacterianas. Nesse contexto, as nanopartículas (NPs) surgem como uma alternativa promissora devido às suas propriedades físico-químicas em escala nanométrica. Entre elas, as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e sulfeto de zinco (ZnS) destacam-se por apresentarem menor toxicidade, alta eficácia contra cepas resistentes e atividade em doses reduzidas, sem induzir resistência bacteriana. Este estudo analisou o efeito dessas NPs em biofilmes bacterianos, determinando as concentrações mínimas inibitórias (CMI) através de ensaios de XTT e espectrofotometria. Os resultados mostraram uma CMI média de 5,363 mg/mL para ZnO e 19,495 mg/mL para ZnS, sendo os dados para ZnO consistentes com a literatura, enquanto os de ZnS apresentaram maior variabilidade. Os achados reforçam o potencial das NPs de ZnO e ZnS como agentes antibacterianos eficazes, contribuindo para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas em um cenário de resistência crescente.

Palavras-chave: *Klebsiella oxytoca*; nanopartículas; biofilme; XTT; Concentração Inibitória Mínima; ZnO; ZnS.

Abstract

The rising incidence of nosocomial infections caused by *K. oxytoca*, a robust gram-negative bacterium primarily affecting children, highlights the urgent need for new antibacterial substances. In this context, nanoparticles (NPs) emerge as a promising alternative due to their unique physicochemical properties at the nanoscale. Among these, zinc oxide (ZnO) and zinc sulfide (ZnS) nanoparticles stand out for their lower toxicity, high efficacy against resistant strains, and activity at reduced doses without inducing resistance mechanisms. This study investigated the effects of these NPs on bacterial biofilms, determining the minimum inhibitory concentrations (MICs) through XTT assays and spectrophotometric readings. The results indicated an average MIC of 5.363 mg/mL for ZnO and 19.495 mg/mL for ZnS, with ZnO values aligning with existing literature while ZnS results showed greater variability. These findings reinforce the potential of ZnO and ZnS nanoparticles as effective antibacterial agents, significantly contributing to the development of new antibacterial treatments in an era of increasing resistance.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*; nanoparticles; biofilm; XTT, Minimum inhibitory concentration; ZnO; ZnS.

Lista de Figuras

Figura 1 - Formação de biofilmes.	10
Figura 2 - Árvore filogenômica baseada na sequência nucleotídica concatenada dos genes centrais das espécies de <i>Klebsiella</i> .	11
Figura 3 - Via biossintética da tilivalina e da tilimicina, ambas sintetizadas via bimodular de sintetase de peptídeo não ribossomal (NRPS), que envolve três proteínas: NpsA, ThdA e NpsB.	12
Figura 4 - Inóculo bacteriano.	15
Figura 5 - Solução de nanopartículas.	16
Figura 6 - Resultado ensaio de XTT.	19

Lista de tabelas

Tabela 1 - Microdiluição das soluções de ZnO e ZnS.	16
Tabela 2 - Genes alvo para amplificação por RT-PCR.	18
Tabela 3 - Resultados do espectrofotômetro - dados brutos ZnO.	19
Tabela 4 - Resultados do espectrofotômetro - dados tratados ZnO.	20
Tabela 5 - Porcentagem de células viáveis - ZnO.	20
Tabela 6 - Valores de IC50 e CIM para o tratamento com ZnO.	25
Tabela 7 - Resultados do espectrofotômetro - dados brutos ZnS.	25
Tabela 8 - Resultados do espectrofotômetro - dados tratados ZnS.	26
Tabela 9 - Porcentagem de células viáveis - ZnS.	26
Tabela 10 - Valores de IC50 e CIM para tratamento com ZnS.	31

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2. OBJETIVOS	15
2.1. Gerais	15
2.2. Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Crescimento bacteriano e padronização do inóculo	15
3.2. Obtenção das concentrações de nanopartículas de zinco para tratamento do inóculo Bacteriano	16
3.3. Avaliação do metabolismo energético bacteriano	17
3.4. Extração e purificação de RNA bacteriano	18
3.5. Reação de RTqPCR	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Concentrações de óxido de zinco para tratamento	20
4.2. Concentrações de sulfeto de zinco para tratamento	26
4.3. PCR real time quantitative (RT-qPCR)	32
5. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

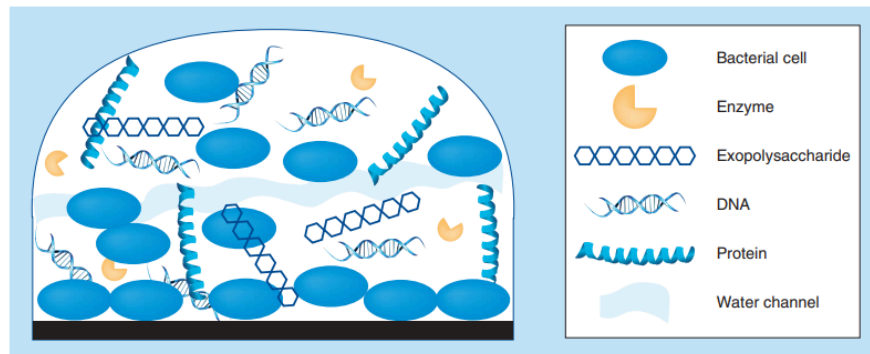
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

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 (Gupta *et al.*, 2017; Smekalova *et al.*, 2016). Esse aumento limita a abordagem terapêutica aos pacientes, provocando uma alta na probabilidade de falha do tratamento com antibióticos e a possível morte dos indivíduos (Gupta *et al.*, 2017). 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 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 (Caetano, 2018).

Biofilmes são estruturas dinâmicas aderidas a uma superfície que proporcionam mais resistência às bactérias, em relação a antibióticos e biocidas. As bactérias são responsáveis por secretar compostos poliméricos, como exopolissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas, chamados de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que funcionam como um suporte para a formação dos biofilmes, mantendo sua integridade estrutural e conferindo um ambiente ideal para o crescimento celular (Rabin *et al.*, 2015). A produção de biofilmes por bactérias encontradas no cotidiano representa constante perigo à saúde humana (Sadiq *et al.*, 2017). Os biofilmes bacterianos representam um constante risco em ambientes hospitalares, principalmente para pacientes submetidos à canulações crônicas principalmente para alimentação via sondas enterais, veiculação de fármacos ou de drenagens (Srey, Jahid E Ha, 2013).

A formação do biofilme, mostrado na Figura 1, se dá pela união de células planctônicas, inicialmente reversível, que com a produção de polímeros extracelulares pelos microrganismos, se torna irreversível. Microcolônias começam a se formar no interior do biofilme maduro com estruturas tridimensionais complexas, envolvendo canais de água e poros (Costerton, 1999).

Figura 1 - Formação de biofilmes.



Fonte: Rabin *et al.*, 2015.

Entre as bactérias patogênicas produtoras de biofilme, O gênero *Klebsiella* enterobactérias patogênicas gram-negativa, anaeróbia e produtora de toxinas. Elas podem ser encontradas na água, solo, intestino de animais, nasofaringe e trato intestinal do ser humano. É conhecida por causar infecções respiratórias e no trato urinário, e em especial a espécie *oxytoca*, que pode causar infecções em tecidos moles e no sangue, além de citotoxinas nos órgãos acometidos (Neog *et al.*, 2021).

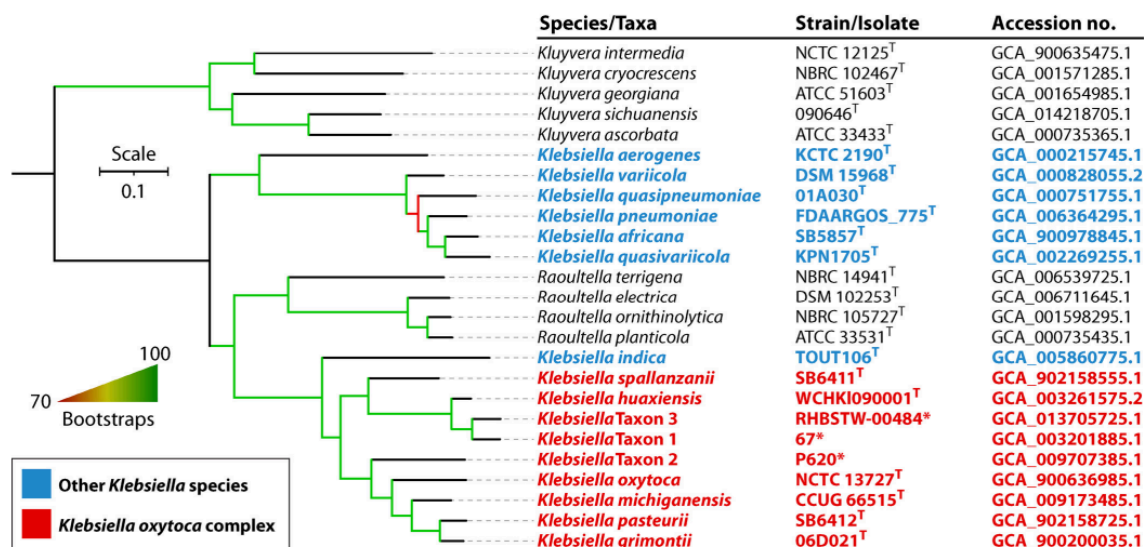
Assim, a *Klebsiella oxytoca* é conhecida por causar colite hemorrágica e surtos em Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTIN), sendo um dos agentes infecciosos nosocomiais (hospitalares) mais comuns, após a espécie *pneumoniae*. Ela foi detectada em 4,7% dos pacientes com doenças inflamatórias intestinais, em 14% com Influenza A, em 25,5% de bebês nas UTIN e em 1,4% de pacientes adultos em UTIs. (Yang *et al.*, 2022). Um estudo em três hospitais importantes do Irã, relatado por Yang (2022), entre 2011 e 2016, mostrou que a *K. oxytoca* foi isolada em 9,2% dos pacientes com colite hemorrágica associada a antibióticos (AAHC).

Isso ocorre devido ao sucesso que a bactéria tem graças à robustez de seu biofilme e aos demais aspectos patogênicos produzidos após a sua fixação em uma superfície biótica ou abiótica. Entre seus fatores de virulência, isto é, estruturas e propriedades bacterianas que a ajudam no mecanismo infeccioso e de formação do biofilme, ganham destaque as citotoxinas chamadas tilivalinas e as adesinas fimbriais, do tipo 1 e 3, que são codificadas pelos genes *fimA* e *mrkA*, respectivamente. Elas possuem propriedade adesiva, o que contribui, em conjunto

com a colonização, para a formação de biofilmes (Alkudhairy *et al.*, 2019). Essa formação representa um grande risco à saúde pública, já que sua complexidade torna as doenças associadas ao polímero mais difíceis de serem tratadas (Prüss *et al.*, 2002).

Além disso, a *K. oxytoca* pode apresentar determinantes moleculares, ou seja, genes de codificação, de beta-lactamases de espectro expandido (ESBL), como bla_{CTX-M}, bla_{TEM} e bla_{SHV}. As ESBL são enzimas que garantem resistência a uma ampla gama de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações e algumas carbapenemases (Ghasemian *et al.*, 2019). E ainda, novos estudos mostram que a *K. oxytoca* não é apenas uma espécie, é um complexo que compreende pelo menos seis espécies: *Klebsiella grimontii*, *Klebsiella huaxiensis*, *Klebsiella michiganensis*, *K. oxytoca*, *Klebsiella pasteurii* e *Klebsiella spallanzanii*, como mostrado na Figura 2. Com isso o tratamento de infecções devido a essa bactéria se tornam mais difíceis (Yang, 2022).

Figura 2 - Árvore filogenômica baseada na sequência nucleotídica concatenada dos genes centrais das espécies de *Klebsiella*.

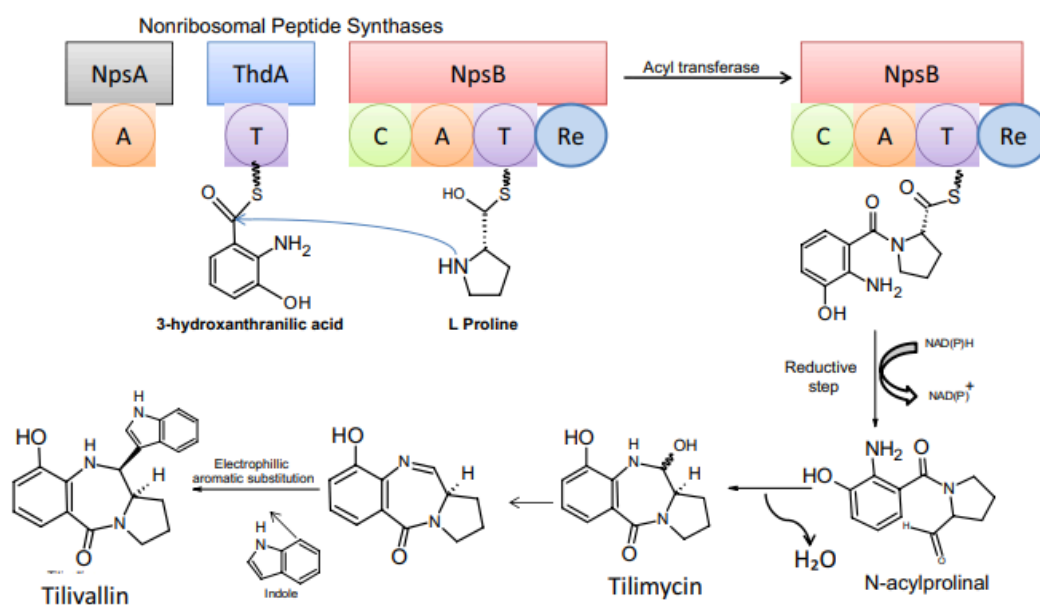


Fonte: Yang, 2022.

A patogenicidade da *K. oxytoca* está relacionada com as citotoxinas que ela é capaz de liberar, em especial a tilivalina, que induz a morte celular por meio da

inibição da síntese de DNA. Um estudo de Neog (2021) indica que o perfil transcriptômico da tilivalina mostra que ela pode afetar processos de reparos de danos do DNA, metabolismo do nitrogênio e triagem metabólica do RNA (conjunto de processos pelos quais as células regulam a produção, modificação, transporte, e degradação do RNA). Outra citotoxina encontrada foi a tilimicina, que aumenta a virulência de microbiotas e atua como genotoxina (agente que causa danos ao material genético de uma célula) (Neog *et al.*, 2021). As vias biossintéticas de ambas estão demonstradas na Figura 3.

Figura 3 - Via biossintética da tilivalina e da tilimicina, ambas sintetizadas via bimodular de sintetase de peptídeo não ribossomal (NRPS), que envolve três proteínas: NpsA, ThdA e NpsB.



Fonte: Neog *et al.*, 2021.

A necessidade de se encontrar substâncias antibacterianas se torna, então, vital, e nesse contexto ganham importância as nanopartículas (NPs), que possuem características únicas físicas e químicas, em nanoescala. Isso as permite ter uma interação com os sistemas celulares bacterianos, que podem ser ajustadas através da funcionalização de superfície apropriada, e não geram mecanismos de resistência como antibióticos (Fulindi *et al.*, 2023).

Dentre as NPs, ganham destaque as de óxido de zinco (ZnO) e sulfeto de zinco (ZnS), já que essas NPs inorgânicas apresentam vantagens como menor

toxicidade, maior eficácia contra cepas resistentes de microrganismos e atividade em pequenas quantidades principalmente por não gerarem mecanismos de resistência. Isso se torna possível graças a características como estabilidade física e química, atividade antibacteriana eficaz e grande poder catalítico. As NPs de ZnO possuem ótimas propriedades semicondutoras, antifúngicas, antioxidantes e principalmente antibacterianas, além disso possuem alta estabilidade química e toxicidade mínima. E, de acordo com a Food and Drug Administration (FDA), elas são reconhecidas como óxido metálico seguro, aumentando sua gama de utilização para revestimentos de alimentos e sistemas biológicos (Tran, 2024).

Portanto, essas NPs são promissoras no combate a formação de biofilmes, principalmente o ZnS que tem se mostrado como novidade e com resultados comprovados na inibição na formação de biofilmes (Fulindi *et al.*, 2023)

Para avaliar as vias metabólicas de produção de biofilmes, foi empregada a técnica de qPCR. A técnica denominada PCR, Polymerase Chain Reaction, tem sido usada para a clonagem de alta eficiência de sequências genômicas graças a sua capacidade de amplificação de sequências específicas de DNA, intacto ou fragmentado. A reação é baseada na adição de reagentes denominados primers, dois oligonucleotídeos iniciadores, que irão complementar a sequência conhecida do DNA-alvo, quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e a enzima termoestável Taq DNA-polimerase (Pereira; Petrechen, 2011). Um dos métodos existentes dentro da PCR, é a qPCR, a PCR em tempo real. Essa ferramenta demanda o uso de marcadores fluorescentes na reação, junto com os outros componentes, como o TaqMan e o SYBR Green. O último emite fluorescência quando intercalados entre as fitas duplas de DNA, tornando a reação visível durante os ciclos da PCR (Thornton; Basu, 2015).

Assim, neste trabalho propõe-se estudar e padronizar os mecanismos reguladores da produção e secreção de biofilmes de *Klebsiella oxytoca* por meio da ação das NPs de Óxido e Sulfeto de Zinco através das técnicas de XTT e RT-qPCR.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

O projeto objetiva analisar a influência de nanopartículas de ZnO e ZnS na expressão dos genes *mrkA* e *fimA*, que atuam diretamente na formação, manutenção e maturação do biofilme de *Klebsiella oxytoca*.

2.2. Específicos

- Determinar o potencial antibacteriano das nanopartículas de zinco estudando o metabolismo energético de células vivas;
- Analisar a influência do tratamento das nanopartículas de zinco sobre os genes alvos, *mrkA* e *fimA*, envolvidos na formação do biofilme de *K. oxytoca*;
- Estudar a técnica de extração do RNA para análise por RT-qPCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Crescimento bacteriano e padronização do inóculo

Foram utilizadas *K. oxytoca*, cepas ATCC 13182 de cultivadas, em placa de petri, em 15 mL do meio sólido ágar Mueller Hinton. Então, após a solidificação de do meio, inóculos já preparados foram plaqueados usando o método de esgotamento. Após 24 horas do plaqueamento, com crescimento a 37°C foi feita uma análise do crescimento bacteriano e caso múltiplas colônias aparecessem, ou seja, caso houvesse a formação de “tapetes”, o inóculo seria padronizado em 10⁸ UFC/mL, valor confirmado a partir da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 625 nm.

Figura 4 - Inóculo bacteriano.



Fonte: Elaborado pelos autores.

3.2. Obtenção das concentrações de nanopartículas de zinco para tratamento do inóculo Bacteriano

Este teste foi importante para definir as condições de crescimento bacteriano em placa de poliestireno, de 96 poços e as concentrações de nanopartículas de ZnO e ZnS referente a concentração inibitória mínima (CIM) e ao IC50 (concentração de inibição de 50%) que foram utilizadas nos ensaios para a avaliação de alterações nas vias metabólicas. Todos os poços da placa foram preenchidos com 100µL de inóculo bacteriano e 100µL de caldo Mueller Hinton. A solução estoque de ZnO a 40 mg/mL foi preparada com 40mg de NPs ZnO em pó, e 1mL de água MilliQ, assim como a de ZnS, porém a última com concentração de 80 mg/mL, ou seja, preparada com 80mg de NPs ZnS e com adição de 10µL de DMSO (1% v/v).

Para início dos testes com ZnO, foram adicionados 100µL da solução estoque (40 mg/mL) de ZnO na primeira coluna da placa de 96 poços, com 100µL de caldo. De maneira análoga, foram adicionados 50µL de ZnS e 150µL de caldo para

complementar o volume. Os poços então foram homogeneizados e foram transferidos 100µL do conteúdo para a coluna seguinte, de maneira sucessiva, até todas as colunas estarem preenchidas, seguindo os padrões de microdiluição da CSLI., de acordo com a Tabela 1. O branco (coluna 12) continha apenas caldo.

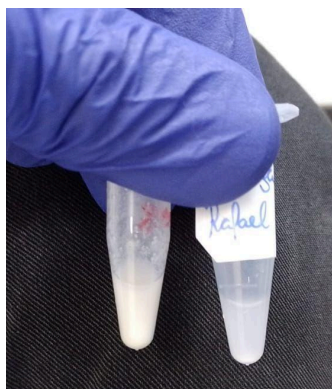
Tabela 1 - Microdiluição das soluções de ZnO e ZnS.

Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ZnO	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,625 µg/mL	0,3125 µg/mL	0,1562 µg/mL	0,0781 µg/mL	0,0391 µg/mL	0,0195 µg/mL	Branco
ZnS	40 µg/mL	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,625 µg/mL	0,3125 µg/mL	0,1562 µg/mL	0,0781 µg/mL	0,0391 µg/mL	Branco

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após vinte e quatro horas, o ensaio utilizando XTT (descrito no item III.C) será realizado para avaliar o metabolismo energético a fim de quantificar a viabilidade celular e determinar as concentrações de CIM e IC50.

Figura 5 - Solução de nanopartículas.



Fonte: Autores, 2023.

3.3. Avaliação do metabolismo energético bacteriano

Para a avaliação do metabolismo energético será utilizada a metodologia descrita por Peeters, Nelis e Coenye (2008). Brevemente, o uso do sal tetrazólico XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide), permite avaliar o efeito das NP-Zn, ativadas, sobre as enzimas desidrogenases dependente de NADH

(Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida - doador de elétrons), influenciando a redução do composto a formazana. Esta reação foi monitorada no comprimento de onda de 490nm. A preparação da solução estoque de XTT (Sigma) foi feita pela solubilização de 4 mg do sal em 10 mL de PBS 5 mM, pH=7,2, pré aquecido a 37°C. Esta solução é suplementada com 100µL de menadiona (carreador de elétrons-CE) estoque preparada pela solubilização de 55 mg 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 100µL de PBS e 100µL da solução de XTT-menadiona, com incubação de 5 horas a 37°C ao abrigo da luz. A absorbância será lida em 490 nm (PEETERS; NELIS; COENYE, 2008). Para o cálculo de células viáveis são utilizadas duas equações, uma para o tratamento de dados (I) e uma para a porcentagem de células viáveis (II).

$$Absorbância = Absorbância\ lida - controle\ de\ veículo \quad \text{Equação I}$$

$$Células\ viáveis = \frac{Absorbância}{Controle\ positivo} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

3.4. Extração e purificação de RNA bacteriano

Posteriormente ao cultivo bacteriano, os inóculos foram centrifugados 12.000 RPM por 10 minutos a 22°C, o sedimento bacteriano resultante foi ressuspenso em 100 µL de uma solução de lise e pré-aquecido a 37°C por 10 minutos. O RNA bacteriano foi extraído segundo orientações do fabricante do kit RNASpin Mini™ com algumas mudanças: 350 µL de solução de lise contendo 3,5 µL de beta-mercaptoetanol foram adicionados ao sedimento bacteriano e misturada em vórtex. As impurezas foram filtradas no RNASpin Mini e novamente centrifugado e, em seguida, adicionados 350 µL de etanol 70%. Os RNAs foram retidos pela filtração na coluna RNASpin Mini e lavados pela adição de 350 µL da solução MDB (tampão de dessalinização). A eluição dos RNAs da coluna foi feita pela adição de 50 µL de água RNase e o RNA extraído foi armazenado em freezer a -80°C. A quantificação e pureza dos RNAs extraídos foram determinadas pela leitura das absorbâncias a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Agilent Bioanalyzer).

3.5. Reação de RTqPCR

Para a padronização do RT-qPCR foi usada a metodologia descrita em Schmittgen (2008). Brevemente, uma solução contendo a enzima transcriptase reversa, tampão SuperScript II e o RNA purificado tratado com DNase, foi incubada a 50°C durante 30 minutos. Após a produção do cDNA, a reação de qPCR foi padronizada utilizando 2µL de cDNA e 0.5 µL de cada primer apresentado na Tabela 2, em tampão OneStep (ThermoFischer) contendo os oligonucleotídeos, enzima TaqDNA polimerase, magnésio/manganês e o fluoróforo SYBR Green. A reação foi padronizada para cada conjunto de primersC (Tabela 2), nas condições de desnaturação a 95°C, anelamento a 60° e extensão a 72°C. A amplificação/detecção de cDNAs foi realizada pelo sistema da Applied Biosystems 7500. Como controle de expressão (gene de referência) foi usado o rRNA 16S.

Tabela 2 - Genes alvo para amplificação por RT-PCR.

Gene alvo	Primer	Sequência 5'-3'	Temperatura (°C)
<i>mrkA</i>	<i>mrkA-F</i>	CTGGCCGGCGCTACTGC TAAG	61
	<i>mrkA-R</i>	CACCCGGGATGATTTTGT TGG	61
<i>fimA</i>	<i>fimA-F</i>	GCACCGCGATTGACAGC	61
	<i>fimA-R</i>	CGAAGGTTGCGCCATCC AG	61
16S RNA	<i>16S-F</i>	TGATCCTGGCTCAGGAT	60
	<i>16S-R</i>	TTCGCTCGACTTGCATG	60

Fonte: Elaborado pelo autor.

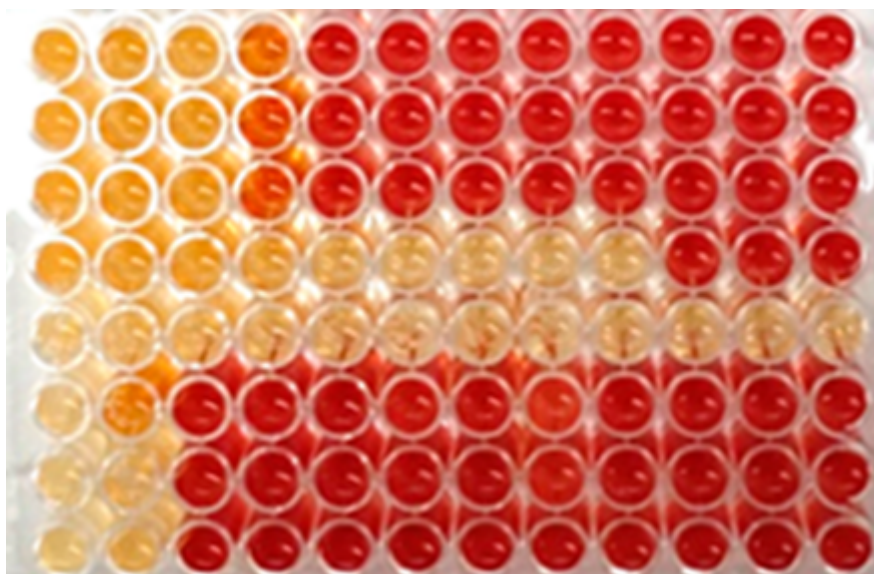
Para a avaliação da expressão diferencial dos genes *mrkA* e *fimA*, nos diferentes tratamentos, a metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Concentrações de óxido de zinco para tratamento

Foi realizado o teste com XTT em placas de 96 poços, com diluição seriada celular conforme as colunas, com a primeira apresentando 10^8 UFC/mL e a última, 1 UFC/mL. As linhas 4 e 5 foram usadas para controle de veículo, positivo e negativo. As nanopartículas de zinco estão presentes na concentração de 40 mg/mL.

Figura 6 - Resultado Ensaio de XTT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A diferença de cor resulta do metabolismo energético bacteriano. com a diferença de cores e intensidade é possível avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração de Inibição de 50% (IC50).

Os resultados encontrados em espectrofotômetro após leitura estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados do espectrofotômetro - dados brutos ZnO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,957	1,320	0,925	1,018	2,632	2,484	2,437	2,495	2,587	2,717	3,105	2,834
B	2,058	1,125	0,932	1,444	2,420	2,372	2,491	2,428	2,574	2,645	2,610	2,741
C	1,970	1,323	0,914	1,435	2,511	2,563	2,492	2,497	2,591	2,602	2,514	2,714

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como as estruturas das nanopartículas podem superestimar resultados em função de sua agregação e seus efeitos de superfície, foi feito um cálculo subtraindo o controle de veículo (CV), $DO_{490\text{ nm}}$ dos interferentes, das concentrações geradas em cada poço na leitura do espectrofotômetro (Equação I). Os resultados estão contidos na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do espectrofotômetro - dados tratados ZnO.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,017	0,040	-0,055	0,542	2,299	2,212	2,183	2,251	2,336	2,466	2,854	2,583
B	0,118	-0,155	-0,048	0,968	2,087	2,100	2,237	2,184	2,323	2,394	2,359	2,490
C	0,030	0,043	-0,066	0,959	2,178	2,291	2,238	2,253	2,340	2,351	2,263	2,463
Média	0,055	-0,024	-0,056	0,823	2,188	2,201	2,219	2,229	2,333	2,404	2,492	2,512
Desvio Padrão	0,055	0,113	0,009	0,243	0,106	0,096	0,031	0,039	0,009	0,058	0,317	0,063

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os dados obtidos e com a ajuda da Equação II, foi possível determinar a porcentagem de células viáveis em cada poço. O controle positivo, representado pelos poços 10, 11 e 12D apresentaram média de absorvância de $DO_{490\text{nm}}=2,621$, e foi considerado que continham 100% de bactérias vivas.

Tabela 5 - Porcentagem de células viáveis ZnO.

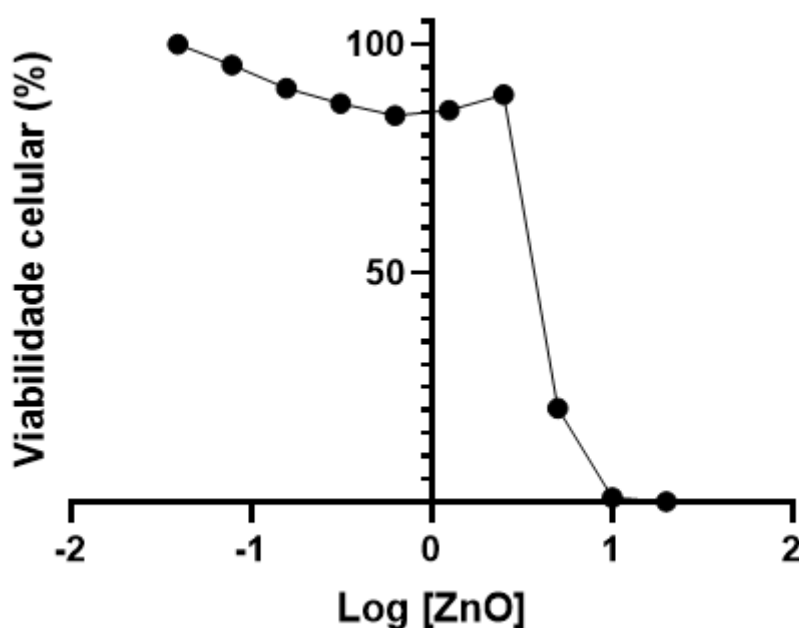
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,65	1,53	-2,10	20,68	87,71	84,40	83,29	85,88	89,13	94,09	108,9	98,55
B	4,50	-5,91	-1,83	36,93	79,63	80,12	85,35	83,33	88,63	91,34	90,00	95,00
C	1,14	1,64	-2,52	36,59	83,10	87,41	85,39	85,96	89,28	89,70	86,34	93,97
Média	2,10	-0,92	-2,15	31,40	83,48	83,98	84,68	85,06	89,01	91,71	95,08	95,84
Desvio Padrão	2,10	4,33	0,35	9,29	4,06	3,66	1,20	1,50	0,34	2,22	12,10	2,40

Fonte: Elaborado pelo autor.

O ensaio de XTT (2,3-bis [2-metoxido-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) permite visualizar as células viáveis nas placas, pois apenas elas são capazes de reduzir os sais de XTT a compostos de formazana, tornando possível a avaliação da influência das nanopartículas de zinco no crescimento bacteriano, já que a redução torna o meio laranja avermelhado (MAGAÑA-MONTIEL, 2024).

A partir dos resultados apresentados e com a ajuda do software GraphPad Prisma 8, foi possível plotar um gráfico com o log da concentração de ZnO ($\log[\text{ZnO}]$) pela quantidade de células viáveis, em porcentagem. Os Gráficos 1, 3 e 5 mostram o estudo, para a linha A, B e C, após normalização dos dados para facilitar a análise estática, reduzir erros e melhorar a visualização.

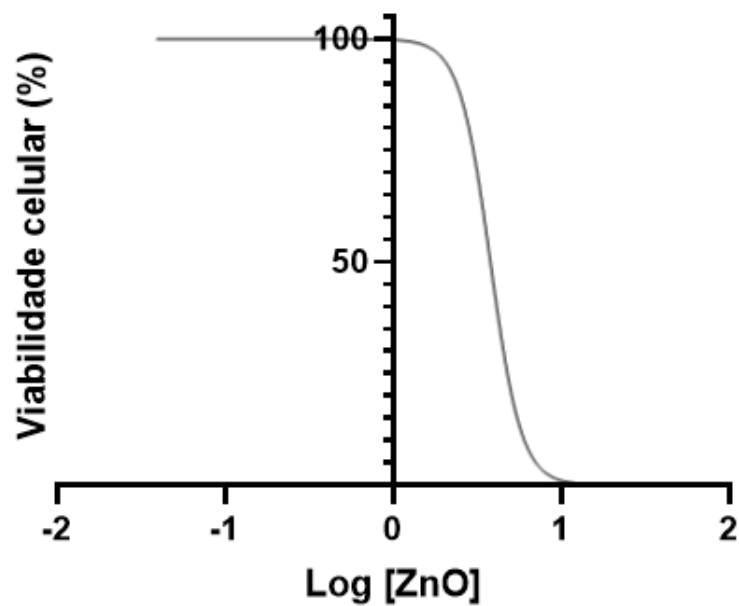
Gráfico 1 - Log da concentração de ZnO pela porcentagem de células viáveis - linha A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em posse desses dados, foi feita uma regressão não linear, com a ajuda do software, para análise de IC₅₀ e MIC. A curva escolhida foi de dose-resposta (inibição) e os resultados estão apresentados no Gráfico 2.

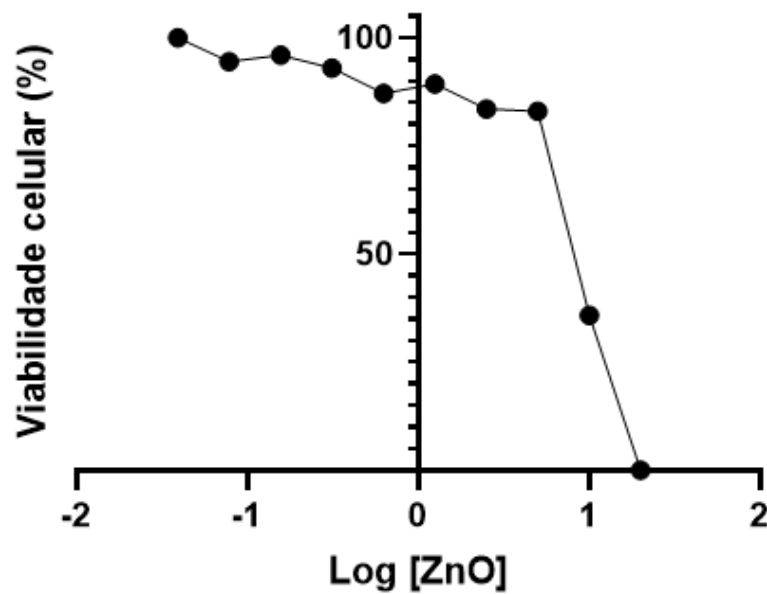
Gráfico 2 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha A.



Fonte: Elaborado pelo autor.

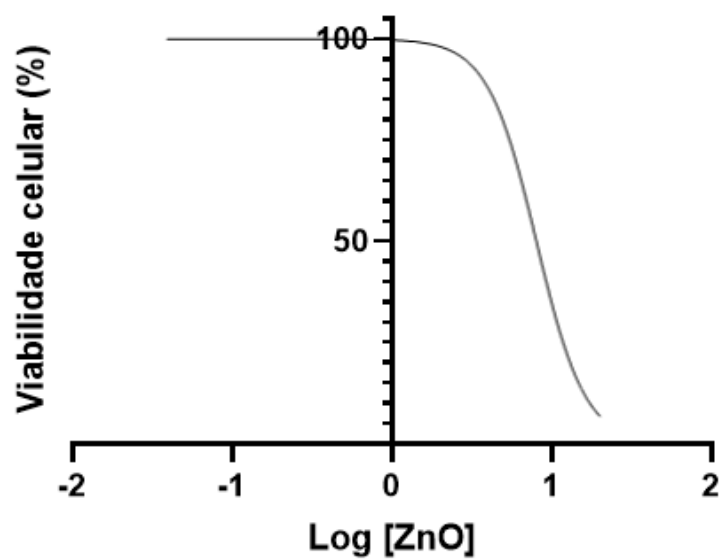
O mesmo foi feito para os dados da linha B e os resultados estão apresentados nos Gráficos 3 e 4.

Gráfico 3 - Log da concentração de ZnO pela porcentagem de células viáveis - linha B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

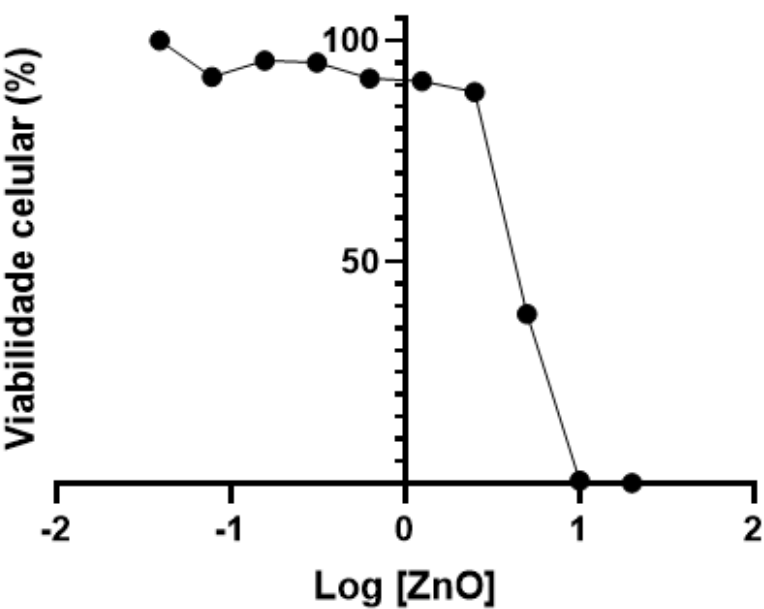
Gráfico 4 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha B.



Fonte: Elaborado pelo autor.

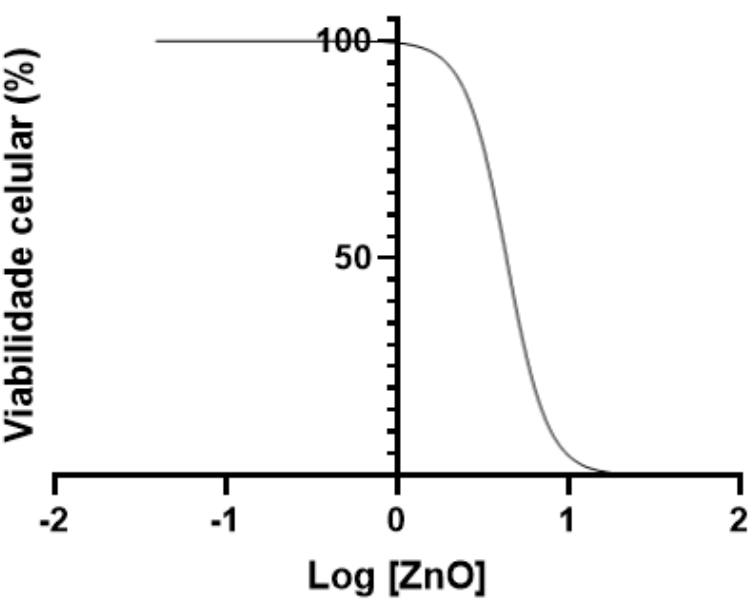
Por fim, foram plotados os dados da linha C, apresentados nos Gráficos 5 e 6.

Gráfico 5 - Log da concentração de ZnO pela porcentagem de células viáveis - linha C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 6 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de IC50 e CIM obtidos foram apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de IC50 e CIM para tratamento com ZnO.

Linha	IC50 (mg/mL)	MIC (mg/mL)
A	3,774	7,548
B	7,987	15,974
C	4,328	8,656

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando os resultados obtidos, é possível notar que condiz com a literatura, já que Fulindi (2023) apresentou um resultado de 4 mg/mL para o tratamento de *K. oxytoca* com ZnO, nas mesmas concentrações. O resultado também é confirmado pela placa, que mostra as colunas 1, 2 e 3 amareladas, ou seja, sem células viáveis. A partir da coluna 3, o valor da concentração de ZnO é compatível com o encontrado na literatura e no estudo realizado.

4.2. Concentrações de sulfeto de zinco para tratamento

Com a mesma metodologia utilizada no item IV.a., foram realizados testes com ZnS (sulfeto de zinco), nos poços de linha F, G e H da Figura 4. Porém nesse estudo, a nanopartícula possuía concentração de 80 mg/mL. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do espectrofotômetro - dados brutos ZnS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1,149	1,947	3,294	2,773	2,798	1,952	2,389	1,245	2,529	2,471	2,427	2,524
G	1,788	1,482	3,693	3,426	2,662	2,300	2,429	1,581	2,485	2,422	2,408	2,406
H	1,798	1,820	3,712	2,760	2,620	2,750	2,407	2,398	2,398	2,448	2,600	2,470

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados foram tratados e apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados do espectrofotômetro - dados tratados ZnS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	-0,130	1,515	2,614	2,281	2,478	1,747	2,125	1,061	2,256	2,198	2,154	2,251
G	0,509	1,050	3,013	2,934	2,342	2,095	2,165	1,397	2,212	2,149	2,135	2,133
H	0,519	1,388	3,032	2,268	2,300	2,545	2,143	2,214	2,125	2,175	2,327	2,197
Média	0,299	1,318	2,886	2,494	2,373	2,129	2,144	1,557	2,198	2,174	2,205	2,194
Desvio Padrão	0,372	0,240	0,236	0,381	0,093	0,400	0,020	0,593	0,067	0,025	0,106	0,059

Fonte: Elaborado pelo autor.

E a porcentagem de células viáveis apresentadas na Tabela 9.

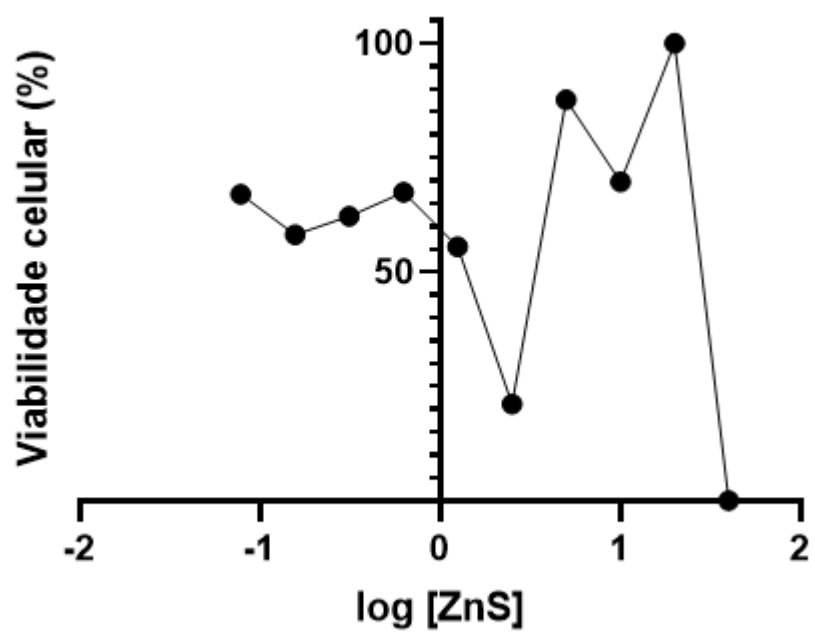
Tabela 9 - Porcentagem de células viáveis - ZnS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	-4,96	57,80	99,73	87,03	94,54	66,65	81,08	40,48	86,07	83,86	82,18	85,88
G	19,42	40,06	114,9	111,94	89,36	79,93	82,60	53,30	84,40	81,99	81,46	81,38
H	19,80	52,96	115,6	86,53	87,75	97,10	81,76	84,47	81,08	82,98	88,78	83,82
Média	11,42	50,27	110,1	95,17	90,55	81,23	81,81	59,42	83,85	82,95	84,14	83,70
Desvio Padrão	14,19	9,17	9,01	14,53	3,55	15,26	0,76	22,62	2,54	0,94	4,04	2,25

Fonte: Elaborado pelo autor.

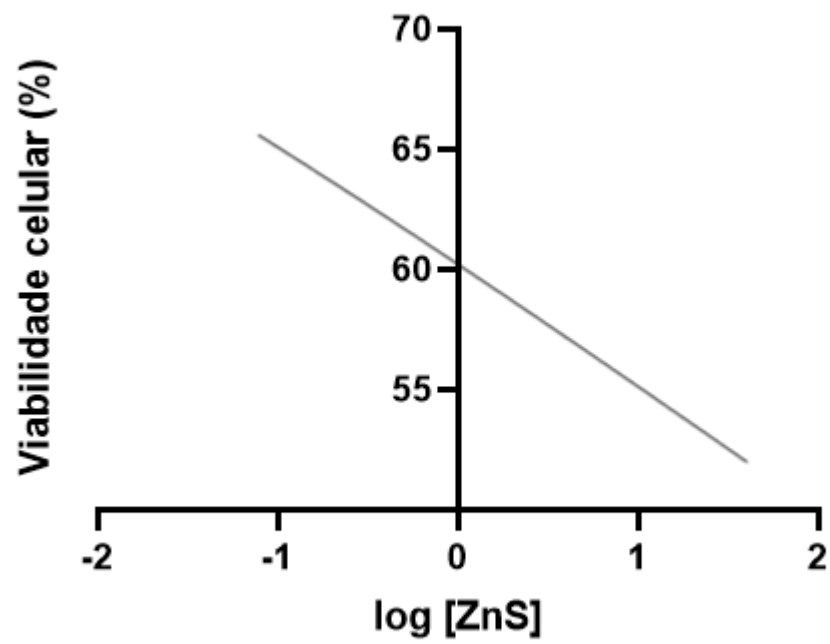
A partir dos resultados apresentados e com a ajuda do software GraphPad Prisma 8, foi possível plotar um gráfico com o log da concentração de ZnS ($\log[\text{ZnS}]$) pela quantidade de células viáveis, em porcentagem. Os Gráficos 7, 9 e 11 mostram o estudo, para a linha F, G e H, após normalização dos dados para facilitar a análise estática, reduzir erros e melhorar a visualização.

Gráfico 7 - Log da concentração de ZnS pela porcentagem de células viáveis - linha F.



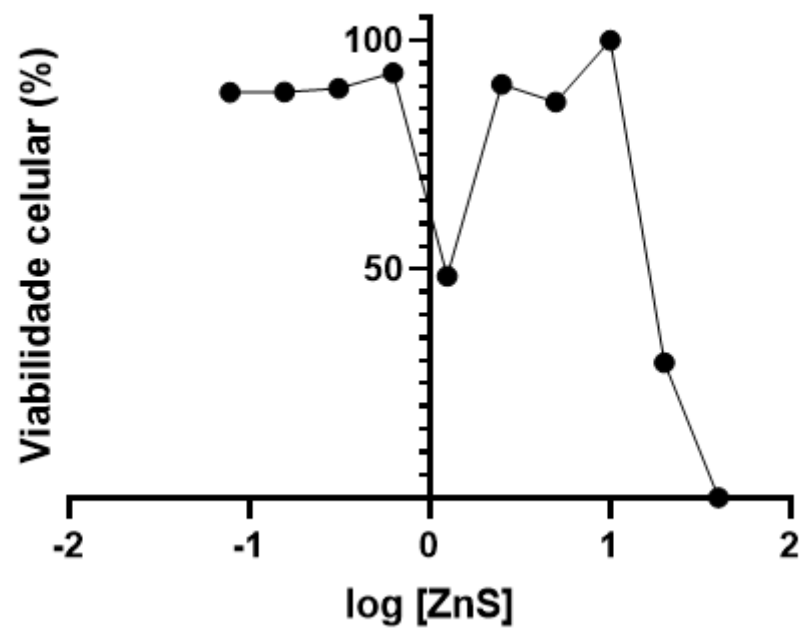
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 8 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha F.



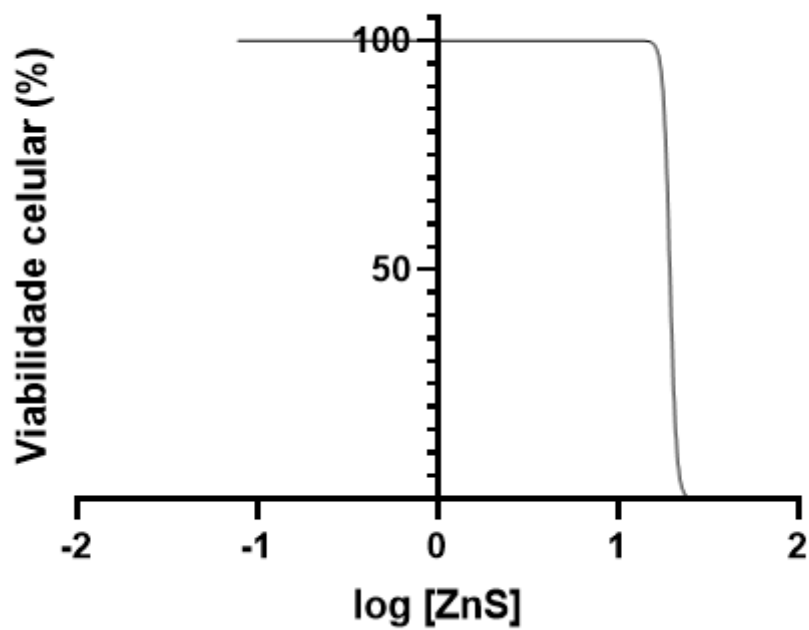
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 9 - Log da concentração de ZnS pela porcentagem de células viáveis - linha G.



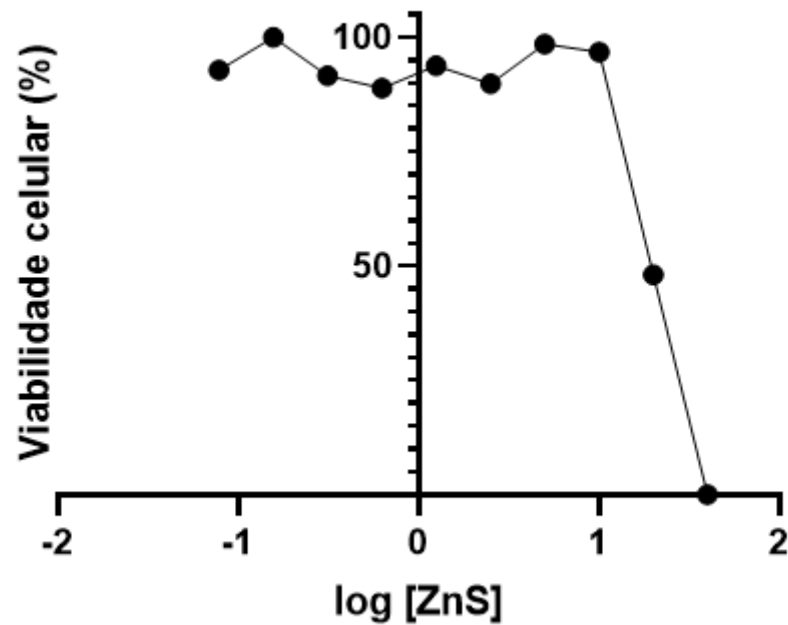
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 10 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha G.



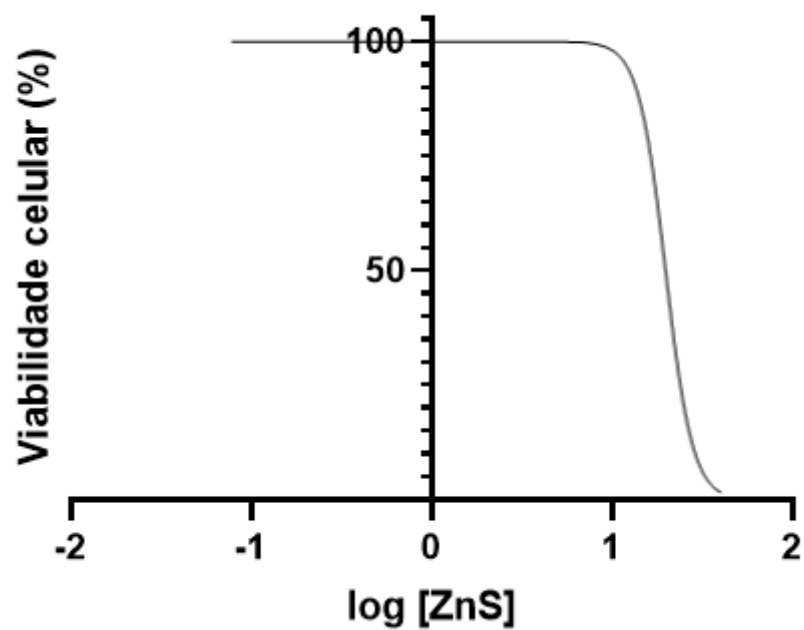
Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 11 - Log da concentração de ZnS pela porcentagem de células viáveis - linha H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 12 - Regressão não linear dos dados, com curva dose-resposta inibitória - linha H.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados e dos gráficos gerados foi possível construir a Tabela 10, com os valores de IC50 e CIM com tratamento com nanopartículas de ZnS.

Tabela 10 - Valores de IC50 e CIM para tratamento com ZnS.

Linha	IC50 (mg/mL)	MIC (mg/mL)
F	96,91	193,82
G	19,28	38,56
H	19,71	39,42

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a Tabela 10, é possível notar que o resultado da linha F (IC50 = 96,91 mg/mL) está destoando dos demais. Isso é confirmado também durante a análise do Gráfico 8. Na placa é possível observar que apenas as colunas 1 e 2 apresentam tom amarelado, o que condiz com o encontrado em estudo, já que na coluna 2, a concentração de ZnS era de 20 mg/mL. No estudo de Fulindi (2023) o valor encontrado foi de 4 mg/mL. A divergência pode ser explicada por erros de pipetagem, síntese e instabilidade da NP de sulfeto de zinco.

4.3. PCR real time quantitative (RT-qPCR)

A técnica de RT-qPCR tem como intenção confirmar os resultados obtidos ao longo do estudo. Porém a técnica de extração e purificação com a bactéria *K. oxytoca* não obteve sucesso. Foram feitas diversas tentativas que não resultaram com sucesso. Isso pode ter ocorrido em virtude de várias hipóteses como degradação ou contaminação da amostra, estágio de crescimento das células (afetam a quantidade e qualidade de RNA), erros de manuseio e armazenamento e dificuldade na lise celular, em razão da estrutura robusta das paredes celulares da *K. oxytoca*.

5. CONCLUSÃO

O aumento crescente dos casos de infecções nosocomiais por *K. oxytoca*, uma bactéria *gram-negativa* robusta, que afetam principalmente crianças, traz a necessidade da busca por substâncias antibacterianas, e, nesse cenário, as nanopartículas (NPs) emergem como uma solução promissora, devido às suas propriedades físico-químicas distintas em escala nanométrica.

Entre as nanopartículas (NPs), as de óxido de zinco (ZnO) e sulfeto de zinco (ZnS) se destacam, pois apresentam vantagens como menor toxicidade, alta eficácia contra cepas microbianas resistentes e atividade em doses reduzidas, principalmente por não induzirem mecanismos de resistência. Essas propriedades resultam de características como estabilidade físico-química, forte atividade antibacteriana e elevado potencial catalítico.

Com o objetivo de se estudar o efeito dessas NPs em biofilmes bacterianos, foi feita a análise das concentrações mínimas necessárias para inibir o crescimento bacteriano, com ensaios de XTT e leitura em espectrofotômetro.

Os valores médios encontrados para a concentração de NPs foram de 5,363 mg/mL para ZnO e 19,495 mg/mL (desconsiderando o resultado divergente) para ZnS. Os resultados para a NP de sulfeto de zinco foram mais divergentes, tanto entre si, como da literatura. Já os de ZnO condizem com estudos anteriores.

Os resultados deste estudo reforçam a importância das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e sulfeto de zinco (ZnS) como agentes antibacterianos eficazes, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de novos tratamentos antibacterianos, ampliando o leque de opções terapêuticas em um cenário de resistência crescente.

REFERÊNCIAS

ALKHUDHAIRY, M. K. *et al.* Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 134, p. 103558, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103558>.
CAETANO, Ana Carolina Lopes. **Biofilmes e Antimicrobianos**. 2018. 66 f. Tese (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard—eleventh edition (CLSI M07 ed. 11)**. 2018. Disponível em: https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections**. *Science*, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 21 maio 1999. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.284.5418.1318>.

EMAMI-KARVANI, Z. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **African Journal Of Microbiology Research**, [S.L.], v. 5, n. 18, p. 1368-1373, 12 jun. 2012. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajmr10.159>. Disponível em: https://academicjournals.org/article/article1380805340_Emami-Karvani%20and%20Chehrazi.pdf. Acesso em: 24 maio 2022.

FULINDI, R. B. *et al.* **Processo de inibição da formação de biofilmes bacterianos por nanopartículas de zinco**. Depositante: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Procurador: Renan Padron Almeida BR no 10 2021 025148 4. Depósito: 15 de dezembro de 2021.

GHASEMIAN, A.; MOBAREZ, A. M. Expression of adhesin genes and biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from patients with antibiotic-associated haemorrhagic colitis. **Journal of Medical Microbiology**, Microbiology Society, v. 68, n. 7, 28 mai. 2019. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000965#citeid>. Acesso em: 6 out. 2024.

GHASEMIAN A, Mobarez AM, Peerayeh SN, Bezmin Abadi AT. The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. **New Microbes and New Infections**, v. 27, p. 36–39, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.07.001>.

GUPTA, A. *et al.* Synergistic antimicrobial therapy using nanoparticles and antibiotics for the treatment of multidrug-resistant bacterial infection. **Nano Futures**, v. 1, n. 1, p. 015004, 2017.

GUPTA A, Landis RF, Rotello VM. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. **F1000Research**, v. 5, p. 364, 2016.

LEONEL, T.F. *et al.* The Influence of Cooper and Chromium Ions on the Production of Exopolysaccharide and Polyhydroxybutyrate by *Rhizobium tropici* LBMP-C01. **Journal Of Polymers And The Environment**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 445-455, 2 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-018-1359-4>.

MAGAÑA-MONTIEL N, Muriel-Milla'n LF, Pardo-Lo'pez, L. XTT assay for detection of bacterial metabolic activity in water-based polyester polyurethane. **PLoS ONE**, v. 19, n. 6, p. e0303210, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0303210>.

MONTEIRO, D.R. **Análise da ação de nanopartículas de prata sobre o biofilme de espécies de Candida**. 2012. 268 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/105564>.

NEOG, N. *et al.* *Klebsiella oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 1115-1123, 3 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>.

PEETERS, E.; NELIS, Hans J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 157-165, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>.

PEREIRA, R.E.P.; PETRECHEN, G.G.. PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS BACTERIANOS: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, jan. 2011. Semestral. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/u94lwYWgePGj05L_2013-6-26-11-11-29.pdf. Acesso em: 25 maio 2022.

PRÜSS, A.; Kay, D.; Fewtrell, L.; Bartram, J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 537–542, 2002.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 493-512, mar. 2015. Future Science Ltd. <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.15.6>.

SADIQ, F. A. *et al.* Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. **International Journal of Food Microbiology**, v. 262, n. January, p. 89–98, 2017.

SCHMITTGEN, T.D; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 1101-1108, jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC.

SMEKALOVA, M. *et al.* Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. **Veterinary Journal**, v. 209, p. 174–179, 2016.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. DO. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

THORNTON, B.; BASU, C.. Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], v. 1275, p. 173-179, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13.

TOOKE, C.L. *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 431, n. 18, p. 3472-3500, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.

TRAN, X.T.; BIEN, T.T.L *et al.* Biosynthesis of ZnO nanoparticles using aqueous extracts of *Eclipta prostrata* and *Piper longum*: characterization and assessment of their antioxidant, antibacterial, and photocatalytic properties. **Nanoscale Advances**, [S.L.], v. 6, n. 19, p. 4885-4899, 2024. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d4na00326h>.

YANG, J.; LONG, H.; HU, Y.; FENG, Y.; McNALLY, A.; ZONG, Z. *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, p. 6-21, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-21>.