

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 26/06/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"



“Desvendando os impactos das nanopartículas de ZnO e ZnS em bactérias formadoras de biofilme: *Insights* sobre genes reguladores, respostas metabólicas e alterações morfológicas em *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* por avaliações *in vitro* e *in vivo*”

MsC. Rafael Bianchini Fulindi

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Alimentos e Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Araraquara

2024

“Desvendando os impactos das nanopartículas de ZnO e ZnS em bactérias formadoras de biofilme: *Insights* sobre genes reguladores, respostas metabólicas e alterações morfológicas em *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* por avaliações *in vitro* e *in vivo*”

MsC. Rafael Bianchini Fulindi

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos

Área de concentração: Alimentos e Nutrição

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci Favorin**

Araraquara

2024

F963d Fulindi, Rafael Bianchini.
Desvendando os impactos das nanopartículas de ZnO e ZnS em bactérias formadoras de biofilme: Insights sobre genes reguladores, respostas metabólicas e alterações morfológicas em *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* por avaliações *in vitro* e *in vivo* / Rafael Bianchini Fulindi. - Araraquara, 2024.
101 f. : il.

Orientador: Paulo Inácio da Costa

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação de Alimentos, Nutrição e Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

1. Nanopartículas. 2. Biofilmes Bacterianos. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Klebsiella oxytoca*.
6. Microrganismos. I. Costa, Paulo Inácio da. orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004153070P3

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desvendando os impactos das nanopartículas de ZnO e ZnS em bactérias formadoras de biofilme: Insights sobre genes reguladores, respostas metabólicas e alterações morfológicas em *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa* por avaliações *in vitro* e *in vivo*

AUTOR: RAFAEL BIANCHINI FULINDI

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição, área: Alimentos e Nutrição pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participação Presencial)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. JACQUELINE ABRANCHES (Participação Virtual)
Department of Oral Biology / College of Dentistry of University of Florida

Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE DA SILVA (Participação Presencial)
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 26 de junho de 2024

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo financiamento realizado entre 2020 e 2024 no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Edital nº 26/2021, pelo financiamento do Doutorado Sanduíche no Exterior.

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

À Faculdade de Odontologia da Universidade da Flórida, Gainesville, EUA, por me receber durante o intercâmbio de maneira calorosa e acolhedora, proporcionando momentos de aprendizagem inesquecíveis.

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.

À minha coorientadora, Professora Doutora Leila Aparecida Chiavacci Favorin, pela ajuda oferecida como amiga e mentora durante este doutorado.

Ao Professor Doutor Luis R. Martinez, agradeço por me apresentar um lado da ciência que fortaleceu minhas bases como pesquisador, pessoa e ser humano durante esses cinco anos de amizade e mentoria.

Ao Professor Doutor José Freire da Silva Neto, agradeço o suporte, ensinamentos e conselhos necessários para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigado!

Agradecimentos Pessoais

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de inúmeras pessoas. Gostaria de expressar minha profunda gratidão e apreço a todos aqueles que contribuíram para a realização desta tarefa.

Agradeço primeiramente a Deus pela concretização deste sonho, pelo dom da vida, pela saúde e pela Sua infinita graça (2 Cor 12:9).

Agradeço à 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 fundamentais e são meus alicerces, proporcionando-me a paz necessária para realizar cada sonho. Todas as minhas vitórias devo a eles.

Dedico essa conquista ao meu irmão, Jonas, meu primeiro tutor no mundo acadêmico, pelo apoio constante desde os tempos de Física e além; à minha cunhada, Milene, e ao meu sobrinho, Jonas, por abrilhantarem minha jornada nesta terra. À minha avó, Maria Lurdes “Lurdinha” (*in memoriam*), que não mediu esforços para que hoje eu pudesse ser chamado de Doutor.

À Coordenação e à Secretaria de Pós-Graduação, pelos auxílios e carinho, sempre operando milagres para me ajudar a concluir este trabalho, mesmo em momentos difíceis como os diversos cortes de financiamento deste projeto, nunca mediram esforços para me amparar e me direcionar.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular com quem tive o prazer de trabalhar e aprender, agradeço por me ensinarem a iniciar e finalizar ciclos. A todos os alunos, técnicos, colegas e amigos adquiridos nesses seis anos, meu muito obrigado.

Aos amigos que a cidade de Araraquara me proporcionou, que são muitos, o meu mais sincero agradecimento. Nestes seis anos na “terra da laranja”, vocês foram essenciais para manter minha sanidade mental, especialmente em tempos de pandemia.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Patogênese e Imunologia Microbiana da Universidade da Flórida e do doutorado sanduíche, obrigado por me auxiliarem na adaptação a um país de língua e cultura diferentes e por proporcionarem momentos em que me senti em solo brasileiro.

Aos amigos do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana, USP, Campus de Ribeirão Preto, agradeço o apoio e suporte na conclusão desta fase. Aos demais amigos que a generosa cidade de Ribeirão Preto me concedeu, meu muito obrigado.

“Embrace the pain, smile at the pain, accept the pain. Pain is the gatekeeper of destiny. It questions you: Do you truly want to achieve your goals or are you merely talking?”

Autor desconhecido.

Resumo

Introdução: A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência empregada por certas bactérias para prosperar em condições adversas, promovendo a resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca* são patógenos notáveis que produzem biofilme. As nanopartículas, especificamente o óxido de zinco (ZnO) e o sulfeto de zinco (ZnS), estão surgindo como agentes antimicrobianos promissores devido à sua eficácia contra bactérias e biofilmes. **Objetivo:** investigar o impacto das nanopartículas de óxido de zinco e sulfeto de zinco no crescimento de *S. aureus* Gram-positivo e *P. aeruginosa* e *K. oxytoca* Gram-negativo, bem como na formação de biofilme. Foram realizadas análises de expressão gênica e experimentos *in vivo* usando um modelo de ferida cutânea murina. **Métodos:** As suspensões bacterianas em meio líquido Müller-Hinton foram tratadas com várias concentrações de nanopartículas de ZnO e ZnS por 24 horas a 37°C. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio XTT. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas e os efeitos inibitórios sobre a formação de biofilme foram confirmados por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser. A análise de PCR foi realizada para avaliar o efeito das nanopartículas nos perfis de expressão gênica bacteriana. Os experimentos *in vivo* envolveram a criação de feridas padronizadas em camundongos BalbC, com algumas feridas tratadas com nanopartículas. Os tecidos das feridas foram analisados quanto à carga bacteriana e às alterações histológicas. **Resultados:** Tanto as nanopartículas de óxido de zinco quanto as de sulfeto de zinco apresentaram efeitos inibitórios na formação de biofilme bacteriano. Notavelmente, o ZnS demonstrou eficácia superior em comparação com o ZnO, particularmente em concentrações mais baixas. A análise de PCR revelou uma regulação negativa significativa da expressão gênica em *Pseudomonas aeruginosa* tratada com nanopartículas ZnS. Estudos *in vivo* em camundongos BalbC corroboraram essas descobertas, mostrando uma carga bacteriana reduzida e resultados histológicos favoráveis em feridas tratadas com nanopartículas. **Conclusão:** As descobertas apoiam as possíveis aplicações de nanopartículas de sulfeto de zinco em vários contextos, incluindo preservação industrial de alimentos, dispositivos médicos e curativos de feridas, onde a formação de biofilme representa um risco de infecção.

Palavras-chave: Nanopartículas; Biofilmes Bacterianos; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella oxytoca*.

Abstract

Introduction: Biofilm formation is a survival strategy employed by certain bacteria to thrive in adverse conditions, promoting antimicrobial resistance. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella oxytoca* are notable pathogens that produce biofilm. Nanoparticles, specifically zinc oxide (ZnO) and zinc sulfide (ZnS), are emerging as promising antimicrobial agents due to their effectiveness against bacteria and biofilms.

Objective: To investigate the impact of zinc oxide and zinc sulfide nanoparticles on the growth of Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *P. aeruginosa* and *K. oxytoca*, as well as on biofilm formation. Gene expression analysis and *in vivo* experiments were carried out using a murine skin wound model. **Methods:** Bacterial suspensions in Müller-Hinton liquid medium were treated with various concentrations of ZnO and ZnS nanoparticles for 24 hours at 37°C. Cell viability was assessed using the XTT assay. Minimum inhibitory concentrations were determined and inhibitory effects on biofilm formation were confirmed using scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy. PCR analysis was carried out to evaluate the effect of the nanoparticles on bacterial gene expression profiles. The *in vivo* experiments involved the creation of standardized wounds in BalbC mice, with some wounds treated with nanoparticles. The wound tissues were analyzed for bacterial load and histological changes. **Results:** Both ZnO and ZnS nanoparticles showed inhibitory effects on bacterial biofilm formation. Notably, ZnS showed superior efficacy compared to ZnO, particularly at lower concentrations. PCR analysis revealed a significant down-regulation of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* treated with ZnS nanoparticles. *In vivo* studies in BalbC mice corroborated these findings, showing a reduced bacterial load and favorable histological results in nanoparticle-treated wounds. **Conclusion:** The findings support the possible applications of zinc sulfide nanoparticles in various contexts, including industrial food preservation, biofilm inhibition, medical devices and wound dressings, where biofilm formation poses a risk of infection.

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

Lista de Abreviaturas

AI	Auto Indutores
AgNP	Nanopartícula de Prata
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMDF	Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
FCFar	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
CIM ₅₀	Metade da Concentração Inibitória Mínima
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
<i>K. o</i>	<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 à Meticilina
NPs	Nanopartículas
<i>P. a</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
QS	Quórum sensing
<i>S. a</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
UFC	Unidade Formadora de Colônias	
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”	
USP	Universidade de São Paulo	
XTT Carboxanilide)	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-	Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-
Zn	Zinco	
ZnO	Óxido de Zinco	
Zn-NPs	Nanopartículas de Zinco	
ZnS	Sulfeto de Zinco	

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 01** – Análise de nanopartículas (NPs) de ZnO e ZnS por microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....28
- Figura 02** – Ensaio de solubilização de cristal violeta com ácido acético a 30% em água destilada, com inóculo de *S. aureus*, *K. oxytoca* e *P. aeruginosa* adicionado juntamente com ZnO e ZnS.....31
- Figura 03** – Microscopia confocal de biofilmes bacterianos após 24 horas de crescimento na presença de NPs de ZnO ou ZnS.....31

Capítulo 2

- Figura 01** – . Caracterização de nanopartículas (NPs) de ZnS e ZnO preparadas pelo método sol-gel.....49
- Figura 02** - . Concentração inibitória mínima (MIC) de nanopartículas (NPs) de ZnO e ZnS contra várias cepas bacterianas (n = 3).....50
- Figura 03** - . Viabilidade celular de biofilmes bacterianos de 24 horas após o tratamento com nanopartículas de ZnS e ZnO (n = 3) em caldo Müller-Hinton.....51
- Figura 04** - Microscopia confocal de biofilmes bacterianos após 24 horas de crescimento na presença de NPs de ZnO ou ZnS e análises quantitativas da porcentagem (%) de intensidade fluorescente/mm².....55
- Figura 05** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) de biofilmes bacterianos após 24 horas com ou sem nanopartículas (NPs) de ZnO ou ZnS.57
- Figura 06** – Progressão de feridas cutâneas infectadas por *Staphylococcus aureus* ao longo do tempo, com ou sem tratamento com Zn-NPs.....58
- Figura 07** – Progressão de feridas cutâneas infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* ao longo do tempo, com ou sem tratamento com Zn-NPs59
- Figura 08** – Lâminas de pele coradas com H&E após 3 dias pós-infecção (3 dpi) com ou sem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).....60
- Figura 09**- Lâminas de pele coradas com Gram após 3 dias pós-infecção (3 dpi) com ou sem *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA).....61

Figura 10 – Imagem de lâminas de pele coradas com Tricrômio de Masson após 3 dias pós-infecção por MRSA	62
Figura 11 – Lâminas de pele coradas com H&E após 3 dias pós-infecção (3 dpi) com ou sem <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 12 – Lâminas de pele coradas com Gram após 3 dias pós-infecção (3 dpi) com ou sem <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Figura 13 – Imagem de lâminas de pele coradas com Tricrômio de Masson após 3 dias pós-infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Concentrações inibitória mínima (MIC) e bactericida (MBC) de NPs de ZnO e ZnS contra bactérias (n = 3)	29
Tabela 2 – Genes-alvo e oligonucleotídeos para RTqPCR em Expressão Normalizada (ne)	52
Tabela 3 - Cepas utilizadas neste trabalho.....	67

Sumário

Introdução	15
Capítulo 1	23
Abstract	24
Introduction	25
Results	27
Discussion.....	32
Materials and Methods	33
Acknowledgments.....	37
References.....	38
Capítulo 2	43
Abstract	44
Introduction	45
Results	48
Discussion.....	64
Materials and Methods	67
Acknowledgments.....	74
References.....	75
Conclusões Finais.....	91
Referências.....	92

Introdução

Atualmente, as infecções bacterianas afetam cerca de 300 milhões de indivíduos ao redor do mundo; destacados, dois milhões resultam em óbitos em crianças (1–3), e em 1996 custava cerca de 7,5 bilhões de dólares por ano aos países desenvolvidos; hoje ocorrem 24 bilhões de euros aos países desenvolvidos (4). No final da década passada, somente infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos custaram aos sistemas de saúde norte-americanos 1,7 bilhões por ano e com um número de óbitos de quase 11 mil pacientes (5). Atualmente, a resistência bacteriana aos impactos dos agentes antimicrobianos é um assunto crucial para a saúde pública global, uma vez que as bactérias multirresistentes são mais complicadas a controlar (6,7). A produção diária de biofilmes pelas bactérias representa um perigo constante para a saúde da população, pois o biofilme é um componente essencial para a colonização e resistência das bactérias a fatores externos, principalmente aos antibióticos (8). O uso de sondas nasogástricas, catéteres e veiculações de fármacos aumenta a vulnerabilidade às infecções bacterianas multirresistentes em hospitais (8–11).

A produção de biofilmes por bactérias encontradas no dia a dia representa constante perigo à saúde da população, pois o biofilme é um fator crucial para a colonização e resistência às forças externas das bactérias, principalmente por antibióticos em hospitais, vidas humanas em situações de maior vulnerabilidade, pacientes que fazem uso de sondas nasogástricas, catéteres e veiculações de fármacos ficam em situação de risco às infecções bacterianas multirresistentes (14,15). O custo total adicional em pacientes com infecções bacterianas resistentes, adquiridas nos ambientes hospitalares, pode chegar a US\$143.355,93 dólares (16). O custo médio de um paciente internado decorrente da infecção por *S. aureus* resistente, no estado de Louisiana, EUA, é de US\$44.922,00 dólares (17).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou uma lista de prioridades globais de bactérias resistentes a antibióticos para orientar a pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos. As bactérias utilizadas neste estudo são as bactérias classificadas pela OMS como prioridade **1 – Crítico** (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*) e prioridade **2 – Alta** (*Staphylococcus aureus*) (18). A OMS alertou em 2019 para uma possível pandemia causada por microrganismos superresistentes e a projeção era que, em 2050, dez milhões de pessoas morreriam anualmente em decorrência de superbactérias, se tornando a principal causa de mortes, ultrapassando as outras doenças, como o câncer (4,19). Assim, o controle da formação de biofilmes bacterianos resulta em um grande paradigma: quanto maior

a quantidade de bactérias expostas a antibióticos, mais bactérias resistentes surgirão, portanto o controle dessa problemática sem a utilização de substâncias tóxicas como sanitizantes ou conservantes e antibióticos é de extrema importância. Em nota, a ANVISA orientou para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19, decorrentes do uso desenfreado de antibióticos (ANVISA, 2021). A Fiocruz alertou, em matéria divulgada online (20), que a detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia e muitas dessas bactérias se beneficiam da Covid-19 e resultam no agravamento dos sintomas (21).

Corroborando com toda a problemática sobre a saúde humana, os biofilmes bacterianos também representam anualmente, um enorme prejuízo às indústrias alimentícias (9,22). Nestas a deterioração e a degradação dos alimentos causados por bactérias, não resultam apenas em enormes perdas econômicas, mas comprometem a segurança dos alimentos; o que é uma grande prioridade no mercado globalizado de hoje, com transporte e consumo mundial de alimentos *in natura*, frescos e minimamente processados (23,24).

A produção de biofilmes por bactérias do meio ambiente representam constante perigo à saúde humana e animal e prejuízos à indústria alimentícia (8). Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* ssp. e *Listeria monocytogenes* formam biofilmes e representam um perigo à integridade dos alimentos e consequentemente aos consumidores (9).

Staphylococcus 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 e *aureus* indica a cor dourada, característica da espécie, resultado da produção de estafilocoxantina, antioxidante responsável pela proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (25). O *S. aureus* é Gram, catalase e coagulase positivos, imóveis, não esporulados (26). 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 úlceras de pressão, impetigo, e até infecções sistêmicas provocadas pela bacteremia e é causador de intoxicação alimentar devido à produção de toxinas (27–31). Podem ser observados em agrupamentos irregulares semelhantes a “cachos de uva”(26). 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

hospitais. Espécie caracterizada por ser termo resistente, não formadoras de esporos, e que sobrevive por longos períodos (32). Apesar de ser encontrado na microbiota da pele e mucosa nasal de indivíduos saudáveis, é uma bactéria de interesse uma vez que se encontra dentre as bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), responsável por grande parte dos surtos destas doenças no Brasil e no mundo já que a produção do biofilme se aproveita de moléculas orgânicas dos alimentos para se fixar estruturalmente (33) e também devido a produção de enterotoxinas causadoras de enterocolite (34). Ele pode estar associado a diversas infecções hospitalares, quando as barreiras naturais do hospedeiro são comprometidas por algum trauma ou cirurgia (35). Biofilmes de *S. aureus* podem ser encontrados em sondas e cateteres (cateter venoso central de acesso à nutrição parenteral) em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (36) 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 infecções cutâneas crônicas, como foliculite e impetigo, infecções sistêmicas (27,37),

O sistema de controle da formação de biofilme e expressão de fatores de virulência do *S. aureus* mais importante é o sistema de Quórum *sensing* regulador de gene acessório (*agr*), responsável pelo controle da maturação do biofilme, a partir de sinalizações intercelulares ligadas, principalmente à densidade populacional do meio em que as bactérias se encontram. (38). O sistema *agr* é codificado por uma região específica do cromossomo bacteriano formado de dois transcritos: o RNAII, que possui a função principal de produção da molécula sinalizadora do QS (neste caso, um peptídeo auto indutor, ou AIP) e seu receptor, assim como de regular diretamente alguns genes; e o RNAlII que é o efetor principal do sistema *agr* e age regulando positiva ou negativamente diversos genes de fatores de virulência (39,40).

O RNAII codifica as proteínas Agr-A, responsável por regular a expressão de alguns genes de virulência diretamente assim como a expressão do próprio RNAII (formando um ciclo positivo de retroalimentação); *agrB*, que possui a função de modificar a *agrD*, para a síntese do AIP sinalizador do sistema; *agrC*, que, quando apresentado na superfície celular, reconhece o AIP presente no meio e inicia uma cascata de sinalizações intracelulares, com a participação da Agr-A, responsável em última instância pela regulação de vários genes, inclusive a promoção de expressão do RNAlII; e *agrD*, que se trata do percurso para o AIP sinalizador do sistema, que sofre modificações da Agr-B assim como de outras enzimas até sua preparação total como sinalizador. Já o RNAlII age diretamente na regulação da maioria

dos genes de fatores de virulência, inclusive na regulação positiva de genes produtores de toxinas e exoenzimas e na regulação negativa do gene do repressor de toxinas (Rot) e de adesinas (41). Portanto, os genes alvos deste estudo são *agrA* e *agrC*, devido as suas importâncias e participação nos fatores de virulência (38,42).

Outra bactéria de importância clínica e na indústria alimentícia, produtora de biofilmes, é a *Pseudomonas* sp. 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 (26). 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 metálicas (43,44). 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 (45,46).

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 (47,48); 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 (36,49). *Pseudomonas aeruginosa* tem como principal característica a coloração verde de suas unidades formadoras de colônia, bem como a formação de biofilmes. É também característica a produção de sideróforos - substâncias quelantes responsáveis por capturar ferro do ambiente. São metabólitos secundários de baixo peso molecular - 400 a 1000 kDa, capazes de se ligar a íons férricos em situação de reduzida quantidade de ferro livre como pyoverdina e pyocianina (50,51).

Devido à ampla disseminação no ambiente, esse microrganismo é o principal colonizador de equipamentos médicos como, por exemplo, cateteres (52), provocando, amplamente, infecções nosocomiais como pneumonia por ventilação mecânica, meningoencefalite e sepse (44,53). Essa espécie é também comumente identificada em pacientes com fibrose cística - doença genética provocada pela reduzida depuração do mucociliar no interior dos pulmões desses pacientes. Essa condição se dá devido à mutação no gene CTFR, que ocasiona má formação no regulador de condutância transmembrana, levando

a retenção do muco (54). O sistema de depuração do mucociliar consiste em um mecanismo de defesa do sistema respiratório, pelo qual são eliminados poluentes, partículas inaladas, bem como patógenos. Logo, a falha nesse processo, facilita a colonização polimicrobiana do pulmão, formando biofilmes e dificultando a atividade antibiótica (55). Assim, a infecção dos pulmões já comprometidos, inclusive em decorrência da COVID-19 (56), pode acarretar em um progresso mais acelerado da doença, além de intensificar os sintomas por ela induzidos, podendo provocar danos irreversíveis ao trato respiratório.

Os biofilmes produzidos pela *P.aeruginosa* são formados principalmente por três exopolissacarídeos: o polysaccharide synthesis locus (psl), pellicle polysaccharide (pel) e alginato (alg). Estes têm o objetivo de formação, maturação e retenção de água e nutrientes no biofilme (57–60). O alginato é o principal e mais abundante e responsável pela retenção de água e nutrientes no biofilme e tem uma forte associação e dependência com o psl (61). Portanto os genes alvos são os *pslA* e *algC*.

A bactéria *Klebsiella oxytoca*, pertencente à família das Enterobacteriaceae, possui formato bacilar, Gram-negativa, aeróbia e anaeróbia facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, não-movél e capsulada. Ocorre normalmente no trato gastrointestinal, em isolamentos clínicos, na água, no solo, em vegetais, frutas e nos cereais (62). Uma das principais espécies desse gênero é a *K.oxytoca*, 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 (63). Esta bactéria contém vários fatores de virulência, como a citotoxina conhecida como tillivalina (64) e outras estruturas adesivas (presentes no biofilme), incluindo adesinas para fimbria (tipo 1 e tipo 3) e polissacarídeo capsular. As principais subunidades das adesinas fimbriais tipo 1 e tipo 3 e a biosíntese capsular são codificadas pelos genes *fimA*, *mrkA* e *matB*, respectivamente (65–67). Os genes alvos deste estudo são *fimA* e *mrkA*.

Devido ao grande número de problemas causados por estas bactérias à humanidade, devido à sua interação com alimentos e de doenças transmitidas por alimentos (DTA) há urgência em novas soluções para um eficiente controle (2).

Na busca por novas substâncias antimicrobianas que não desencadeiam resistência bacteriana, as nanopartículas (NPs), especialmente os Quantum dots (Qd) – nanopartículas com tamanho não maior que alguns nanômetros, 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)(68).

A utilização de modelos alternativos, em algumas situações, empregando a nanotecnologia, tem mostrado ser promissor. Neste sentido, as nanopartículas surgem como uma dessas alternativas, pois os mecanismos envolvidos no controle da formação de biofilmes bacterianos, não geram resistências e não agravam esses problemas. Os Qd são uma realidade na área da nanobiotecnologia devido às suas propriedades físicas e químicas únicas e da possibilidade de sua obtenção em nanoescala, fundamentais tanto para o controle do crescimento bacteriano flutuante quanto de biofilmes previamente formados. (68).

As NPs vêm despertando um singular interesse devido ao seu amplo espectro de aplicação com novas respostas às problemáticas causadas por microrganismos. Algumas partículas apresentam características antissépticas e antimicrobianas (69). Entre as NPs mais comuns no controle do crescimento microbiano destacam-se os de zinco (óxido de zinco) e de prata (AgNPs) (70,71). 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 (72). 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 (73). A maneira que os nano cristais 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 (74). 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. Porém, ainda não existem muitos relatos acerca das NPs-ZnS em relação a sua possível atividade antimicrobiana principalmente em tamanhos nanométricos como os utilizados neste trabalho (1,5 nm) (74,75).

NPs-ZnO pertencem ao grupo de semicondutores do tipo *n* e *band gap*, quando puras e apresentam coloração branca (76). 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 (77,78). 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(79).

As bactérias-alvo deste estudo foram selecionadas com base na importância na indústria de alimentos (9,48,80–82), na contaminação de alimentos decorrentes da manipulação humana (23,33,83,84) e, na área médica (32,60,85–89), que contribuem para infecções letais em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles em UTI com intubação orotraqueal e que podem evoluir para pneumonias nosocomiais e infecções de pele.

Assim, neste trabalho estudou-se os mecanismos reguladores da produção e secreção de biofilmes bacterianos por meio da ação de Óxido e Sulfeto de Zinco (NP-ZnO e NP-ZnS), além de avaliar a inibição do crescimento bacteriano e formação de biofilmes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. oxytoca* e sua aplicação em modelos animais, *in vivo*, principalmente avaliando a citotoxicidade e capacidade de indução de resposta inflamatória. Como resultado deste estudo é possível entender as bases do uso de NPs-Zn como antimicrobianos e cicatrizantes, especialmente o ZnS, no revestimento de superfícies abióticas prevenindo os efeitos dos biofilmes bacterianos na indústria alimentícia, e, na área médica, principalmente na produção de materiais de uso crônico como, por exemplo, as sondas enterais e orotraqueal, além de outras aplicações.

Frente ao exposto, a presente tese de doutorado foi desenvolvida para contemplar os seguintes objetivos:

- Determinar a sensibilidade bacteriana aos tratamentos com suspensões de nanopartículas de zinco.
- Avaliar a atividade antibacteriana das nanopartículas de ZnO e ZnS contra os biofilmes maduros de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. oxytoca*.
- Investigar as estruturas dos biofilmes formados na presença e ausência das Zn-NPs por meio de fluorescência em microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura.
- Analisar a expressão gênica das vias de formação de biofilmes e fatores de virulência de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. oxytoca* por RTqPCR.
- Avaliar o efeito das NP-Zn em feridas de pele infectadas em um modelo murino, analisando a resposta à inflamação, morfológica e a formação de colágeno.

Conclusões Finais.

A crescente ameaça da resistência bacteriana aos antibióticos instiga uma busca contínua por soluções eficazes para combater problemas como infecções de pele, resistência antimicrobiana, intoxicação alimentar e deterioração de alimentos, especialmente em ambientes hospitalares, onde os pacientes suscetíveis a infecções nosocomiais exigem intervenções urgentes. Nesse contexto desafiador, as nanopartículas de ZnS surgiram como uma alternativa promissora, destacando-se por sua eficácia antimicrobiana, especialmente contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, quando comparadas ao ZnO.

Esse estudo destaca não apenas a capacidade do ZnS de inibir o crescimento bacteriano (artigo 1 (129)), mas também sua capacidade de modular a expressão gênica associada a fatores de virulência e à formação de biofilme (Artigo 2). Apesar da eficácia semelhante entre o ZnS e o ZnO contra várias cepas bacterianas, o ZnS tem uma vantagem distinta por apresentar um MIC mais baixo contra biofilmes maduros e *P. aeruginosa*, especialmente em sua forma de menor tamanho (Artigo 2), uma bactéria conhecida por sua resistência e virulência. A presença de enxofre no ZnS lhe confere uma vantagem adicional, permitindo que ele supere a resistência bacteriana e inibe efetivamente a formação de biofilme.

Além disso, as análises morfológicas por CLSM e SEM confirmam que o ZnS induz biofilmes menos densos e estruturalmente distintos em comparação com o ZnO em ambos os artigos, sugerindo uma remodelação da morfologia do biofilme sob a influência do ZnS. Essa característica torna os biofilmes mais vulneráveis à ação de agentes antimicrobianos. Estudos em modelos murinos no artigo 2 também revelaram um aumento na resposta inflamatória e uma redução significativa no número de CFUs após o tratamento com ZnS, indicando uma capacidade de recrutar células imunológicas e uma ação direta sobre as bactérias.

Em resumo, as nanopartículas de ZnS representam uma estratégia terapêutica promissora na luta contra infecções bacterianas resistentes. Sua capacidade de inibir fatores de virulência, remodelar biofilmes e promover uma resposta imune robusta destaca sua importância na busca por soluções antimicrobianas eficazes. Os resultados obtidos fornecem uma base sólida para pesquisas futuras destinadas a validar a eficácia do ZnS em modelos de feridas murinas, contribuindo assim para o desenvolvimento de terapias inovadoras no campo do combate a bactérias em estado sésil ou planctônico, mesmo em infecções, com uma possível aplicação futura em revestimentos de superfície, embalagens de alimentos, curativos e agentes de cicatrizantes.

Referências

1. 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. *Veterinary Journal*. 2016;209:174–9.
2. 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 Futures*. 2017;1(1):015004.
3. Vigilância G De. Orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19. Ministério da Saúde. 2021;1–37.
4. Minarini LADR, Andrade LN de, De Gregorio E, Grosso F, Naas T, Zarrilli R, et al. Editorial: Antimicrobial Resistance as a Global Public Health Problem: How Can We Address It? Vol. 8, *Frontiers in Public Health*. 2020.
5. Centers for Disease Control and. Antibiotic resistance threats in the United States. US Department of Health and Human services. 2019;1–113.
6. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 19 de agosto de 2020;84(3):1–36. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.00026-19>
7. Costa FG, Horswill AR. Overcoming pH defenses on the skin to establish infections. *PLoS Pathog*. 1º de maio de 2022;18(5).
8. 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*. 2017;262(January):89–98.
9. Srey S, Jahid IK, Ha S Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013;31(2):572–85.
10. 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.

11. Han G, Martinez LR, Mihi MR, Friedman AJ, Friedman JM, Nosanchuk JD. Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. *PLoS One*. 2009;4(11):1–7.
12. Banerjee S, Vishakha K, Das S, Dutta M, Mukherjee D, Mondal J, et al. Antibacterial, anti-biofilm activity and mechanism of action of pancreatin doped zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;190(November 2019):110921.
13. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*. outubro de 2010;109(4):1117–31.
14. Neog N, Phukan U, Puzari M, Sharma M, Chetia P. *Klebsiella oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. *Curr Microbiol [Internet]*. 3 de abril de 2021;78(4):1115–23. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>
15. Inagawa T, Hisatsune J, Kutsuno S, Iwao Y, Koba Y, Kashiya S, et al. Genomic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from patients admitted to intensive care units of a tertiary care hospital: epidemiological risk of nasal carriage of virulent clone during admission. Altman DR, organizador. *Microbiol Spectr [Internet]*. 6 de maio de 2024; Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02950-23>
16. Mouly M, Puello Guerrero A, Dumartin C, Silva M, Aulois-Griot M. Cost Assessment Of Acquired Resistant Bacterial Infection In A Hospital In The Dominican Republic. *Value in Health*. 2017;20(9):A856.
17. Liu E, Cen R, Shi Q, Shi L, Schoonmaker M. Prevalence Trend, Hospital Length of Stay, and Costs of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (Mrsa Infection (Mrsa-I) and Mrsa Septicemia (Mrsa-S) Among Hospital Discharges in the United States, 2009–2012. *Value in Health*. 2016;19(3):A214.
18. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of Medical Society*. 2018;32(1):76–7.
19. WHO. Antimicrobial Resistance and the United Nations Sustainable Development Cooperation Framework.

20. Fiocruz NP. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. :8–11.
21. Cendra M del M, Torrents E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnol Adv.* 2021;49(March):107734.
22. Durán IR, Laroche G. Current trends, challenges, and perspectives of anti-fogging technology: Surface and material design, fabrication strategies, and beyond. *Prog Mater Sci.* 2019;99(September 2018):106–86.
23. Fao/Who. Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables. *World Health.* 2008;1–38.
24. 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.* 2019;206(October 2018):412–9.
25. Harris TA, Gattu S, Propheter DC, Kuang Z, Bel S, Ruhn KA, et al. Resistin-like Molecule α Provides Vitamin-A-Dependent Antimicrobial Protection in the Skin. *Cell Host Microbe.* 12 de junho de 2019;25(6):777-788.e8.
26. Tortora GerardJGJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10º ed. Artmed; 2012. 967 p.
27. 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.
28. Machado CD, Antunes FS, Souza PA. Incidência De Infecções Primárias Na Corrente Sanguínea Em Uma Uti Neonatal. *Arquivos Catarinenses de Medicina.* 2017;46(2):88–96.
29. Oliveira AC, Oliveira de Paula A, Iquiapaza R, Sarmiento Gama C. Perfil dos microrganismos associados à colonização e infecção em Terapia Intensiva. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.* 2017;7(2):1–6.
30. 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.
31. 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.

32. 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.* dezembro de 1998;44(4):137–43.
33. Maia DSV, Haubert L, Kroning IS, Soares K dos S, Oliveira TL, da Silva WP. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. Rodr. Extract on planktonic and biofilm cells. *Lwt.* 2020;117(September 2019):108685.
34. Ala'Aldeen DAA, Hiramatsu K. *Staphylococcus Aureus: Molecular and Clinical Aspects* [Internet]. *Staphylococcus Aureus: Molecular and Clinical Aspects*. 2004. 1–267 p. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84904239096&partnerID=40&md5=917b9f3ebb0042c7e5aff4e87e6d3d4f>
35. Welch K, Cai Y, Strømme M. A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *J Funct Biomater.* 1º de junho de 2012;3(2):418–31.
36. Siddiq DM, Darouiche RO. New strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections. *Nat Rev Urol.* 2012;9(6):305–14.
37. Almeida J de, Santos G V, Orsi MT, Cechella BC, Bernardi A V, Felipe WT. Tratamento do biofilme intracanal de *Enterococcus faecalis* com suspensões de diferentes nanopartículas e irrigantes convencionais TT. *Arq Cent Estud Curso Odontol Univ Fed Minas Gerais.* 2015;51(1):32–8.
38. Shi L, Wu Y, Yang C, Ma Y, Zhang Q zhao, Huang W, et al. Effect of nicotine on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence factors. *Sci Rep.* 27 de dezembro de 2019;9(1):20243.
39. Williams MR, Costa SK, Zaramela LS, Khalil S, Todd DA, Winter HL, et al. Quorum sensing between bacterial species on the skin protects against epidermal injury in atopic dermatitis. *Sci Transl Med.* 2019;11(490).
40. Gandra TKV, Volcan D, Kroning IS, Marini N, de Oliveira AC, Bastos CP, et al. Expression levels of the *agr* locus and *prfA* gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37 °C. *Int J Food Microbiol.* 2019;300(April):1–7.

41. Mahamuni-Badiger PP, Patil PM, Badiger M V., Patel PR, Thorat- Gadgil BS, Pandit A, et al. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. março de 2020;108(June 2019):110319.
42. Sully EK, Malachowa N, Elmore BO, Alexander SM, Femling JK, Gray BM, et al. Selective Chemical Inhibition of agr Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Promotes Host Defense with Minimal Impact on Resistance. *PLoS Pathog*. 2014;10(6).
43. Møretrø T, Langsrud S. Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. 2017;16:1022–41.
44. 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.
45. Bremer P, Brooks J, Flint S, Palmer J, Burgess S, Lindsay D, et al. Biofilm Formation and Control in the Dairy Industry. *Reference Module in Food Science*. 2018;1–6.
46. 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*. 18 de outubro de 2016;7:1–21.
47. Caixeta DS. Sanitificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Universidade Federal de Lavras; 2008.
48. 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 Science and Technology*. 2018;84(January):47–57.
49. Storti A, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from Intensive care Unit Patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. setembro de 2005;36(3):275–80.
50. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. março de 2012;76(1):46–65.

51. Schalk IJ, Guillon L. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. *Environ Microbiol.* 2013;15(6):1661–73.
52. Sangani MH, Moghaddam MN, Forghanifard MM. Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on *pseudomonas aeruginosa* biofilm formation Inhibition of biofilm formation by zinc oxide nanoparticles. *Nanomed J.* 2015;2(2):121–8.
53. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177–92.
54. Ding L, Wang J, Cai S, Smyth H, Cui Z. Pulmonary biofilm-based chronic infections and inhaled treatment strategies. *Int J Pharm.* 2021;604(June):120768.
55. Morris AJ, Jackson L, CW Yau Y, Reichhardt C, Beaudoin T, Uwumarenogie S, et al. The role of Psl in the failure to eradicate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in children with cystic fibrosis. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021;7(1).
56. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection.* 2020;81(2):266–75.
57. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* julho de 2012;36(4):893–916.
58. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. Ausubel FM, organizador. *PLoS Pathog.* 27 de março de 2009;5(3):e1000354.
59. Billings N, Ramirez Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasova Y, Stocker R, et al. The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog.* 2013;9(8).
60. Tavafi H, Ali AA, Ghadam P, Gharavi S. Screening, cloning and expression of a novel alginate lyase gene from *P. aeruginosa* TAG 48 and its antibiofilm effects on *P. aeruginosa* biofilm. *Microb Pathog.* 2018;124(August):356–64.
61. Beloin C, Ghigo J marc. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. 2010;13(1):16.

62. Spagiari MS. Análise do comportamento de *Klebsiella oxytoca* CIP 79.32 em solução contendo cromo hexavalente. Dissertação de mestrado, Centro Universitario La Salle. Centro Universitário La Salle - UNILASALLE; 2014.
63. Cai L, Wang HH, Liang L, Wang G, Xu X, Wang HH. Response of Formed-Biofilm of *Enterobacter cloacae* , *Klebsiella oxytoca* , and *Citrobacter freundii* to Chlorite-Based Disinfectants. *J Food Sci.* maio de 2018;83(5):1326–32.
64. Zollner-Schwetz I, Herzog KAT, Feierl G, Leitner E, Schneditz G, Sprenger H, et al. The Toxin-Producing Pathobiont *Klebsiella oxytoca* Is Not Associated with Flares of Inflammatory Bowel Diseases. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3393–8.
65. Alkhudhairy MK, Alshadeedi SMJ, Mahmood SS, Al-Bustan SA, Ghasemian A. Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. *Microb Pathog.* 2019;134(April):103558.
66. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine N, De la Cruz MA, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella Pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence.* 2013;4(2):129–38.
67. 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 New Infect.* 2019;27:36–9.
68. Gupta A, Landis RF, Rotello VM. Nanoparticle-Based Antimicrobials: Surface Functionality is Critical. *F1000Res.* 2016;5(0):364.
69. 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.
70. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G, et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine.* 1º de abril de 2016;12(3):789–99.
71. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nanomicro Lett.* 2015;7(3):219–42.

72. Travessini D. Síntese e caracterização de nanopartículas de sulfeto de zinco. Universidade Federal de Santa Catarina; 2010.
73. 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. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2014;16(37):20127–37.
74. 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. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2017;103(September 2016):179–89.
75. 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* (1979). 2000;290(5497):1744–7.
76. 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*. 15 de agosto de 2005;98(4):041301.
77. Santana SV de. Nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas. Universidade Federal da Paraíba; 2012.
78. Seil JT, Webster TJ. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomater*. junho de 2011;7(6):2579–84.
79. Zarrindokht Emami-Karvani. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Afr J Microbiol Res*. 2012;5(18):1368–73.
80. Burke N, Southern M, Ryan A, Adley CC. Investigating the current skim milk powder inspection strategies for improvements in process optimisation. *Food Control*. 2018;94(June):17–21.
81. De Oliveira AM, Da Silva Fernandes M, De Abreu Filho BA, Gomes RG, Bergamasco R. Inhibition and removal of staphylococcal biofilms using *Moringa oleifera* Lam. aqueous and saline extracts. *J Environ Chem Eng*. 2018;6(2):2011–6.

82. Oxaran V, Lee SHI, Chaul LT, Corassin CH, Barancelli GV, Alves VF, et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiol.* 2017;68:16–23.
83. 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.* 2018;75:47–54.
84. 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.
85. Santos AL dos, Santos DO, Freitas CC de, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med.* 2007;43(6):413–23.
86. AlKahtani RN. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *Saudi Dental Journal.* 2018;30(2):107–16.
87. 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.
88. Kumar P, Mishra S, Singh S. Actualités sur la formation des biofilms, leur développement, les infections associées et leur contrôle. *Journal des Anti-Infectieux.* 2017;19(1):20–31.
89. Singh L, Cariappa MP, Kaur M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Med J Armed Forces India.* 2016;72:S59–61.
129. Bianchini Fulindi R, Domingues Rodrigues J, Lemos Barbosa TW, Goncalves Garcia AD, de Almeida La Porta F, Pratavieira S, et al. Zinc-Based Nanoparticles Reduce Bacterial Biofilm Formation. Burbank LP, organizador. *Microbiol Spectr* [Internet]. 28 de fevereiro de 2023; Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.04831-22>