

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Desenvolvimento de nanomateriais aplicáveis ao controle de bactérias
resistentes de interesse clínico e agropecuário**

Thiago Rodrigues da Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

**Desenvolvimento de nanomateriais aplicáveis ao controle de bactérias
resistentes de interesse clínico e agropecuário**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogerio Totola

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586d
2025
Silva, Thiago Rodrigues da, 2000-
Desenvolvimento de nanomateriais aplicáveis ao controle
de bactérias resistentes de interesse clínico e agropecuário /
Thiago Rodrigues da Silva. – Viçosa, MG, 2025.
1 dissertação eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.517>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Lipopeptídeos. 2. Materiais nanoestruturados.
3. Biofilmes. 4. Agentes antiinfecciosos. 5. Biotecnologia.
I. Tótola, Marcos Rogério, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 572.57

THIAGO RODRIGUES DA SILVA

Desenvolvimento de nanomateriais aplicáveis ao controle de bactérias resistentes de interesse clínico e agropecuário

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 6 de maio de 2025.

Assentimento:

Thiago Rodrigues da Silva
Autor

Marcos Rogerio Totola
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 21/08/2025 às 16:13:49 e pelo orientador em 21/08/2025 às 16:46:11. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **46SG.WXTB.LBQW** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e iluminar meus caminhos até aqui.

À minha mãe, Elisângela, que sempre acreditou em mim e nunca poupou esforços para que meus objetivos fossem concretizados. Sempre me dando apoio em todas minhas escolhas, independente do resultado final, confiou em mim.

Aos meus amigos e amigas de Viçosa — José, Thamires, Millena, Bruna e Izabela — pelo apoio incondicional e por tornarem essa jornada muito mais leve e divertida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, por todo o conhecimento compartilhado, e aos funcionários do departamento, pela ajuda sempre que solicitados. Em especial à Letícia, sempre solícita e atenciosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Marcos Rogério Tótola, por todo apoio e conhecimento compartilhado, pela confiança, pela condução sábia dos recursos e da gestão laboratorial no geral.

Ao técnico Alex Gazolla de Castro, pelo suporte nos meus experimentos e pela constante disposição em ajudar a todos.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pelo suporte nas análises estatísticas.

À professora Renata Pereira Lopes Moreira, por toda paciência, disponibilidade, pelo apoio nas análises químicas e ajuda nas sínteses dos materiais.

À Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, por ter cedido os isolados bacterianos e pelo suporte na condução dos experimentos.

Ao Leonardo e às técnicas Nívia e Paula, do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, pela ajuda nas análises de susceptibilidade microbiana e pelos valiosos ensinamentos.

À Amanda, pós-doutoranda do laboratório, pelos conhecimentos compartilhados diariamente.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do LBBMA, em especial à estagiária Stephany, pelo auxílio nos experimentos e por tornar a rotina mais leve. À doutoranda Mariana, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio.

Aos técnicos Kleriton e Patrícia, pelo suporte nas análises físico-químicas.

Aos familiares e amigos, por todo apoio e torcida.

A todos que contribuíram, de algum modo, para que eu chegasse até aqui.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, Thiago Rodrigues da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2025. **Desenvolvimento de nanomateriais aplicáveis ao controle de bactérias resistentes de interesse clínico e agropecuário.** Orientador: Marcos Rogerio Totola.

Diante do crescente desafio imposto pela resistência bacteriana a antimicrobianos de uso clínico, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é essencial para o controle de infecções, especialmente aquelas associadas à formação de biofilmes. Neste estudo, avaliou-se a eficácia de lipopeptídeos produzidos por um isolado de *Bacillus velezensis* e nanomateriais (pontos quânticos de carbono e nanopartículas de prata) no combate a patógenos de interesse humano e veterinário, com foco na inibição de biofilmes bacterianos. Os patógenos avaliados foram *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH (isolada de sepse em humano), *Streptococcus agalactiae* e *S. uberis* (isolados de mastite bovina), *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* e *Escherichia coli* (isolados de mastite caprina), *E. coli* (isolada de peritonite bovina), *Salmonella* sp. (isolada de linfonodo mesentérico de suíno), *Salmonella* sp. (isolada de colite equina) e *E. coli* (isolada de infecção sistêmica em aves). O trabalho seguiu as seguintes abordagens: (i) caracterização físico-química dos nanomateriais formulados, incluindo análise de potencial zeta e espectroscopia de fluorescência para avaliação da estabilidade coloidal e propriedades ópticas e (ii) determinação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos lipopeptídeos e dos nanomateriais, por meio de ensaios inibitórios em microplaca e em cateteres de silicone. Os resultados obtidos evidenciam o potencial dos compostos testados na inibição do crescimento bacteriano e na prevenção da formação de biofilmes. Os lipopeptídeos purificados de *Bacillus velezensis* TR47II e TR59II demonstraram atividade antimicrobiana expressiva frente aos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (bovina), com inibições superiores a 90% para TR59II em ambas as bactérias. Os pontos quânticos de carbono (CQDs) também apresentaram elevada eficácia, atingindo até 98% de inibição do crescimento nas concentrações mais elevadas testadas. Nos ensaios de inibição da formação de biofilmes em microplaca, as formulações NPAgCV, NPAgCVEB47 e NPAgRLEB47 destacaram-se como mais efetivas frente ao isolado de *Salmonella* sp. (equino). Para o isolado de *Salmonella* sp. proveniente de linfonodo mesentérico suíno, a maior inibição (58,5%) foi obtida com CQDs na concentração máxima, seguida pelos tratamentos TR59/2000 (86,5%), TR59/1000 (86,25%) e CQD1:10 (84,25%). Nos testes com fragmentos de cateter, a formulação NPAgRLEB47 promoveu a maior

redução na formação de biofilme por *Salmonella* sp. (suíno), com média de inibição de aproximadamente 60%. Os resultados obtidos permitem concluir que o uso de nanopartículas de prata funcionalizadas, pontos quânticos de carbono e lipopeptídeos representam uma abordagem promissora para o controle de patógenos multirresistentes, especialmente em aplicações biomédicas e veterinárias. A funcionalização de nanopartículas metálicas demonstrou potencial para o desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos para dispositivos médicos e uma estratégia alternativa ao uso de antibióticos convencionais. Estudos adicionais são necessários para avaliar a biocompatibilidade e a aplicabilidade desses compostos em larga escala, visando à sua implementação na prática clínica e na agroindústria

Palavras-chave: Lipopeptídeos, Nanotecnologia, Biofilme, Resistência Antimicrobiana, Biotecnologia.

ABSTRACT

SILVA, Thiago Rodrigues da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2025. **Development of nanomaterials applicable to the control of resistant bacteria of clinical and agricultural interest.** Adviser: Marcos Rogerio Totola.

Given the growing challenge posed by bacterial resistance to clinically used antimicrobials, the development of new therapeutic strategies is essential for infection control, especially those associated with biofilm formation. In this study, the efficacy of lipopeptides produced by a *Bacillus velezensis* isolate and nanomaterials (carbon quantum dots and silver nanoparticles) was evaluated against pathogens of human and veterinary interest, with a focus on bacterial biofilm inhibition. The pathogens analyzed included *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH (isolated from human sepsis), *Streptococcus agalactiae* and *S. uberis* (isolated from bovine mastitis), *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* and *Escherichia coli* (isolated from caprine mastitis), *E. coli* (isolated from bovine peritonitis), *Salmonella* sp. (isolated from swine mesenteric lymph node), *Salmonella* sp. (isolated from equine colitis), and *E. coli* (isolated from systemic infection in poultry). The study followed two main approaches: (i) physicochemical characterization of the formulated nanomaterials, including zeta potential analysis and fluorescence spectroscopy to assess colloidal stability and optical properties, and (ii) determination of the antimicrobial and antibiofilm activity of the lipopeptides and nanomaterials through inhibition assays in microplates and silicone catheters. The results obtained highlight the potential of the tested compounds in inhibiting bacterial growth and preventing biofilm formation. Purified lipopeptides from *Bacillus velezensis* strains TR47II and TR59II exhibited significant antimicrobial activity against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* (bovine), with inhibition rates exceeding 90% for TR59II in both bacteria. Carbon quantum dots (CQDs) also showed high efficacy, achieving up to 98% growth inhibition at the highest concentrations tested. In microplate biofilm inhibition assays, the formulations NPAgCV, NPAgCVEB47, and NPAgRLEB47 were the most effective against the *Salmonella* sp. (equine) isolate. For the *Salmonella* sp. isolate from swine mesenteric lymph nodes, the highest inhibition (58.5%) was achieved with CQDs at the maximum concentration, followed by treatments TR59/2000 (86.5%), TR59/1000 (86.25%), and CQD1:10 (84.25%). In catheter fragment assays, the NPAgRLEB47 formulation led to the greatest reduction in biofilm formation by *Salmonella* sp. (swine), with an average inhibition of approximately 60%. These findings suggest that

the use of functionalized silver nanoparticles, carbon quantum dots, and lipopeptides represents a promising approach for controlling multidrug-resistant pathogens, particularly in biomedical and veterinary applications. The functionalization of metallic nanoparticles demonstrated potential for the development of antimicrobial coatings for medical devices and an alternative strategy to conventional antibiotics. Further studies are necessary to assess the biocompatibility and large-scale applicability of these compounds, aiming for their implementation in clinical practice and the agroindustry.

Keywords: Lipopeptides, Nanotechnology, Biofilm, Antimicrobial Resistance, Biotechnology.

INTRODUÇÃO GERAL	11
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Infecções em cateteres e sondas	13
1.2 Biofilmes	14
1.3 Resistência bacteriana, um desafio emergente	14
1.4 Nanobiotecnologia como alternativa no controle microbiano	16
1.4.1 Biossurfactantes	16
1.4.1.1 Lipopeptídeos	18
1.4.1.2 Glicolipídeos	19
1.4.1.3 Ação antimicrobiana dos biossurfactantes	20
1.4.2 Nanomateriais e sua aplicação no controle de infecções bacterianas ...	22
1.4.2.1 Nanopartículas	22
1.4.2.2 Pontos Quânticos de Carbono	23
1.4.2.3 Nanoclusters	24
1.4.3 Efeito sinérgico no controle microbiano	25
1.5 Considerações finais	26
1.6 Referências bibliográficas	27
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS	36
2.1 Introdução	39
2.2 Materiais e Métodos	40
2.2.1 Antibiograma	40
2.2.2 Produção e purificação de lipopeptídeos	41
2.2.3 Síntese dos nanomateriais	42
2.2.4 Bactérias patogênicas utilizadas nos ensaios de inibição	46
2.2.5 Atividade antibiofilme em microplaca	47
2.2.6 Acoplamento dos nanomateriais aos cateteres de silicone	48
2.2.7 Atividade antibiofilme de cateteres de silicone tratados com nanomateriais e PVP	49
2.2.8 Caracterizações	50
2.2.9 Análise de dados e estatística	50

2.3 Resultados e Discussão	51
2.3.1 Antibiograma	51
2.3.2 Ensaio inibitório com lipopeptídeos	57
2.3.3 Ensaio inibitório com Ponto Quântico de Carbono	59
2.3.4 Inibição de biofilme em microplaca	63
2.3.5 Inibição de biofilme em cateter	70
2.3.6 Caracterizações	72
2.4 Considerações finais	82
2.5 Referências bibliográficas	84
APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA	91

INTRODUÇÃO GERAL

As infecções associadas a dispositivos médicos, como cateteres e sondas, representam um problema tanto na medicina humana quanto veterinária. A introdução de materiais invasivos no organismo facilita a colonização por microrganismos patogênicos, que podem formar biofilmes resistentes a compostos antimicrobianos, tornando o tratamento dessas infecções um desafio clínico. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos na medicina e na produção animal tem acelerado o surgimento de microrganismos multirresistentes, comprometendo a eficácia das terapias convencionais (SILVA *et al.*, 2020).

A nanotecnologia e biotecnologia emergem como alternativas promissoras para o controle de infecções, oferecendo abordagens inovadoras para a prevenção e tratamento de doenças causadas por microrganismos resistentes (ZHANG *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2021). O uso de nanopartículas metálicas, biossurfactantes e pontos quânticos de carbono tem sido estudado como uma das alternativas aos tratamentos convencionais, dados o seu potencial antimicrobiano e a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes (CHEN *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). Essas tecnologias podem ser aplicadas para reduzir a incidência de infecções associadas a cateteres e sondas, aumentando a segurança de sua utilização em pacientes humanos e animais.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de diferentes nanomateriais e lipopeptídeos na inibição do crescimento bacteriano e na prevenção da formação de biofilmes em cateteres de silicone, com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias de controle microbiano.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Infecções em cateteres e sondas

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) estão fortemente associadas ao ambiente hospitalar, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Diversos fatores, como o estado clínico dos pacientes, internações prolongadas, colonização por microrganismos resistentes e a execução de procedimentos invasivos contribuem para um risco elevado de infecções nesse contexto (MENDES *et al.*, 2023). Essas infecções decorrem do desequilíbrio entre a microbiota natural do corpo humano e os mecanismos de defesa do organismo, configurando-se como uma das principais causas de mortalidade em hospitais (MENDES *et al.*, 2023). Procedimentos invasivos como o cateterismo vesical de demora, apesar de seus benefícios para o paciente, podem acarretar complicações significativas quando não são seguidas práticas adequadas durante sua inserção e manutenção. A principal complicação associada a esse procedimento é o desenvolvimento de infecções do trato urinário (ITU) (VIANA *et al.*, 2024).

As infecções relacionadas ao uso de cateteres e sondas são uma preocupação significativa em ambientes de saúde, dados a sua frequência de ocorrência e seu impacto na mortalidade dos pacientes. Estudos recentes destacam a importância de medidas preventivas e do manejo adequado desses dispositivos para reduzir a ocorrência das infecções associadas à sua utilização. Um estudo publicado por Euzébio *et al.* (2021) analisou o perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no período entre 2019 e 2020. Os resultados indicaram que a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) foi a infecção mais frequente, correspondendo a 47,22% dos casos, seguida de infecções do trato urinário associadas ao uso de sonda vesical de demora (30,56%) e infecções da corrente sanguínea associadas a cateter venoso central (13,89%). Outro estudo, realizado por Paiva *et al.* (2021), destacou que as infecções do trato urinário (ITU) associadas ao cateter vesical de demora apresentam uma incidência de aproximadamente 3,87 infecções por 1.000 dias de uso. *Pseudomonas aeruginosa* foi identificada como o organismo mais comum nessas infecções. Em relação às infecções associadas a cateteres venosos centrais de longa permanência, o tratamento pode envolver o uso de "locks" (técnica de selagem com antimicrobianos), antibioticoterapia sistêmica e, em alguns casos, a retirada do cateter,

dependendo do tipo de infecção, do microrganismo envolvido e da gravidade do quadro clínico (NEVES JUNIOR *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de métodos de controle microbiano em dispositivos médicos, como cateteres e sondas, é essencial para reduzir infecções associadas, que representam elevada frequência e mortalidade, além de custos hospitalares significativos. Estudos recentes apontam que a colonização por patógenos resistentes, como *P. aeruginosa*, e a formação de biofilmes são os principais desafios, sendo agravados pela limitação de tratamentos convencionais e pelo aumento da incidência de resistência microbiana a antibióticos (PERIN *et al.*, 2024). Estratégias inovadoras, como revestimentos antimicrobianos, técnicas de selagem e aplicação de tecnologias avançadas, como nanopartículas e biossurfactantes, mostram-se promissoras para prevenir infecções e melhorar a segurança do paciente, destacando-se como uma prioridade no manejo clínico desses dispositivos (CHEN *et al.*, 2015).

1.2 Biofilmes

O biofilme é uma estrutura complexa e organizada, formada por uma ou por diversas populações microbianas, principalmente por bactérias. Ao formarem biofilmes, as bactérias estabelecem estruturas coordenadas e funcionais fixadas em superfícies inertes ou vivas, permanecendo imersas em matrizes poliméricas adesivas produzidas pelos próprios organismos da comunidade (ALVES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020). A formação de biofilmes pelos microrganismos proporciona proteção contra fatores ambientais adversos e predadores, promovendo ainda o estabelecimento de relações simbióticas e permitindo sua sobrevivência em ambientes pouco favoráveis à sobrevivência de células planctônicas (ALVES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020). O biofilme é responsável por grande parte das infecções hospitalares ocasionadas por dispositivos invasivos como cateteres e sondas, uma vez que sua estrutura protege as bactérias da comunidade contra agentes antimicrobianos, defesas do hospedeiro enfermo e facilita a transferência horizontal de genes, incluindo aqueles envolvidos na resistência a antibióticos (MOTA *et al.*, 2017).

1.3 Resistência bacteriana, um desafio emergente

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um desafio complexo, resultante da rápida evolução das bactérias frente aos medicamentos (COOK e WRIGHT, 2022). O processo de desenvolvimento de novos fármacos é lento, enquanto a resistência bacteriana se multiplica de

forma veloz (COOK e WRIGHT, 2022). Diversos mecanismos, como inativação enzimática, alteração do alvo do antimicrobiano e bombas de efluxo contribuem para a resistência bacteriana, dificultando o tratamento de doenças infecciosas (VARELA *et al.*, 2021). Assim, a crescente ameaça da resistência bacteriana aos antimicrobianos representa um desafio significativo para a saúde pública e a produção animal, exigindo a busca por alternativas eficazes para se combaterem microrganismos patogênicos.

Em 2017, o British Medical Journal (BMJ) publicou um caso relevante no qual uma mulher nos Estados Unidos morreu de choque séptico após ser infectada por uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a todos os 26 antibióticos testados, incluindo aminoglicosídeos, polimixinas e apresentando resistência intermediária à tigeciclina. A cepa isolada carregava o gene NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), que confere resistência a antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. Embora o MIC para colistina fosse elevado, o gene *mcr-1* (associado à resistência plasmidial à colistina) não foi detectado. Trata-se de um caso raro: segundo o CDC, a maioria dos CRE (enterobactérias resistentes a carbapenêmicos) ainda apresenta sensibilidade a pelo menos um antimicrobiano. Este episódio extremo evidencia as consequências da disseminação global de bactérias multirresistentes e ressalta a urgência na implementação de estratégias eficazes para o controle de infecções.

A resistência bacteriana a antimicrobianos é categorizada quando uma linhagem bacteriana desenvolve mecanismos que anulam ou atenuam a ação desses compostos, os quais, por sua vez, são utilizados como o principal método de tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias. Entretanto, o processo de desenvolvimento e aprovação de novas drogas é consideravelmente mais lento se comparado com a aquisição de resistência dos microrganismos (PULINGAM *et al.*, 2022). De modo geral, as diferentes classes de antibióticos atuam na inibição da síntese proteica, da síntese da parede celular e da síntese de ácidos nucleicos, além de desorganizar a membrana citoplasmática e interferir diretamente no metabolismo celular (COSTA e JUNIOR, 2017). O fato relevante em relação ao controle de infecções por compostos antimicrobianos é o desenvolvimento de mecanismos fisiológicos e genéticos de resistência bacteriana, que driblam a ação desses medicamentos e dificultam o tratamento de doenças infecciosas.

As bactérias podem desenvolver diversos mecanismos de resistência contra agentes antimicrobianos, destacando-se entre eles o sistema de inativação por enzimas, a alteração ou

proteção do alvo, as bombas de efluxo e a redução da permeabilidade ao composto (VARELA *et al.*, 2021). O fenótipo de resistência, uma vez adquirido por uma população, pode ser propagado, já que os genes ligados a esses mecanismos de resistência podem ser transferidos entre bactérias competentes de uma mesma comunidade. O sistema de inativação enzimático age através da hidrólise, da transferência de grupos funcionais e de processos de oxirredução, alterando a estrutura química do agente antimicrobiano (VARELA *et al.*, 2021). Já a alteração do alvo acontece por meio de uma alteração em um sítio específico no qual a droga se ligaria, impedindo assim sua atividade (VARELA *et al.*, 2021). Além disso, a célula pode proteger o alvo dos antimicrobianos através de proteínas de proteção do alvo, as TPP's (*Target Protection Proteins*). As TPP's podem atuar ligando-se ao sítio de ligação do antimicrobiano, impedindo a atuação do mesmo; podem também se ligar de forma alostérica no alvo, alterando sua conformação ou, ainda, induzir uma mudança conformacional global, formando um complexo com a droga e prejudicando assim sua efetividade (VARELA *et al.*, 2021). Outra estratégia utilizada por bactérias contra compostos tóxicos, incluindo antibióticos, é a presença de bombas de efluxo, que nada mais são que proteínas integrais de membrana responsáveis por transportar ativamente substâncias tóxicas, incluindo agentes antimicrobianos, para fora da célula. As bombas de efluxo são frequentemente encontradas em bactérias multirresistentes como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa* (VARELA *et al.*, 2021).

O uso indiscriminado de antibióticos gera uma pressão seletiva por meio da qual organismos resistentes são selecionados. Na pecuária, os antimicrobianos são utilizados de forma profilática, na prevenção de doenças em animais de produção, e na forma metafilática, quando há casos de doenças na população. Nesses casos, porém, todos os animais do rebanho são tratados, incluindo aqueles que não apresentam sintomas da doença (MARQUES *et al.*, 2023). Por muitos anos, esses medicamentos foram utilizados na promoção de crescimento animal, até a proibição para este fim pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2020 (MARQUES *et al.*, 2023). Como resultado dessa administração indiscriminada de antibióticos na promoção de crescimento e de outros fatores, a resistência microbiana se tornou um grande desafio global (MARQUES *et al.*, 2023).

1.4 Nanobiotecnologia como alternativa no controle microbiano

1.4.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são metabólitos secundários produzidos por diversos microrganismos, caracterizados por suas propriedades tensoativas resultantes da estrutura anfipática das moléculas. Essa característica os torna úteis em um amplo espectro de aplicações, destacando-se a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados, bem como nas indústrias farmacêutica, biomédica, alimentícia, dentre outras (ERAS-MUÑOZ *et al.*, 2022; FREITAS, 2018). Os biossurfactantes de baixo peso molecular podem ser classificados em duas grandes categorias: glicolipídeos e lipopeptídeos (ERAS-MUÑOZ *et al.*, 2022). Os glicolipídeos incluem compostos como o rhamnolipídeo, comumente produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Já os lipopeptídeos são representados por moléculas como surfactinas, iturinas e fengicinas, amplamente sintetizadas por espécies do gênero *Bacillus* (ERAS-MUÑOZ *et al.*, 2022; MARKANDE *et al.*, 2021).

1.4.1.1 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são estruturalmente diversos. Sua composição básica consiste de uma cadeia de ácido graxo ligada a uma porção peptídica cíclica. As diferentes espécies e linhagens de bactérias capazes de produzir essa classe de biossurfactantes podem produzir moléculas que divergem quanto ao tamanho da cadeia de ácido graxo, insaturação na cadeia, composição química do peptídeo e da ligação entre as duas porções, o que agrega propriedades e aplicações diferentes a esses compostos (MNIF *et al.*, 2015). O uso desses metabólitos como agentes antimicrobianos é amplamente reportado em literatura, sendo a base de alguns produtos já comercializados no mercado, como o Serenade® (BETTIOL *et al.*, 2012). Dentre as classes de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus spp.*, destacam-se as surfactinas, iturinas e fengicinas.

As surfactinas são um grupo diverso de moléculas, e as diferentes isoformas desse metabólito podem coexistir na célula com variações tanto na porção peptídica quanto no tamanho da cadeia de ácido graxo (SEYDLOVÁ *et al.*, 2008). A cadeia de ácido graxo β -hidroxilado contém entre 12 e 16 átomos de carbono e está associada a um anel de sete resíduos peptídicos organizados ciclicamente, seguindo a sequência quiral LLDLLDL (SEYDLOVÁ *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2022). Os aminoácidos hidrofóbicos estão posicionados nas posições 2, 3, 4, 6 e 7, enquanto os resíduos hidrofílicos (glutamato e aspartato) ocupam as posições 1 e 5, respectivamente (SEYDLOVÁ *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2022). Esses dois últimos conferem duas cargas negativas à molécula (SEYDLOVÁ *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2022). No que diz

respeito à atividade antimicrobiana, as surfactinas possuem um amplo espectro de ação contra diversos grupos bacterianos, causando a desestabilização das membranas celulares ao integrar sua cauda hidrofóbica na bicamada lipídica, resultando em permeabilização da membrana e morte celular (SAIYAM et al., 2024).

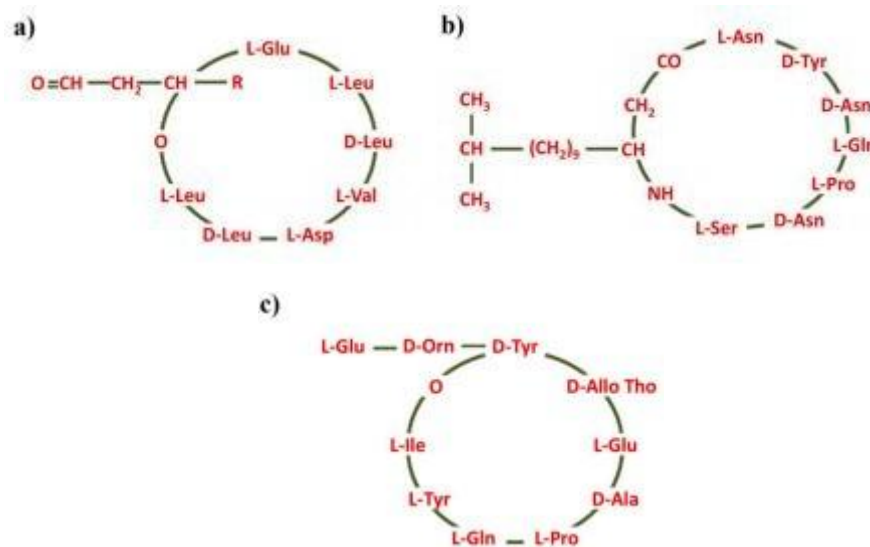
As iturinas são lipopeptídeos compostos por um ácido graxo com uma cadeia de 14 a 17 átomos de carbono, ligado por um grupo amida a um resíduo de aminoácido que integra a porção peptídica da molécula (MNIF et al., 2015). Sua estrutura segue a sequência quiral LDDLLDL (L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser) (SAIYAM et al., 2024), e a variação nos aminoácidos contribui para seu alto polimorfismo (SAIYAM et al., 2024). Os principais representantes dessa família incluem iturina A, iturina D, iturina C, iturina E, bacillomicina D, bacillomicina L, bacillomicina F, micossutilina e bacillomicina Lc (SAIYAM et al., 2024). Dentro dessa família cabe destacar a Iturina A, mais eficaz como agente antifúngico (MNIF et al., 2015, WAN et al., 2022; ONGENA et al., 2008). Diferentemente das surfactinas, as iturinas possuem ação limitada contra bactérias, possuindo por outro lado ampla atividade antifúngica. O principal mecanismo de ação antifúngica dessa família é a formação de poros condutores de íons, o que ocasiona um desequilíbrio na pressão osmótica da célula (ONGENA et al., 2008).

As fengicinas possuem, de forma geral, dez aminoácidos acilados ligados a uma cadeia de ácido graxo cujo tamanho pode variar entre 14 a 19 átomos de carbono. A porção peptídica da fengicina segue a sequência LLDLLDL, sendo composta por sete aminoácidos, incluindo resíduos de glutamina e prolina, que conferem estabilidade estrutural à molécula (SAIYAM et al., 2024). Os membros da família das fengicinas diferem dos demais grupos já citados pela presença de aminoácidos atípicos na sua porção peptídica, tais como a ornitina e a alo-treonina (MNIF et al., 2015). Esse metabólito se destaca por sua ação antifúngica contra fungos miceliais, sendo grande parte destes patógenos de plantas (MNIF et al., 2015).

A interação entre esses peptídeos e as membranas está diretamente relacionada à estrutura dos compostos e à composição fosfolipídica da membrana-alvo (CHEN et al., 2022). Peptídeos antimicrobianos catiônicos, como a surfactina, apresentam alta afinidade por membranas com fosfolipídios de carga negativa, característica comum das membranas bacterianas devido à presença de pelo menos 15% de fosfolipídios aniônicos (CHEN et al., 2022). Essa afinidade resulta de interações eletrostáticas, favorecendo a seletividade bacteriana

e minimizando a citotoxicidade sobre células de mamíferos, cujas membranas possuem menor proporção de fosfolípidos aniônicos (CHEN et al., 2022).

Figura 1 - Estrutura química das principais famílias de biossurfactantes lipopeptídicos



Estrutura química das principais famílias de biossurfactantes lipopeptídicos a) Surfactina b) Iturina c) Fengycin. Representação dos aminoácidos por suas abreviaturas padrão: asparagina (Asn), leucina (Leu), ácido glutâmico (Glu), valina (Val), Serina (Ser), Glutamina (Gln), Prolina (Pro), Glutamato (Glx), Treonina (Thr), Glicina (Gly), Alanina (Ala), Histidina (His). Fonte: Kumar et al. (2021).

1.4.1.2 Glicolipídeos

Glicolipídeos são biossurfactantes formados por um ou mais carboidratos ligados a uma cadeia lipídica por meio de uma ligação glicosídica (VOET *et al.*, 2016). Esses compostos são produzidos por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras, com destaque para espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Pertencem a essa classe de biossurfactantes os ramnolipídeos, lipídios de mannosileritritol, trehalolipídeos, celobioselipídeos, soforolipídeos e seus derivados (YAN *et al.*, 2023). Os ramnolipídeos são produzidos majoritariamente por linhagens de *P. aeruginosa*. Essas moléculas podem desempenhar funções fisiológicas associadas à absorção e biodegradação de compostos de baixa solubilidade, motilidade bacteriana e ao desenvolvimento de biofilme (ALMEIDA,

2024). Além disso, podem se categorizar como um fator de virulência, uma vez que protegem a célula contra o sistema de defesa do hospedeiro e podem atuar como hemolisinas (WITTGENS *et al.*, 2017). A aplicação dos ramnolipídeos é ampla, destacando-se sua ação antimicrobiana em diversos setores, incluindo o uso estético. Conforme reportado por Carra e colaboradores (2024), ramnolipídeos incorporados a filmes bioadesivos foram eficazes no tratamento da acne, demonstrando atividade antimicrobiana contra *Cutibacterium acnes*, uma das principais bactérias associadas a essa condição.

Outro grupo de glicolipídeos de grande importância biotecnológica são os sofrorolipídeos, produzidos principalmente por espécies de leveduras não patogênicas. Os sofrorolipídeos são biossurfactantes glicolipídicos que contêm sofrorose como carboidrato compondo a parte hidrofílica da molécula e uma longa cadeia de ácido graxo compondo a parte hidrofóbica (VAN BOGAERT *et al.*, 2007). A produção desses compostos normalmente envolve o uso de espécies de leveduras osmofílicas e não patogênicas, como *Candida bogoriensis*, *C. apicola*, *C. bombicola*, *Starmerella bombicola* e *Wickerhamiella domericqiae* (PAL *et al.*, 2023). São amplamente aplicados em diferentes setores, onde desempenham papel importante no tratamento de emulsões industriais, no gerenciamento de vazamentos de óleo, na purificação e degradação de efluentes industriais, bem como na recuperação de solos degradados (SÁENZ-MARTA *et al.*, 2015; PAL *et al.*, 2023).

1.4.1.3 Ação antimicrobiana dos biossurfactantes

A resistência bacteriana aos antibióticos representa um obstáculo complexo para a saúde humana e animal, decorrente da rápida adaptação das bactérias aos medicamentos convencionais (COOK e WRIGHT, 2022). Esse cenário impulsiona a busca por terapias alternativas. Os lipopeptídeos se destacam como uma promissora classe de compostos antimicrobianos, especialmente as surfactinas, iturinas e fengicinas (MNIF *et al.*, 2015). Segundo Bafghi *et al.* (2024), lipopeptídeos produzidos por *Bacillus licheniformis* inibiram o crescimento de *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDR) em concentrações menores que as dos antibióticos convencionais. Na mesma linha, lipopeptídeos extraídos de uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* demonstraram potencial no setor alimentício, por sua baixa toxicidade para a maioria dos probióticos e elevada atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares multirresistentes (LIN *et al.*, 2020).

Os lipopeptídeos e outras classes de biossurfactantes se destacam também por sua ação antibiofilme, especialmente contra biofilmes formados por bactérias patogênicas de interesse clínico. Malakar et al. (2024) reportaram que ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* mostraram 90% de inibição na formação de biofilme e 90% de ruptura de biofilmes já formados por *Staphylococcus aureus*, quando utilizados na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Já Patel e colaboradores (2021) utilizaram um biossurfactante produzido por *Lactobacillus rhamnosus*, isolado do leite materno, para avaliar sua ação antibiofilme e antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O biossurfactante apresentou efeito antibacteriano significativo, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) variando de 12,5 a 50 mg/mL e concentração bactericida mínima (MBC) aproximadamente duas vezes maior. Além disso, foi capaz de inibir a adesão bacteriana e desestruturar biofilmes preexistentes, reduzindo a viabilidade celular dentro dessas estruturas.

Freitas e colaboradores (2020) investigaram os efeitos antimicrobianos e antibiofilme dos lipopeptídeos biossurfactantes sintetizados por *Bacillus velezensis* TR47II contra patógenos Gram-negativos associados a infecções nosocomiais. O extrato bruto exibiu forte atividade antibacteriana contra *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Pseudomonas putida*. O extrato obtido F4 foi o mais bioativo, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) entre 300 e 600 µg/mL. Além disso, essa fração desestruturou biofilmes de *A. faecalis*, *A. xylosoxidans* e *P. alcaligenes* em aproximadamente 100%, 85% e 80%, respectivamente. Esses achados sugerem que a aplicação combinada desses biossurfactantes pode ser uma estratégia eficaz no controle de patógenos oportunistas associados a infecções hospitalares.

Sabino et al. (2024) investigaram a capacidade dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus velezensis* em inibir a atividade hemolítica de *Staphylococcus aureus*, um patógeno associado à mastite bovina. Foram analisadas diferentes cepas de *Bacillus* para produção de compostos com atividade anti-hemolítica. Os lipopeptídeos isolados incluíram iturinas, fengicinas e surfactinas, sendo as iturinas as mais eficazes, reduzindo a hemólise em até 76%. A análise por *docking* molecular indicou que esses compostos podem interagir com a hemolisina, possivelmente interferindo na sua ação. Além disso, experimentos de dinâmica molecular sugeriram interações duradouras entre as iturinas e os resíduos críticos da hemolisina.

Esses achados destacam o potencial das iturinas como uma estratégia anti-virulência para controle de *S. aureus* na pecuária leiteira.

Liu et al. (2019) investigaram o mecanismo antifúngico da fengicina A, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus amyloliquefaciens finb60*, contra *Candida albicans*. Os resultados demonstraram que o composto inibe significativamente o crescimento do fungo, com uma MIC de 32 µg/mL, retardando sua fase de crescimento exponencial. A análise estrutural revelou que a fengicina A compromete a integridade da parede celular, tornando-a mais fina e desorganizada, além de aumentar a exposição de glucana e quitina. Esse efeito reduz a hidrofobicidade celular, prejudicando a adesão do fungo ao hospedeiro. Além disso, o composto induziu um acúmulo significativo de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, evidenciada pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial.

1.4.2 Nanomateriais e sua aplicação no controle de infecções bacterianas

Os nanomateriais representam uma classe inovadora de materiais, sendo amplamente pesquisados quanto ao seu potencial para aplicações práticas em diversas áreas. Definidos por terem dimensões entre 1 e 100 nm, esses materiais possuem propriedades únicas que os diferenciam significativamente de suas formas em escala macroscópica (BAIG *et al.*, 2021). A nanotecnologia moderna teve suas bases lançadas em 1959 com Richard Feynman, que vislumbrou a manipulação de materiais em nível atômico e molecular, enquanto o termo "nanotecnologia" foi formalmente introduzido por Norio Taniguchi em 1974 (BAIG *et al.*, 2021). Avanços tecnológicos, como a invenção da microscopia de tunelamento em 1982 e da microscopia de força atômica em 1986, aceleraram a pesquisa e o desenvolvimento na área (BAIG *et al.*, 2021). Atualmente, nanomateriais são amplamente utilizados em revestimentos, eletrônicos, cosméticos, remediação ambiental, dispositivos de armazenamento de energia e como antimicrobianos, exemplificando o vasto potencial dessa tecnologia emergente (BAIG *et al.*, 2021).

1.4.2.1 Nanopartículas

Nanopartículas metálicas são formadas a partir de metais reduzidos por processos destrutivos ou construtivos (IJAZ *et al.*, 2020; ABDELMONEIM *et al.*, 2022). Diversos metais, como alumínio, cobre, ouro, ferro, prata e zinco, são comumente utilizados em sua síntese (IJAZ *et al.*, 2020; SALEM *et al.*, 2023). Essas partículas possuem propriedades únicas, como tamanhos de 10 a 100 nm, alta relação superfície-volume, estruturas cristalinas e características ópticas e elétricas específicas (SINGH *et al.*, 2020; KANKALA *et al.*, 2020). A síntese de nanopartículas geralmente ocorre por meio de dois métodos: os métodos não biológicos, que empregam abordagens físicas e químicas, e os métodos biológicos, que fazem uso de culturas microbianas ou de extratos vegetais (PATEL *et al.*, 2023). Por fim, o controle preciso do tamanho e da forma das nanopartículas é fundamental para o desenvolvimento de materiais avançados (SALEM *et al.*, 2023).

Metais como cobre (Cu) e prata (Ag) possuem alta toxicidade para bactérias, mesmo em pequenas concentrações, o que os torna amplamente utilizados como agentes antimicrobianos em setores da indústria, saúde e agricultura (SALEM *et al.*, 2023). As nanopartículas de óxido de cobre (CuO-NPs), por exemplo, demonstram ação antimicrobiana contra *E. coli* e *B. subtilis* e são usadas em tintas e tecidos (AL-HAKKANI *et al.*, 2020). Óxidos metálicos como CeO₂ têm aplicações específicas, como catalisadores em combustíveis (SALEM *et al.*, 2023). Já as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIO) são promissoras para a medicina, sendo usadas como agentes de contraste em ressonância magnética, transporte de medicamentos e terapia com campos magnéticos (KHALID *et al.*, 2018). Esses materiais, ao serem estabilizados por polímeros biocompatíveis, possuem maior eficiência e segurança, ampliando sua aplicabilidade biomédica e tecnológica (SALEM *et al.*, 2023).

1.4.2.2 Pontos Quânticos de Carbono (CQD's)

Os *Carbon Quantum Dots* (CQD's) são nanomateriais cujo tamanho pode variar entre 1 a 10 nanômetros (MACHADO *et al.*, 2015). Esses nanomateriais possuem diversas propriedades, como estabilidade química e elétrica, baixo impacto sobre o meio ambiente, alta fotoluminescência, alta solubilidade em água e biocompatibilidade (SUN *et al.*, 2022). A síntese de CQD's pode ser realizada através de métodos químicos ou físicos, a partir de compostos de carbono estruturalmente maiores como nanotubos de carbono, grafite e diamante (métodos top-down), ou a partir de moléculas precursoras como açúcares, sais orgânicos e resina (métodos bottom-up) (SUN *et al.*, 2020; MACHADO *et al.*, 2015).

Travlou e colaboradores (2018) reportaram as propriedades antimicrobianas dos CQD's, sendo estas dependentes do tamanho da partícula e de suas propriedades físico-químicas. O que determina a maior eficiência dos CQD's como agentes antimicrobianos é a sua dopagem superficial. Empiricamente, Travlou e colaboradores (2018) reportaram que os grupos amino e amida, resultantes da dopagem com nitrogênio, têm maior ação antimicrobiana. Mais especificamente, a forma protonada desses grupos tem efeito eletrostático na membrana bacteriana. Além disso, os CQD's induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, o que também contribui para a morte da célula.

1.4.2.3 Nanoclusters

Os nanoclusters de metais representam uma nova classe de agregados moleculares que consistem em algumas dezenas a centenas de átomos metálicos, com tamanhos comparáveis ao comprimento de onda de Fermi dos elétrons (ZHANG et al., 2014). Como resultado, os nanoclusters metálicos apresentam propriedades físico-químicas distintas, forte fotoluminescência, excelente biocompatibilidade e transições HOMO-LUMO (ZHENG *et al.*, 2022). Servindo como um elo intermediário entre átomos metálicos isolados e nanopartículas metálicas, os nanoclusters metálicos têm despertado crescente interesse em diversas áreas, incluindo a terapia antibacteriana (ZHENG *et al.*, 2022).

O tamanho e a química de superfície diversificada dos nanoclusters metálicos (NCs) conferem vantagens no combate a bactérias patogênicas (ZHENG *et al.*, 2018). Os NCs metálicos apresentam múltiplos mecanismos antibacterianos, incluindo danos à estrutura celular (parede celular e membrana), liberação de íons metálicos, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), destruição de componentes intracelulares, entrega de agentes antimicrobianos e mecanismos fotoativados (ZHENG *et al.*, 2022). Esses mecanismos derivam principalmente das propriedades físico-químicas únicas dos NCs, especialmente as interações multivalentes entre os NCs e as bactérias, que ocorrem por meio de atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e interações receptor-ligante (MAKABENTA et al., 2021).

Zheng e colaboradores (2017) demonstraram que é possível conferir atividade antimicrobiana a nanopartículas de ouro por meio do controle preciso de seu tamanho para dimensões de NCs (menores que 2 nm). Os nanoclusters de ouro mostraram eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em decorrência de sua capacidade de interagir de maneira eficiente com as células bacterianas, desestabilizando a membrana celular e lizando o

organismo. Já Yuan et al. (2014) revelaram que nanoclusters ultrapequenos, ricos em íons Ag^+ e protegidos por glutathione (GSH), apresentam maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em comparação a nanoclusters similares contendo prata metálica (Ag^0). A alta atividade é atribuída à abundância de íons Ag^+ na superfície dos nanoclusters, que não é observada em partículas maiores, destacando o papel do estado de oxidação da prata no combate a infecções bacterianas.

1.4.3 Efeito sinérgico no controle microbiano

A crescente incidência de resistência bacteriana aos antimicrobianos tem impulsionado a busca por novas estratégias para o controle de patógenos, especialmente em contextos médicos e industriais. Tecnologias baseadas em nanomateriais, como pontos quânticos, nanopartículas e nanoclusters metálicos e compósitos poliméricos, têm mostrado grande potencial nesse cenário. Esses materiais oferecem propriedades antimicrobianas avançadas e reduzem a probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana. Diversos estudos recentes exploram aplicações inovadoras de nanomateriais no combate a bactérias multirresistentes e na preservação de alimentos, evidenciando sua relevância em desafios atuais de saúde pública e segurança alimentar.

Chen et al. (2015) desenvolveram nanodots de ouro fotoluminescentes (Au-NDs) funcionalizados com surfactina (SFT) e 1-dodecanotiol (DT), que demonstraram alta eficácia antimicrobiana, especialmente contra bactérias multirresistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). A elevada atividade antimicrobiana desses nanodots ($\approx 2,5$ nm) foi atribuída ao efeito sinérgico entre a SFT e DT-Au-NDs, promovendo a ruptura da membrana citoplasmática das células bacterianas. Em testes *in vivo*, o uso de SFT/DT-Au-NDs em feridas infectadas acelerou a cicatrização, melhorou a epitelização e aumentou a produção de fibras de colágeno, destacando seu potencial como material antimicrobiano para aplicações pré-clínicas.

No campo das embalagens alimentícias, Jayakumar et al. (2021) reportaram a eficácia de filmes de álcool polivinílico (PVOH) incorporados com nanopartículas de argila e lipopeptídeos no controle de patógenos e de microrganismos deterioradores de alimentos. Estes filmes apresentaram propriedades mecânicas e de barreira aprimoradas, inibindo o crescimento de *Salmonella typhimurium* e *Pythium myriotylum*. Os resultados destacam o potencial desses materiais como embalagens ativas para proteção e preservação de alimentos.

Além disso, Li et al. (2016) desenvolveram pontos quânticos de carbono funcionalizados com espermidina (Spd-CQDs), de aproximadamente 4,6 nm, como agentes antimicrobianos. Esses nanomateriais demonstraram eficácia contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e MRSA, com ação baseada na ruptura das membranas bacterianas. Estudos *in vivo* evidenciaram cicatrização acelerada e melhor formação de tecido em feridas infectadas por MRSA, reforçando seu potencial em curativos antimicrobianos. Outra abordagem promissora foi a síntese de CQDs via reação de polimerização de Aldol, utilizando acetona como fonte de carbono. GAO et al. (2021) desenvolveram um nanocompósito CQDs/Ag₂S/CS ao carregar CQDs e nanopartículas de Ag₂S em um substrato de quitosana (CS). O material demonstrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *Escherichia coli* (Gram-negativo) e MRSA, destacando-se como alternativa aos antibióticos tradicionais.

No contexto de membranas antimicrobianas, compósitos de álcool polivinílico (PVA) incorporados com lipopeptídeos e nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) apresentaram atividade significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Esses materiais, além de exibirem aprimoramento nas propriedades ópticas, térmicas e mecânicas, demonstraram compatibilidade sanguínea e potencial para revestimentos antimicrobianos (JAYAKUMAR et al., 2021).

Por fim, Khalid et al. (2019) sintetizaram nanopartículas de prata (Ag) e óxido de ferro (Fe₃O₄) revestidas com ramnolipídeos (RL), que mostraram forte atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. As NPs revestidas com RL inibiram tanto a formação quanto o crescimento de biofilmes pré-formados, modificando a hidrofobicidade da superfície e gerando espécies reativas de oxigênio, o que as torna promissoras para utilização em revestimentos antimicrobianos e curativos para feridas.

1.5 Considerações finais

As infecções relacionadas ao uso de dispositivos médicos, como cateteres e sondas, representam um desafio significativo nos ambientes de saúde, em decorrência de sua alta incidência, altas taxas de mortalidade associada e dos custos hospitalares elevados. O desenvolvimento de biofilmes e a crescente resistência bacteriana a antimicrobianos de uso tradicional agravam esse cenário, dificultando os tratamentos convencionais. Assim, é de

grande relevância o desenvolvimento de estratégias inovadoras e eficazes no combate aos microrganismos patogênicos, como o uso de revestimentos antimicrobianos, biossurfactantes e tecnologias baseadas em nanomateriais, que possuam eficácia na redução da colonização microbiana e na inibição de biofilmes. Essas abordagens não apenas aprimoram a segurança dos pacientes, mas também se destacam como alternativas promissoras no manejo clínico, contribuindo para a prevenção de infecções e para a mitigação do impacto da resistência bacteriana a antimicrobianos.

1.6 Referências bibliográficas

ABDELMONEIM, Hossam EM et al. Multiple applications of CdS/TiO₂ nanocomposites synthesized via microwave-assisted sol-gel. **Journal of Cluster Science**, p. 1-10, 2022.

AL-HAKKANI, Mostafa F. Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p. 505, 2020.

ALMEIDA, Michelle Fernandes. **Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada Bacillus subtilis LBBMA RI4914 Isrfa utilizando glicerol como fonte de carbono**. 2022. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022.

ALVES, Maria José et al. Biofilme bacteriano e infecção hospitalar. **Saúde: Conexões e sustentabilidade para o entendimento global**, p. 110-122, 2016.

ALMEIDA, Mayara de Alencar. Produção de ramnolipídeos por biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. 2024.

BAFGHI, Mahdi Hosseini et al. Enhancing the Antibacterial Impact of Lipopeptide Extracted from *Bacillus licheniformis* as a Probiotic against MDR *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 29, n. 5, p. 171, 2024.

BAIG, Nadeem; KAMMAKAKAM, Irshad; FALATH, Wail. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. **Materials advances**, v. 2, n. 6, p. 1821-1871, 2021.

CARRA, Jéssica B. et al. Bioadhesive Polymeric Films Containing Rhamnolipids, An Innovative Antimicrobial Topical Formulation. **Aaps Pharmscitech**, v. 25, n. 6, p. 177, 2024.

CHEN, Haiyan et al. Preparation and characterisation of bifunctional surface-modified silicone catheter in lumen. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 46-54, 2020.

CHEN, Meichun et al. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-12, 2020.

CHEN, Wei-Yu et al. Self-assembly of antimicrobial peptides on gold nanodots: against multidrug-resistant bacteria and wound-healing application. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 46, p. 7189-7199, 2015.

CHEN, Xiaoyu et al. A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 143, 2022.

COOK, Michael A.; WRIGHT, Gerard D. The past, present, and future of antibiotics. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 657, p. eabo7793, 2022.

DA COSTA, Anderson Luiz Pena; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DE ARAÚJO GALLUCCI, Bruna Cordeiro; DOS SANTOS FIGUEIRA, Letícia; DO AMARAL, Maria Thereza Mendes. Infecções relacionadas ao cateterismo vesical de demora realizado pelo enfermeiro na Unidade de Terapia Intensiva: Revisão Integrativa. **Revista Saber Digital**, v. 16, n. 3, p. e20231606-e20231606, 2023.

DE SOUZA FREITAS, Fernanda et al. *Bacillus subtilis* TR47II as a source of bioactive lipopeptides against Gram-negative pathogens causing nosocomial infections. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-10, 2020.

ERAS-MUÑOZ, Estefanía et al. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12365-12391, 2022.

EUZÉBIO, Diana Matos et al. Perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidade de Terapia Intensiva no período de 2019 a 2020. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e2101724926-e2101724926, 2021.

FREITAS, Fernanda de Souza. **Identificação e caracterização de lipopeptídeos e bacteriocinas da ilha de trindade por meio de estratégias in sílico e in vitro**. 2018.

GAO, Xiang et al. Carbon quantum dots modified Ag₂S/CS nanocomposite as effective antibacterial agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 220, p. 111456, 2021.

IJAZ, Irfan et al. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. **Green chemistry letters and reviews**, v. 13, n. 3, p. 223-245, 2020.

JAYAKUMAR, Aswathy et al. Lipopeptide and zinc oxide nanoparticles blended polyvinyl alcohol-based nanocomposite films as antimicrobial coating for biomedical applications. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 220-228, 2021.

JAYAKUMAR, Aswathy et al. Polyvinyl alcohol-nanocomposite films incorporated with clay nanoparticles and lipopeptides as active food wraps against food spoilage microbes. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 30, p. 100727, 2021.

KHALID, Hafiza Faiza et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. **Journal of hazardous materials**, v. 364, p. 441-448, 2019.

KHALID, Hafiza Faiza et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. **Journal of hazardous materials**, v. 364, p. 441-448, 2019.

KHALID, Muhammad Kamran *et al.* Evaluation of Toxicity and Neural Uptake In Vitro and In Vivo of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 2613, 3 set. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092613>.

LAI, Xuefei et al. Hydrothermal synthesis and characterization of nitrogen-doped fluorescent carbon quantum dots from citric acid and urea. **Ferroelectrics**, v. 566, n. 1, p. 116-123, 2020.

LIN, Long-Zhen et al. Isolation and characterization of fengycins produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and its broad-spectrum antimicrobial potential against multidrug-resistant foodborne pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 579621, 2020.

LI, Yu-Jia et al. Synthesis of self-assembled spermidine-carbon quantum dots effective against multidrug-resistant bacteria. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 19, p. 2545-2554, 2016.

MACHADO, Claudia Emanuele et al. Pontos quânticos de carbono: Síntese química, propriedades e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306-1346, 2015.

MAKABENTA, Jessa Marie V. et al. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 23-36, 2021.

MARKANDE, Anoop R.; PATEL, Divya; VARJANI, Sunita. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124963, 2021.

MALAKAR, Chandana et al. Antibiofilm and wound healing efficacy of rhamnolipid biosurfactant against pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 195, p. 106855, 2024.

MARQUES, Gabriela Ramos; CAMPLESI, Annelise Carla; COSTA, Mirela Tinucci. Resistência bacteriana na medicina veterinária e sua relação com a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 30, p. 1-12, 2023.

MCCARTHY, Michael. Woman dies after infection with bacteria resistant to all antibiotics available in US. 2017.

MENDES, Vicência Torres et al. A infecção do trato urinário relacionada ao uso de sonda vesical de demora em pacientes críticos: o impacto da assistência de enfermagem. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 2633-2647, 2023.

MNIF, Inès; GHRIBI, Dhouha. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Peptide Science**, v. 104, n. 3, p. 129-147, 2015.

MOTA, Écila Campos; OLIVEIRA, Adriana Cristina. Biofilme em cateter vesical de demora e a segurança do paciente: uma revisão da literatura. **Vigilância Sanitária em Debate**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 116, 31 ago. 2017. *Vigilancia Sanitaria em Debate: Sociedade, Ciencia y Tecnologia*. <http://dx.doi.org/10.22239/2317-269x.00955>.

NEVES JUNIOR, Milton Alves das; MELO, Rafael Couto; GOES JUNIOR, Adenauer Marinho de Oliveira; PROTTA, Tatiana Rocha; ALMEIDA, Catarina Coelho de; FERNANDES, Allison Roxo; PETNYS, Alexandre; RABONI, Edgar. Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 46-50, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-54492010000100008>.

NG, Yan Jer et al. Recent advances and discoveries of microbial-based glycolipids: Prospective alternative for remediation activities. **Biotechnology Advances**, v. 68, p. 108198, 2023.

LIU, Yanan et al. C16-Fengycin A affect the growth of *Candida albicans* by destroying its cell wall and accumulating reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8963-8975, 2019.

ONGENA, Marc; JACQUES, Philippe. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PAIVA, Renilly de Melo et al. Fatores de infecções relacionados aos procedimentos de enfermagem na Unidade de Terapia Intensiva: scoping review. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 74, p. e20200731, 2021.

PAL, Srija et al. Sophorolipids: A comprehensive review on properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 102856, 2023.

PATEL, A. Nanopartículas metálicas produzidas por plantas com propriedades antibacterianas contra *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e268052, 2023.

PATEL, Mitesh et al. Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1546, 2021.

PERIN, Andressa et al. O impacto dos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* na resistência antimicrobiana e nas estratégias terapêuticas emergentes. **Revista Científica Saúde Global**, v. 2, n. 2, 2024.

PULINGAM, Thiruchelvi et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, p. 106103, 2022.

SABINO, Yasmin Neves Vieira et al. *Bacillus velezensis* iturins inhibit the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9469, 2024.

SÁENZ-MARTA, Claudia Isabel et al. Biosurfactants as useful tools in bioremediation. **Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil**, v. 5, p. 94-109, 2015.

SANI, Asma et al. Structural diversity and applications of lipopeptide biosurfactants as biocontrol agents against phytopathogens: A review. **Microbiological Research**, v. 278, p. 127518, 2024.

SANTANA, Jordana Almeida et al. Bactérias resistentes a antimicrobianos em hospitais veterinários: um desafio crescente. **Cad. téc. vet. zootec**, p. 55-85, 2022.

SALEM, Salem S. et al. A comprehensive review of nanomaterials: Types, synthesis, characterization, and applications. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 13, n. 1, p. 41, 2022.

SAIYAM, Diksha et al. Lipopeptides from *Bacillus*: Unveiling biotechnological prospects—Sources, properties, and diverse applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 281-295, 2024.

SERENADE. In: BETTIO, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; PINTO, Zayame Vegette; PAULA JÚNIOR, Trazilbo José de; CORRÊA, Élide Barbosa; MOURA, Andréa Bittencourt; LUCON, Cleusa Maria Mantovanello; COSTA, João de Cássia do Bomfim;

BEZERRA, José Luiz. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. p. 1-155.

SEYDLOVÁ, Gabriela; SVOBODOVÁ, Jaroslava. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, p. 123-133, 2008.

SHALIGRAM, Nikhil S.; SINGHAL, Rekha S. Surfactin—a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food technology and biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010.

SINGH, Veer; YADAV, Priyanka; MISHRA, Vishal. Recent advances on classification, properties, synthesis, and characterization of nanomaterials. **Green synthesis of nanomaterials for bioenergy applications**, p. 83-97, 2020.

SILVA, Amanda Sales da; SILVA, Ana Luíza; RIBEIRO, Andressa Collantoni; ROCHA, Cynthia Marques de Souza; SILVA, Nagela Bernadelli Sousa; SILVA, Gabriel Lopes Vieira da; MARQUES, Lara de Andrade; RÖDER, Denise von Dolinger de Brito. QUÓRUM SENSING E SUAS IMPLICAÇÕES NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO EM HOSPITAIS. **Saúde em Foco: Doenças Emergentes e Reemergentes - Volume 1**, [S.L.], p. 473-484, 2020. Editora Científica Digital. <http://dx.doi.org/10.37885/200901375>.

SUN, Yanan et al. Recent development of carbon quantum dots: biological toxicity, antibacterial properties and application in foods. **Food Reviews International**, v. 38, n. 7, p. 1513-1532, 2022.

TRAVLOU, Nikolina A. et al. S-and N-doped carbon quantum dots: Surface chemistry dependent antibacterial activity. **Carbon**, v. 135, p. 104-111, 2018.

VAN BOGAERT, Inge NA et al. Microbial production and application of sophorolipids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, p. 23-34, 2007.

VARELA, Manuel F. et al. Bacterial resistance to antimicrobial agents. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 593, 2021.

VIANA, Alessandra Oliveira; DE ANDRADE, Robson Vidal. A FUNÇÃO DO ENFERMEIRO NA PASSAGEM DA SONDA VESICAL DE DEMORA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 12, p. 1992-2008, 2024.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level**. Hoboken, NJ: Wiley, 2013.

WAN, Chunpeng et al. Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 29, p. 7976-7988, 2022.

WIEDEMANN, Agnès et al. Interactions of Salmonella with animals and plants. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 93183, 2015.

WITTEGENS, Andreas et al. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 2865-2878, 2017.

WU, Guojun et al. Construction of lipopeptide mono-producing Bacillus strains and comparison of their antimicrobial activity. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102813, 2023.

YUAN, Xun et al. Ultrasmall Ag⁺-rich nanoclusters as highly efficient nanoreservoirs for bacterial killing. **Nano Research**, v. 7, p. 301-307, 2014.

YU, Fan et al. Efficient preparation of extremely high-purity surfactin from fermentation broth by ethanol extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 304, p. 122278, 2023.

ZHANG, Libing; WANG, Erkang. Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. **Nano Today**, v. 9, n. 1, p. 132-157, 2014.

ZHENG, Kaiyuan et al. Antimicrobial gold nanoclusters. **ACS nano**, v. 11, n. 7, p. 6904-6910, 2017.

ZHENG, Kaiyuan et al. Surface ligand chemistry of gold nanoclusters determines their antimicrobial ability. **Chemistry of Materials**, v. 30, n. 8, p. 2800-2808, 2018.

ZHENG, Youkun et al. Antibacterial metal nanoclusters. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 328, 2022.

CAPÍTULO 2

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanomateriais

Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de nanomateriais

RESUMO

Diante do crescente desafio imposto pela resistência bacteriana a antimicrobianos de uso clínico, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é essencial para o controle de infecções, especialmente aquelas associadas à formação de biofilmes. Neste estudo, avaliou-se a eficácia de lipopeptídeos produzidos por um isolado de *Bacillus velezensis* e nanomateriais (pontos quânticos de carbono e nanopartículas de prata) no combate a patógenos de interesse humano e veterinário, com foco na inibição de biofilmes bacterianos. Os patógenos avaliados foram *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH (isolada de sepse em humano), *Streptococcus agalactiae* e *S. uberis* (isolados de mastite bovina), *Staphylococcus aureus*, *S. warneri* e *Escherichia coli* (isolados de mastite caprina), *E. coli* (isolada de peritonite bovina), *Salmonella sp.* (isolada de linfonodo mesentérico de suíno), *Salmonella sp.* (isolada de colite equina) e *E. coli* (isolada de infecção sistêmica em aves). O trabalho seguiu as seguintes abordagens: (i) caracterização físico-química dos nanomateriais formulados, incluindo análise de potencial zeta e espectroscopia de fluorescência para avaliação da estabilidade coloidal e propriedades ópticas e (ii) determinação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos lipopeptídeos e dos nanomateriais, por meio de ensaios inibitórios em microplaca e em cateteres de silicone. Os resultados obtidos evidenciam o potencial dos compostos testados na inibição do crescimento bacteriano e na prevenção da formação de biofilmes. Os lipopeptídeos purificados de *Bacillus velezensis* TR47II e TR59II demonstraram atividade antimicrobiana expressiva frente aos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (bovina), com inibições superiores a 90% para TR59II em ambas as bactérias. Os pontos quânticos de carbono (CQDs) também apresentaram elevada eficácia, atingindo até 98% de inibição do crescimento nas concentrações mais elevadas testadas. Nos ensaios de inibição da formação de biofilmes em microplaca, as formulações NPAgCV, NPAgCVEB₄₇ e NPAgRLEB₄₇ destacaram-se como mais efetivas frente ao isolado de *Salmonella sp.* (equino). Para o isolado de *Salmonella sp.* proveniente de linfonodo mesentérico suíno, a maior inibição (58,5%) foi obtida com CQDs na concentração máxima, seguida pelos tratamentos TR59/2000 (86,5%), TR59/1000 (86,25%) e CQD1:10 (84,25%). Nos testes com fragmentos de cateter, a formulação NPAgRLEB₄₇ promoveu a maior redução na formação de biofilme por *Salmonella sp.* (suíno), com média de inibição de aproximadamente 60%. Os resultados obtidos permitem concluir que o uso de nanopartículas de prata funcionalizadas, pontos quânticos de carbono e lipopeptídeos

representam uma abordagem promissora para o controle de patógenos multirresistentes, especialmente em aplicações biomédicas e veterinárias. A funcionalização de nanopartículas metálicas demonstrou potencial para o desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos para dispositivos médicos e uma estratégia alternativa ao uso de antibióticos convencionais. Estudos adicionais são necessários para avaliar a biocompatibilidade e a aplicabilidade desses compostos em larga escala, visando à sua implementação na prática clínica e na agroindústria.

2.1 Introdução

As infecções hospitalares no Brasil corresponderam a 14% das internações em 2021 (DE ARAÚJO GALLUCCI *et al.*, 2023). Cerca de 60% dos pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) apresentaram algum tipo de infecção hospitalar, enquanto 70% precisaram de antibioticoterapia em algum momento de sua internação (DE ARAÚJO GALLUCCI *et al.*, 2023). Além disso, a taxa de mortalidade entre pacientes que desenvolvem infecções nas UTIs chegou a 40% (DE ARAÚJO GALLUCCI *et al.*, 2023). Em se tratando de hospitais veterinários, o controle e a prevenção de infecções ainda enfrentam desafios relacionados a recursos limitados, escassez de pessoal capacitado e a ausência de sistemas de vigilância estruturados, em decorrência principalmente de limitações orçamentárias (SANTANA *et al.*, 2022). Assim como ocorreu inicialmente na medicina humana, as ações nessa área geralmente são reativas, implementadas em resposta a surtos ou crises (SANTANA *et al.*, 2022). Com o avanço da medicina veterinária e o aumento de procedimentos invasivos e terapias imunossupressoras, a vulnerabilidade dos pacientes a infecções hospitalares cresce, destacando a necessidade de estratégias mais proativas e investimentos para melhorar o controle e a prevenção dessas infecções (SANTANA *et al.*, 2022).

A resistência bacteriana a antimicrobianos de uso clínico agrava ainda mais esse cenário em ambas as áreas (medicina humana e veterinária). Na medicina veterinária, o uso inadequado de antimicrobianos para controle de infecções em animais de produção contribuiu para a disseminação de genes de resistência, o que representa um risco não apenas para a saúde animal, mas também para a saúde pública, dado o potencial de transmissão zoonótica (MARQUES *et al.*, 2023).

A nanobiotecnologia tem se destacado como uma abordagem promissora tanto na medicina humana quanto veterinária. *Nanoclusters* de ouro e pontos quânticos de carbono emergem como alternativas eficientes no controle de infecções e redução da resistência antimicrobiana, combinando biocompatibilidade e ação eficaz (Zhang *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2021). Particularmente relevante é a associação de nanopartículas metálicas com biosurfactantes microbianos, como lipopeptídeos e ramnolipídeos. Um exemplo marcante é o trabalho de Chen *et al.* (2015), que desenvolveram nanodots de ouro (Au-NDs, $\approx 2,5$ nm) funcionalizados com surfactina e 1-dodecanotiol, demonstrando: (1) potente atividade contra MRSA e outras bactérias multirresistentes através da ruptura sinérgica da membrana bacteriana; e (2) eficácia *in vivo* ao acelerar a cicatrização de feridas infectadas, com melhora significativa

na epitelização e síntese de colágeno - resultados que reforçam seu potencial translacional para aplicações clínicas.

Portanto, o desenvolvimento de métodos avançados de controle microbiano em dispositivos empregados na medicina humana e veterinária tem o potencial de contribuir não apenas para melhorar a segurança do paciente e do animal, mas também para a sustentabilidade dos sistemas de saúde pública e de produção animal. Este trabalho busca explorar estratégias inovadoras e tecnologias emergentes no controle de infecções relacionadas ao uso de cateteres e sondas, abordando tanto a área médica quanto a veterinária.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Antibiograma

O antibiograma das linhagens bacterianas de referência utilizadas no estudo foi realizado seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023), utilizando-se o método de difusão em disco para avaliar a suscetibilidade aos antibióticos.

Sumariamente, os isolados foram cultivados em ágar sangue ou ágar MacConkey, conforme suas exigências nutricionais, e incubados a 37 °C por 18 a 24 horas. Após o crescimento, colônias isoladas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 8,5 g L⁻¹) e a turbidez foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1,5 × 10⁸ UFC mL⁻¹), comparando-se visualmente com um tubo padrão. Em seguida, a suspensão bacteriana foi inoculada em placas de ágar Mueller-Hinton (MH) para bactérias não fastidiosas e em ágar Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de carneiro para *Streptococcus spp.* A semeadura foi realizada com auxílio de um *swab* estéril, garantindo-se uma distribuição homogênea do inóculo por toda a superfície do meio. As placas foram deixadas em repouso por 3 a 5 minutos para permitir a absorção do inóculo antes da aplicação dos discos de antibióticos.

Os discos impregnados com antibióticos foram distribuídos na superfície das placas de cultura com auxílio de uma pinça estéril, respeitando-se um espaçamento mínimo de 24 mm entre os discos para evitar interferências na leitura dos halos de inibição. Os antibióticos testados foram selecionados de acordo com o perfil de sensibilidade esperado para cada grupo bacteriano. Após a aplicação dos discos, as placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando-se um paquímetro. Os resultados foram interpretados com base nos critérios do CLSI (2023) e classificados como sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R). Os resultados obtidos permitiram avaliar o perfil de resistência dos isolados clínicos de referência utilizados no estudo.

2.2.2 Produção e purificação de lipopeptídeos

2.2.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho foram *Bacillus velezensis* LBBMA TR47II e LBBMA TR59II, pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) da Universidade Federal de Viçosa. As culturas-estoque são mantidas a -80 °C em *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo 25% de glicerol (v/v). Os isolados foram reativados em meio *Tryptic Soy Agar* (TSA) a 30 °C por aproximadamente 24h.

Após reativação, os isolados foram cultivados em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) por 15 h a 30 °C e 200 rpm. Uma alíquota foi transferida para frasco Erlenmyer de 1000 mL contendo 200 mL de Meio Mineral (adaptado de Almeida, 2022), de modo a se obter uma densidade óptica a 600 nm inicial de 0,05. Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm por 72 horas.

O meio mineral utilizado é composto por (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9), KH₂PO₄ (2,7), NaNO₃ (4,24), extrato de levedura (0,05), sacarose (50%) e 50 mL de solução de micronutrientes. A solução de micronutrientes é composta por (g L⁻¹): EDTA (0,5), MgSO₄ .7 H₂O (3,0), MnSO₄ .4H₂O (0,5), NaCl (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,1), ZnSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,01), Na₂MoO₄.2H₂O (0,01), NaSeO₄ (0,01), NiCl₂.6H₂O (0,02).

2.2.2.2 Extração e Purificação dos Lipopeptídeos

A extração e purificação dos lipopeptídeos foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de Yu e colaboradores (2022). Após o cultivo, o caldo de fermentação foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o pH foi ajustado com ácido sulfúrico para a faixa entre 2-3, seguido de centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos. O

precipitado foi ressuspendido com água ultrapura e homogeneizado manualmente por 2 minutos, seguindo-se nova centrifugação por 5 minutos a 10.000 x g. Esse procedimento foi realizado duas vezes. A purificação dos lipopeptídeos contidos no precipitado foi feita adicionando-se etanol 100%, em volume suficiente para a solubilização do precipitado. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e o filtrado foi submetido à evaporação do solvente a 65 °C em um evaporador rotativo MA120 (Marconi). Os frascos utilizados no procedimento foram previamente pesados vazios e seus pesos foram anotados, permitindo o cálculo do rendimento dos lipopeptídeos obtidos. Os lipopeptídeos puros obtidos foram recuperados em etanol e armazenados em geladeira para uso posterior.

2.2.2.3 Produção de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL)

Para a produção do extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (EBEL), utilizou-se o meio de cultura 523, composto por 10 g de sacarose, 8 g de caseína hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de K_2HPO_4 , 0,3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1.000 mL de água destilada. O inóculo foi preparado transferindo-se uma colônia da linhagem TR47II cultivada em TSA para frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio *Tryptic Soy Broth* (TSB). O frasco foi incubado a 30 °C em agitador orbital a 200 rpm por aproximadamente 18 horas. Em seguida, frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 200 mL do meio 523 foram inoculados com um volume do inóculo suficiente para se alcançar uma densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,05. As culturas foram incubadas a 30 °C e 200 rpm por 72 horas.

Os lipopeptídeos foram concentrados por precipitação ácida, conforme descrito por Vater et al. (2002). Para isso, o pH da solução foi ajustado para 2,0 utilizando-se HCl 6 mol L^{-1} . Após incubação a 4 °C *overnight*, os frascos foram submetidos à centrifugação 10.000 x g por 15 minutos e o extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) foi dissolvido em água destilada, ajustando-se o pH para 7,0. Após uma nova centrifugação, o sobrenadante foi armazenado em frascos a -80 °C e liofilizado, em seguida foi preparada uma solução estoque de 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para uso em análises subsequentes.

2.2.3 Síntese dos nanomateriais

2.2.3.1 Pontos Quânticos de Carbono - CQD's

Para a síntese dos CQD's, foi utilizado o protocolo adaptado de Lai e colaboradores (2020). Sumariamente, 2,8 gramas de ácido cítrico e 120 miligramas de ureia foram adicionados a 40 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada por 5 minutos. Em seguida, a solução foi transferida para um reator e levada à mufla pré-aquecida a 150 °C, onde a polimerização ocorreu por aproximadamente 10 horas a 200 °C. Por fim, o composto foi resfriado à temperatura ambiente, 4 mL de água ultrapura foram adicionados e a solução foi filtrada em filtro 0,45 µm.

Figura 2 – Autoclave hidrotermal



Vista externa e interna da autoclave hidrotermal utilizada na síntese de CQDs. O equipamento é composto por um corpo cilíndrico de aço inoxidável, tampa rosqueável com vedação, revestimento interno em PTFE (politetrafluoretileno) e disco metálico de pressão. Este sistema permite a realização de reações em meio aquoso sob alta temperatura e pressão, sendo comumente empregado em processos de cristalização, síntese de nanopartículas e tratamento hidrotérmico de amostras.

2.2.3.2 Síntese de nanopartículas de prata mediada por extrato de chá verde (NPAgCV) + extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL)

A síntese de nanopartículas de prata foi realizada utilizando-se metodologias adaptadas de Silva e Seabra (2016) e Rolim et al. (2016), com a incorporação de lipopeptídeos em uma etapa modificada do processo.

A síntese mediada por chá verde envolveu um preparo inicial de extrato de chá verde. Para isso, 2 g de pó de chá verde (Yamamotoyama) foram adicionados a 100 mL de água deionizada, sob aquecimento a 60 °C e agitação constante. A suspensão foi filtrada utilizando-se papel de filtro Whatman nº 1. Posteriormente, 75 mL de solução de AgNO₃ (0,1 mol L⁻¹) foram misturados com 75 mL do extrato de chá verde e o pH da mistura foi ajustado para 10,5 por meio da adição controlada de NaOH (1 mol L⁻¹). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 15 minutos, seguindo-se centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as NPAg foi lavado duas vezes com água ultrapura para remoção de resíduos, coletado e armazenado a 4 °C .

Na metodologia modificada pela adição de EBEL, após a filtração do extrato de chá verde, 5,5 mg de extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (item 2.2.2.3) foram adicionados à suspensão sob agitação constante até se atingir completa homogeneidade. A mistura contendo o extrato de chá verde e lipopeptídeos foi então utilizada no processo de síntese das AgNPs, seguindo-se as mesmas etapas descritas anteriormente.

2.2.3.3 Síntese química de nanopartícula de prata pelo método de Frens (NPAg)

Neste protocolo modificado, a síntese de nanopartículas de prata (NPAg) inicia-se com a preparação 50 mL de uma solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) em concentração de 1 mmol L^{-1} , a qual foi transferida para um frasco Erlenmeyer equipado com uma cápsula magnética para agitação homogênea. O frasco foi então revestido com papel alumínio para evitar a fotodegradação dos reagentes e aquecido em banho-maria até atingir o ponto de ebulição sob agitação constante (Gakiya-Teruya et al., 2018).

Uma vez alcançada a ebulição, foram adicionados rapidamente 500 μL de citrato de sódio (0,189 mol L^{-1}) à solução de íons de prata. O citrato atua simultaneamente como agente redutor, convertendo os íons Ag^+ em Ag^0 , e como estabilizante, adsorvendo-se na superfície das nanopartículas nascentes para evitar aglomeração. A concentração elevada do citrato e o volume reduzido adicionado (500 μL) são críticos para se garantir a formação de nanopartículas com tamanho controlado e distribuição de tamanho estreita. Após a adição, a solução foi mantida sob agitação vigorosa por 20 minutos, visando à completa redução dos íons e a estabilização das nanopartículas (Gakiya-Teruya et al., 2018).

2.2.3.4 Síntese de nanopartículas de prata revestidas com ramnolipídeos e extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (NpAgRLEB)

A síntese de nanopartículas de prata (NPAg) foi realizada utilizando-se diferentes revestimentos bioativos: ramnolipídeos (RL) obtido da Rhamnonolipid Inc. Lot FLA-Y-05(4),

uma combinação de ramnolipídeos e EBEL, ou apenas EBEL. A metodologia seguiu as etapas descritas abaixo, com ajustes conforme o tipo de revestimento utilizado.

2.2.3.4.1 Síntese de NpAgRL

Volumes iguais de solução aquosa de ramnolipídeos (10 g L^{-1} , 1 mL) e nitrato de prata (AgNO_3 , 1 mmol L^{-1} , 1 mL) foram misturados e o pH da solução foi ajustado para 12. A mistura foi incubada a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação vigorosa por 1 hora. Esse processo permitiu a interação dos ramnolipídeos com os íons de prata (Ag^+), promovendo a formação de complexos estáveis e a subsequente redução e nucleação das AgNPs (KHALID et al., 2019). A suspensão coloidal foi armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises e utilização em experimentos posteriores.

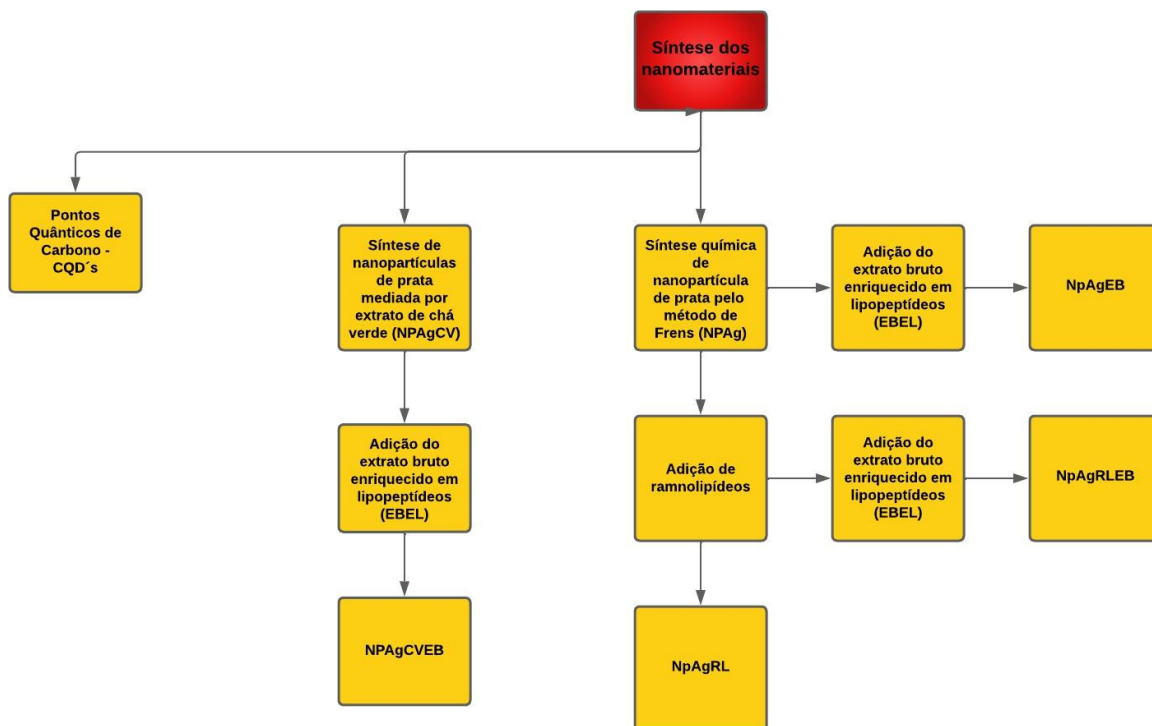
2.2.3.4.2 Síntese de NpAgRLEB

Para a obtenção de nanopartículas de prata revestidas com ramnolipídeos e extrato bruto enriquecido com lipopeptídeos (NpAgRLEB), foram misturados volumes iguais de solução de ramnolipídeos (10 g L^{-1} , 1 mL) adicionada de EB liofilizado (5,5 mg) e nitrato de prata (AgNO_3 , 1 mmol L^{-1} , 1 mL). O pH foi ajustado para 12 e a solução foi submetida às mesmas condições de incubação e agitação descritas para a síntese das NpAgRL. A suspensão obtida foi armazenada sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises subsequentes e uso posterior.

2.2.3.4.3 Síntese de NpAgEB

O preparo das nanopartículas de prata revestidas exclusivamente com extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (NpAgEB) consistiu da mistura de volumes iguais de solução aquosa de lipopeptídeos ($5,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e nitrato de prata (AgNO_3 1 mmol L^{-1} , 1 mL). O pH foi ajustado para 12 e a solução foi submetida às mesmas condições de síntese (2.2.3.1). A suspensão final foi armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para análises subsequentes e uso posterior.

Figura 3 – Fluxograma da síntese dos nanomateriais utilizados no estudo.



A partir do processo central de síntese, foram gerados diferentes nanomateriais: pontos quânticos de carbono (CQDs) e nanopartículas de prata (NPAg) obtidas por duas abordagens distintas — síntese mediada por extrato de chá verde (NPAgCV) e síntese química pelo método de Frens (NPAg). As nanopartículas de prata foram posteriormente funcionalizadas com extrato bruto enriquecido em lipopeptídeos (EBEL) e/ou ramnolipídeos (RL), resultando nas formulações: NPAgEB, NPAgRL, NPAgRLEB e NPAgCVEB.

2.2.4 Bactérias patogênicas utilizadas nos ensaios de inibição e avaliação da inibição do crescimento

As bactérias utilizadas nos ensaios de inibição foram isoladas de um caso de sepse em humano (*Pseudomonas aeruginosa* PA-BH) e de infecções em animais de produção atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, a saber: *Streptococcus agalactiae* (mastite bovina); *Staphylococcus aureus* (mastite caprina); *Staphylococcus warneri* (mastite caprina); *Escherichia coli* (mastite caprina); *Streptococcus uberis* (mastite bovina); *Escherichia coli* (peritonite bovina); *Salmonella sp.* (linfonodo mesentérico de suíno); *Salmonella sp.* (colite equina); e *Escherichia coli* (infecção sistêmica em aves).

Para os ensaios de avaliação da capacidade de inibição do crescimento pelos compostos sintetizados neste estudo, os isolados foram cultivados em Caldo Mueller-Hinton (MHB) a 37

°C por aproximadamente 15 horas. A densidade óptica inicial das suspensões bacterianas foi ajustada para 0,05 a 600 nm. O crescimento bacteriano foi monitorado em microplacas de 96 poços, sendo utilizada uma placa contendo diferentes concentrações de lipopeptídeos (1.000, 625, 391, 244, 153, 95, 60 e 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e outra contendo diferentes diluições da solução original de pontos quânticos de carbono (CQDs) (1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000).

O meio de cultivo nas microplacas foi o MHB, totalizando um volume final de 100 μL por poço, contendo o agente inibidor, a suspensão bacteriana e o meio de cultura. As análises foram realizadas em quadruplicata e a inibição bacteriana foi avaliada após 24 horas de incubação a 37 °C. A densidade óptica foi mensurada a 600 nm utilizando-se uma leitora de microplacas PowerWave XS (BioTek).

A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição (\%)} = (1 - \text{Ac}/\text{Ao}) \times 100$$

Ac = Absorbância na presença de agente inibidor

Ao = Absorbância na ausência de agente inibidor

2.2.5 Avaliação da atividade antibiofilme em microplaca

Os microrganismos de referência foram cultivados em Caldo Mueller-Hinton (MHB) até atingirem uma densidade óptica (DO) de 0,1 a 600 nm. Como controles, foram incluídos: (1) controle negativo - 100 μL de PBS estéril (NaCl 0,9 g L^{-1} ; Na_2HPO_4 1,5 g L^{-1} ; NaH_2PO_4 0,22 g L^{-1} , pH 7,2); e (2) controle positivo - 100 μL da suspensão bacteriana em MHB.

Para os ensaios, os lipopeptídeos purificados (item 2.2.2.2) foram solubilizados em caldo Mueller-Hinton (MHB) nas concentrações finais de 1.000 e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por poço. Já o extrato bruto (EBEL) não-purificado (2.2.2.3) foi diluído a partir da solução estoque para a concentração de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os pontos quânticos de carbono (CQDs) foram diluídos nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, e os demais nanomateriais na proporção de 1:10, resultando em um volume final de 100 μL por poço. Após a distribuição das amostras, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em condições aeróbicas. Posteriormente, o meio foi

cuidadosamente aspirado e cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de PBS estéril para remoção de células não aderidas. A fixação foi realizada com 100 µL de metanol absoluto (99% v/v) por 15 minutos à temperatura ambiente.

A coloração dos biofilmes foi realizada por meio da adição de 100 µL de solução de cristal violeta (10 g L⁻¹) por 5 minutos, seguida de três lavagens com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a secagem, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado com 100 µL de ácido acético a 33% (v/v) e a absorbância da solução extraída foi medida a 560 nm em uma leitora de microplacas PowerWave XS (BioTek). A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição da formação do biofilme (\%)} = ((A_c - A_t)/A_c) \times 100$$

Onde,

A_c = Absorbância do controle

A_t = Absorbância do tratamento

2.2.6 Acoplamento dos nanomateriais a cateter de silicone

Fragmentos de cateter (5mm) Well Lead Sonda Foley em látex siliconizado - duas vias-F01A021610 de 5,3 mm de diâmetro (daqui em diante denominados apenas de cateteres) foram submetidos a processo de limpeza ultrassônica em solução de etanol 100 % por 5 minutos, seguido de duas lavagens com água em banho ultrassônico por 5 minutos cada e posterior secagem a 60 °C. Para promover o acoplamento dos nanomateriais aos fragmentos de cateter, foi preparada uma solução contendo (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES), etanol anidro e água (1:1:4,25 v/v/v), a qual foi mantida à temperatura ambiente por 8 horas. Os cateteres foram imersos nessa solução por 60 minutos (CHEN et al., 2020) e então transferidos para as soluções contendo os nanomateriais previamente selecionados, onde permaneceram por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados com água e em seguida tampão HEPES (10 mM) para remover os reagentes não acoplados. Os cateteres foram secos a 60 °C por 1 hora e imersos em uma solução de polivinilpirrolidona (PVP K-30, 44–54 kDa de massa molar) a 50 g L⁻¹ por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, foram novamente lavados em água e secos a 60 °C por mais 1 hora (CHEN et al., 2020). Fragmentos não-tratados com os nanomateriais foram utilizados como controle.

2.2.7 Atividade antibiofilme de cateteres de silicone tratados com nanomateriais e PVP

Os cateteres foram distribuídos em poços de uma microplaca de 96 poços (Figura 1). Os microrganismos de referência foram cultivados em Caldo Mueller-Hinton (MHB) até atingirem uma densidade óptica (DO) de 0,1 a 600 nm. Em seguida, 200 µL foram inoculados nos poços das microplacas contendo os cateteres, seguindo-se incubação a 37 °C por 24 horas. O controle positivo consistiu no cultivo das bactérias em poços com fragmentos de cateter não tratados.

Após o período de incubação, as soluções foram removidas e os cateteres foram lavados três vezes com 200 µL PBS, adicionados e coletados com o auxílio de uma micropipeta multicanal para eliminar as células não aderidas. Posteriormente, cada cateter foi transferido para uma nova microplaca e as células aderentes foram fixadas com 200 µL de metanol a 99% (v/v) por 15 minutos, seguindo-se a remoção do fixador após esse período.

A coloração dos biofilmes foi realizada pela adição de 200 µL de solução de cristal violeta (10 g L⁻¹) e incubação por 5 minutos, seguindo-se três lavagens com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a secagem em temperatura ambiente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado com 200 µL de ácido acético a 33% (v/v), os fragmentos foram retirados e a absorbância da solução extraída foi medida a 560 nm em uma leitora de microplacas PowerWave XS (BioTek). A porcentagem de inibição da formação do biofilme foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Inibição do biofilme (\%)} = ((A_c - A_t)/A_c) \times 100$$

Onde,

A_c = Absorbância do controle

A_t = Absorbância do tratamento

Figura 4 – Exemplo do esquema de montagem das microplacas contendo segmentos de cateteres e os diferentes tratamentos com os compostos avaliados



Os poços das fileiras 1, 4 e 7 foram inoculados com *Salmonella* (equino); os das fileiras 2, 5 e 8 foram inoculados com *Salmonella* (suíno) e os das fileiras 3, 6 e 9 com *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH. Os tratamentos foram distribuídos da seguinte forma: A1-D1: controle positivo *Salmonella* (equino); A2-D2: controle positivo *Salmonella* (suíno); A3-D3: controle positivo *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH; E1-H1, E2-H2, E3-H3: tratamento AgRLEB; A4-D4, A5-D5, A6-D6: tratamento AgCVEB; E4-H4, E5-H5, E6-H6: tratamento AgCV; A7-D7, A8-D8, A9-D9: tratamento CQD.

2.2.8 Caracterizações

2.2.8.1 Potencial zeta

A análise do potencial zeta de soluções ou suspensões dos materiais desenvolvidos no estudo foi feita utilizando-se uma célula de medição Omega cuvette no aparelho Litesizer DLS 500, com a versão do software 2.34.3. A medição foi realizada no modo Zeta potential series, com água como solvente. A temperatura alvo durante a medição foi mantida em 25,0 °C, com um tempo de equilíbrio de 1 minuto. O fator de Henry utilizado foi 1,5 (Smoluchowski), e a tensão ajustada foi de 200,0 V, operando em modo manual.

2.2.8.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por FTIR foi realizada para identificar grupos funcionais presentes nas amostras, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu, modelo XRD 6000 equipado com acessório ATR. As amostras foram preparadas de acordo com sua natureza (líquida) e analisadas na faixa de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 a 64 varreduras. O espectro de fundo foi adquirido previamente para correção de interferências, e os espectros resultantes foram normalizados para interpretação. Os picos foram identificados com base em bandas características, como O-H, C=O, C-H, N-H e C-O, permitindo a identificação de grupos funcionais nas amostras.

2.2.8.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

As nanopartículas e CQDs foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis, com a absorvância óptica medida em um espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis), utilizando uma faixa de varredura entre 200 e 700 nm e resolução de 1 nm.

2.2.8.4 Análise de fluorescência

A análise de emissão de fluorescência dos pontos quânticos de carbono (CQDs) foi realizada em um espectrofluorímetro (Agilent Technologies - Cary Eclipse), utilizando-se um intervalo de excitação entre 300 e 500 nm. As medições foram feitas em cubeta de quartzo, com varredura do comprimento de onda de emissão de 350 a 600 nm. A intensidade da fluorescência foi registrada para diferentes excitações. As amostras foram preparadas em meio aquoso e analisadas à temperatura ambiente.

2.2.9 Análise de dados e estatística

Os experimentos foram conduzidos em triplicatas ou quadruplicatas, e os dados obtidos foram expressos como mediana e média do tratamento, seguidos do desvio padrão. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar diferenças estatísticas, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Já para os dados com distribuição normal, foi realizada a ANOVA, seguida do teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software R (R Core Team, 2021).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Antibiograma

Vários dos isolados bacterianos clínicos apresentaram multirresistência (Quadro 1). Dentre eles, destacou-se a *Escherichia coli* isolada de um caso de peritonite bovina. Este isolado demonstrou resistência a todos os antibióticos avaliados, com exceção do enrofloxacino. Este é

um antimicrobiano de amplo espectro da classe das fluoroquinolonas, amplamente utilizado no tratamento de infecções em medicina veterinária (SILVA et al., 2010).

Isolados do gênero *Salmonella*, como *Salmonella sp.* de um caso de colite equina e *Salmonella sp.* isolada de um linfonodo mesentérico suíno, também exibiram multirresistência. Esses microrganismos pertencem à lista de organismos prioritários de resistência antimicrobiana definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os isolados acima descritos caracterizam-se também pela sua capacidade de formação de biofilmes (Tabela 1), o que tende a dificultar ainda mais o manejo das infecções causadas por eles.

Streptococcus agalactiae, principal agente causador da mastite contagiosa em bovinos, demonstrou resistência a todos os antimicrobianos testados, exceto ao norfloxacino e ao enrofloxacino, sendo que a este último o isolado apresentou sensibilidade intermediária. A transmissão deste patógeno ocorre principalmente durante o processo de ordenha. A infecção provoca inflamação das glândulas mamárias, resultando em redução da produção e perda de qualidade do leite. O controle dessa doença depende de boas práticas de manejo e tratamento adequado dos animais infectados (PEREIRA, 2024).

Nos testes realizados, *Streptococcus uberis* não apresentou sensibilidade completa a nenhum dos antimicrobianos avaliados, mostrando apenas sensibilidade intermediária ao florfenicol e ao enrofloxacino e resistência aos demais. A espécie, frequentemente associada à mastite ambiental em bovinos, é um dos principais patógenos causadores de mastite clínica e subclínica em rebanhos leiteiros. Essa bactéria tem impacto significativo na produtividade e qualidade do leite (ULSENHEIMER et al., 2021).

Quadro 1 – resultados do antibiograma dos isolados clínicos utilizados neste estudo

<i>Staphylococcus warneri</i> (caprino) - mastite (SWC)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
PEN	10	11	10,5	R<29<S	R
ENO	28	29	28,5	R<16; S>23	S
CLO	26	27	26,5	R<16; S>18	S
AZI	28	25	26,5	R<14; S>18	S
TET	25	25	25	R<17; S>23	S
<i>Salmonella sp.</i> (equino) - colite (SC)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
CLO	10	9	9,5	R<12; S>18	R
CFE	22	22	22	R<14<S	S
DOX	6	6	6	R<10; S>14	R
TET	6	7	6,5	R<19<S	R
GEN	15	20	17,5	R<12; S>16	S
EST	16	18	17	R<11; S>15	S
ENO	30	30	30	R<16; S>23	S
AMP	6	6	6	R<14<S	R
<i>Salmonella sp.</i> (suíno) - linfonodo mesentérico (SS)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
CLO	12	10	11	R<12; S>18	R
CFE	6	6	6	R<14>S	R
DOX	15	12	13,5	R<10; S>14	I
TET	9	6	7,5	R<19>S	R
GEN	10	12	11	R<17>S	R
EST	6	7	6,5	R<11; S>15	R
ENO	26	26	26	R<16; S>23	S
AMP	6	6	6	R<14>S	R
<i>Escherichia coli</i> (ave) - infecção sistêmica (ECA)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
CLO	29	30	29,5	R<12; S>18	S
CFE	19	20	19,5	R<14<S	S
DOX	11	11	11	R<10; S>14	I
TET	9	9	9	R<19<S	R

GEN	28	22	25	R<17<S	S
EST	6	6	6	R<11; S>15	R
ENO	31	22	26,5	R<16; S>23	S
AMP	6	6	6	R<14>S	R
<i>Escherichia coli</i> (bovino) - peritonite (ECB)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
CLO	12	11	11,5	R<12; S>18	R
CFE	6	6	6	R<14<S	R
DOX	10	7	8,5	R<10; S>14	R
TET	7	8	7,5	R<19<S	R
GEN	12	12	12	R<17<S	R
EST	6	6	6	R<11; S>15	R
ENO	30	28	29	R<16; S>23	S
AMP	6	6	6	R<14<S	R
<i>Escherichia coli</i> (caprino) - mastite (ECC)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
CLO	26	25	25,5	R<12; S>18	S
CFE	22	22	22	R<14<S	S
TET	25	27	26	R<19<S	S
GEN	17	18	17,5	R<17<S	S
EST	16	15	15,5	R<11; S>15	S
ENO	30	29	29,5	R<16; S>23	S
AMP	19	18	18,5	R<14<S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> (caprino) - mastite (SAC)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
PEN	6	6	6	R<14; S>18	R
ENO	28	27	27,5	R<16; S>23	S
CLO	26	27	26,5	R<16; S>18	S
AZI	20	15	17,5	R<14; S>18	I
TET	27	23	25	R<17; S>23	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - caso de septicemia em humano (PA-BH)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
GEN	6	6	6	R<12; S>16	R
CAZ	25	25	25	R<14; S>18	S

AMI	17	17	17	R<15<S	S
MPM	34	34	34	R<15; S>19	S
ENO	23	23	23	R<16; S>23	S
LEV	35	35	35	R<18; S>50	I
TOB	6	6	6	R<18<S	R
CIP	27	29	28	R<26; S>50	I
<i>Streptococcus uberis</i> (bovino) - mastite (SUB)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
RIF	6	6	6	R<21<S	R
FLF	19	23	21	R<18; S>22	I
NOR	7	8	7,5	R<12<S	R
ENO	21	22	21,5	R<16; S>23	I
SUT	6	6	6	R<15; S>18	R
PEN	6	6	6	R<19<S	R
CTF	6	6	6	R<17; S>21	R
TET	6	6	6	R<20; S>23	R
CLI	6	6	6	R<17<S	R
<i>Streptococcus agalactiae</i> (bovino) - mastite (SAB)					
Antibiótico	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	média (mm)	Parâmetro	Resultado
RIF	6	6	6	R<21<S	R
FLF	14	20	17	R<18; S>22	R
NOR	19	25	22	R<12<S	S
ENO	22	23	22,5	R<16; S>23	I
SUT	6	6	6	R<15; S>18	R
PEN	6	6	6	R<19<S	R
CTF	8	7	7,5	R<17; S>21	R
TET	7	8	7,5	R<20; S>23	R
CLI	6	6	6	R<17<S	R

PEN: Penicilina; CLO: Cloranfenicol; AZI: Azitromicina; TET: Tetraciclina; CFE: Cefalexina; DOX: Doxiciclina; GEN: Gentamicina; EST: Estreptomicina; ENO: Enrofloxacino; AMP: Ampicilina; CAZ: Ceftazidima; MPM: Meropeném; AMI: Amicacina; TOB: Tobramicina; CIP: Ciprofloxacino; LEV: Levofloxacino; CLI: Clindamicina; CTF: Ceftriaxona; RIF: Rifampicina; FLF: Florfenicol; SUT: Sulfametoxazol + Trimetoprima; NOR: Norfloxacino. O experimento foi conduzido em duplicata e foi realizada a média das medições. A letra “R”

indica resistência, “S” indica sensível e “I” sensibilidade intermediária de acordo com parâmetros da CLSI e BrCast.

Neste trabalho, dentre os dez isolados bacterianos obtidos de casos clínicos, sete demonstraram ser multirresistentes (MDR), sendo eles *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella sp.* (equino), *Salmonella sp.* (suíno), *Escherichia coli* (ave), *Escherichia coli* (bovino), *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus uberis*. Infecções causadas por esses microrganismos são de difícil tratamento, pois frequentemente requerem o uso de altas doses de antimicrobianos em combinação com terapias alternativas, tanto em humanos quanto em animais (PARMANIK et al., 2022). Essa situação se agrava ainda mais quando os microrganismos são capazes de formar biofilmes, estruturas que dificultam significativamente a ação dos medicamentos.

Em relação à capacidade de formação de biofilmes, dos dez isolados avaliados, três apresentaram essa característica em ensaio in vitro (Tabela 1).

Tabela 1 - Formação de biofilme pelos isolados clínicos neste estudo

	ECA	SC*	SS*	ECB	SUB	ECC	SWC	SAC	SAB	PA-BH*
D.O _{x nm}	0,04	0,38	0,48	0,03	0,05	0,01	0,00	0,00	0,01	0,51

A formação de biofilmes foi avaliada pelo método do cristal violeta, cuja detecção se dá por meio da avaliação da densidade óptica a 560 nm. Os resultados apresentados referem-se à densidade óptica dos poços inoculados, descontada do valor encontrado nos poços com o controle (solução de PBS).

*Isolados considerados como formadores de biofilmes, nas condições do ensaio utilizado. SC: *Salmonella sp.* (equino); SS: *Salmonella sp.* (suíno); PA-BH: *Pseudomonas aeruginosa*.

A formação de biofilmes bacterianos representa um desafio significativo no controle de infecções, uma vez que essas estruturas conferem às bactérias maior resistência aos antimicrobianos, aos componentes do sistema imunológico responsáveis pelo controle da infecção bacteriana e a condições ambientais adversas. Estudos indicam que *Salmonella spp.* isoladas de produtos cárneos podem formar biofilmes e apresentar multirresistência a diversos agentes antimicrobianos, complicando o tratamento de infecções associadas (BERGAMO et al., 2020).

A eliminação ou a inibição da formação de biofilmes é crucial para prevenir ou controlar infecções persistentes e a disseminação de patógenos. A eficácia dos antimicrobianos na inibição de biofilmes pode variar consideravelmente, dependendo de sua composição e do seu mecanismo de ação. Por exemplo, nanopartículas de prata têm demonstrado atividade

antibiofilme significativa, possivelmente em decorrência de seu pequeno tamanho, que facilita a penetração na matriz extracelular do biofilme, e da indução de estresse oxidativo nas células bacterianas (FREIRE et al., 2018). No entanto, alguns compostos podem ser neutralizados por mecanismos de resistência intrínsecos das bactérias. Portanto, compreender as diferenças na eficácia de antimicrobianos e os fatores que influenciam sua ação é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no controle de biofilmes bacterianos.

2.3.2 Inibição do crescimento dos isolados clínicos por lipopeptídeos purificados

Os lipopeptídeos extraídos das linhagens *B. velezensis* TR47II e TR59II apresentaram diferenças significativas quanto à capacidade de inibição do crescimento dos isolados bacterianos testados (Tabelas A.1, A.2, A.3 e A.4, APÊNDICE A). A análise comparativa revelou que os lipopeptídeos da linhagem *B. velezensis* TR59II foram mais eficazes contra *P. aeruginosa*, especialmente na concentração intermediária de $95 \mu\text{g mL}^{-1}$, em que o crescimento foi inibido em 100%. Já os lipopeptídeos de *B. velezensis* TR47II inibiram o crescimento dessa mesma linhagem em 76,5%. Na concentração de $244 \mu\text{g mL}^{-1}$, os lipopeptídeos purificados dessa linhagem demonstraram eficácia superior à obtida no estudo realizado por Freitas et al. (2020), no qual o extrato bruto de *B. velezensis* TR47II resultou em apenas 47% de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em relação à *E. coli* isolada de peritonite bovina, os lipopeptídeos de *B. velezensis* TR47II apresentaram maior efeito inibitório na concentração de $391 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto os de *B. velezensis* TR59II apresentaram maior inibição a $625 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados são promissores quando comparados ao estudo de Freitas et al. (2020), que avaliaram a ação do extrato bruto de TR47II contra *E. coli* ATCC 25922 e observaram uma inibição parcial de apenas 16% na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Com relação aos demais grupos bacterianos, os lipopeptídeos extraídos das duas linhagens de *B. velezensis* demonstraram inibição moderada ou baixa. No caso de *S. agalactiae* e *S. uberis*, ambos isolados de mastite bovina, a eficácia foi inferior em comparação a outros patógenos, o que pode indicar mecanismos de resistência ou menor susceptibilidade à ação desses compostos. Esses resultados ressaltam a importância da seleção criteriosa da linhagem produtora e da concentração dos lipopeptídeos em função do microrganismo-alvo, permitindo uma otimização do uso desses compostos e potencial redução dos custos de aplicação.

Os lipopeptídeos de ambos os isolados de *B. velezensis* inibiram moderadamente o crescimento de *S. aureus*, obtendo-se um valor máximo de inibição com os lipopeptídeos de *B. velezensis* TR59II (56,25%) na concentração de 244 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sabino et al. (2024) demonstraram a atividade anti-hemolítica de lipopeptídeos, especialmente de iturinas, contra *S. aureus*, as quais inibem diretamente a ação da hemolisina. Os autores concluíram que os lipopeptídeos, particularmente as iturinas, atuam de forma eficaz na redução da virulência de *S. aureus* ao interferirem diretamente na atividade da hemolisina, um fator de virulência crucial para a patogenicidade da bactéria. Isso é especialmente relevante no contexto de infecções como a mastite bovina, onde a hemolisina desempenha um papel importante no agravamento da doença (SABINO et al., 2024).

A análise estatística pelo teste de Dunn revelou diferenças significativas entre e dentro dos grupos de lipopeptídeos produzidos pelos isolados *B. velezensis* TR47II e TR59II, sugerindo haver efeito tanto da concentração quanto de diferenças na proporção das isoformas de lipopeptídeos em cada extrato purificado (Tabela 2). De modo geral, os lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* TR59II apresentaram maior eficiência de inibição do crescimento dos isolados clínicos. Estudos anteriores indicaram que variações estruturais entre iturinas, fengicinas e surfactinas, como o comprimento da cadeia de ácido graxo e a sequência de aminoácidos, afetam sua afinidade com a superfície da célula-alvo e a sua eficácia antimicrobiana, impactando tanto a inibição do crescimento bacteriano quanto a modulação de fatores de virulência (MNIF et al., 2015; SEYDLOVÁ et al., 2008; ALMEIDA, 2022). Esses achados reforçam a necessidade de uma caracterização detalhada dos lipopeptídeos produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus* para otimizar seu uso no controle de patógenos de interesse clínico e veterinário.

Tabela 2 - Inibição do crescimento de isolados bacterianos clínicos por lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* TR47II e TR59II nas concentrações de maior eficiência de inibição (CME)

Isolado	TR47II		TR59II	
	CME ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de inibição	CME ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% de inibição
<i>Staphylococcus warneri</i>	37	16,5 \pm 15,59	153	24,5 \pm 30,95
<i>Streptococcus uberis</i>	60	18,75 \pm 15	37	37 \pm 2,58
<i>Salmonella sp.</i> (suíno)	391	26,75 \pm 17,98	391	60,5 \pm 3,87
<i>Salmonella sp.</i> (cavalo)	244	6,75 \pm 8,30	244	41,75 \pm 23,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	244	22,75 \pm 24,46	244	56,25 \pm 5,06
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1000	53,5 \pm 53,69	37	49,5 \pm 57,16
<i>Escherichia coli</i> (caprino)	153	26,5 \pm 16,52	37	58,5 \pm 49,03
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-BH	244	76,5 \pm 33,47	95	100 \pm 0
<i>Escherichia coli</i> (bovino)	391	90,25 \pm 6,95	625	95 \pm 1,41

A tabela apresenta os maiores valores (média + desvio-padrão) de percentagem de inibição do crescimento dos isolados bacterianos clínicos tratados com os lipopeptídeos extraídos das linhagens TR47II e TR59II.

2.3.3 Inibição do crescimento de isolados bacterianos clínicos por pontos quânticos de carbono

Neste estudo, avaliou-se a eficácia dos pontos quânticos de carbono (CQDs) em inibir o crescimento de isolados clínicos de bactérias patogênicas.

Os CQDs apresentaram elevada eficácia antimicrobiana, especialmente em concentrações mais altas (diluições 1:1 e 1:10), em que a inibição bacteriana ultrapassou 70% para a maioria dos isolados testados (Tabelas 3 a 7). No entanto, à medida que a diluição da solução original aumentou (1:100, 1:1.000 e 1:10.000), a eficácia dos CQDs diminuiu consideravelmente. Uma exceção foi o isolado *Salmonella sp.* (suíno), cujo crescimento foi significativamente reduzido mesmo na maior diluição dos CQDs.

Tabela 3 - Mediana, média e desvio padrão da porcentagem de inibição de *Staphylococcus sp.* em diferentes diluições de CQDs

Diluição	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1: 1	93,5 (93,5 ± 0,58) a	81,5 (80,75 ± 5,80) a
1: 10	92 (93,25 ± 4,79) a	91,5 (92,25 ± 5,80) a
1: 100	39,5 (40 ± 2,45) ab	23 (21,5 ± 5,97) ab
1: 1.000	0,5 (5,5 ± 10,34) b	7,5 (7,5 ± 3,70) b
1: 10.000	6 (6,5 ± 7,55) b	0 (0 ± 0) b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Dunn.

Tabela 4 - Mediana, média e desvio padrão da porcentagem de inibição de *Salmonella sp.* em diferentes diluições de CQDs

Diluição	<i>Salmonella sp. (equino)</i>	<i>Salmonella sp. (suíno)</i>
1: 1	74,5 (74,25 ± 4,35) a	91 (91 ± 0,82) a
1: 10	73,5 (73,75 ± 4,57) a	89,5 (89,5 ± 2,08) a
1: 100	12 (12,5 ± 4,12) ab	67 (63,5 ± 27,05) a
1: 1.000	0 (0 ± 0) b	21 (33,5 ± 40,53) a
1: 10.000	0 (0 ± 0) b	94 (71 ± 47,34) a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Dunn.

Tabela 5 - Mediana, média e desvio padrão da porcentagem de inibição de *Streptococcus sp.* em diferentes diluições de CQDs

Diluição	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1: 1	95,5 (95,5 ± 0,58) a	70 (69,75 ± 2,99) a
1: 10	99 (98,25 ± 2,36) a	77,5 (75,75 ± 5,68) a
1: 100	92 (92 ± 9,24) a	38 (39,25 ± 11,41) ab
1: 1.000	17,5 (16,25 ± 7,63) b	19 (15,25 ± 10,37) b
1: 10.000	8 (7,25 ± 3,40) b	0 (0 ± 0) b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Dunn.

Tabela 6 - Mediana, média e desvio padrão da porcentagem de inibição de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes diluições de CQDs

Diluição	<i>Escherichia coli</i> (caprino)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-BH
1: 1	84 (83,75 ± 1,50) a	83 (83 ± 3,30) a
1: 10	86,5 (84,25 ± 6,29) a	87,5 (87,5 ± 3,11) a
1: 100	3,5 (3,5 ± 2,89) b	0 (0 ± 0) b

1: 1.000	7 (6,5 ± 1,73) ab	0 (0 ± 0) b
1: 10.000	2,5 (2,75 ± 3,20) b	0 (0 ± 0) b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Dunn.

Tabela 7 - Mediana, média e desvio padrão da porcentagem de inibição de *Escherichia coli* em diferentes diluições de CQDs

Diluição	<i>Escherichia coli</i> (bovino)	<i>Escherichia coli</i> (ave)
1: 1	78,5 (76 ± 6,88) a	77 (77,5 ± 1,91) a
1: 10	85,5 (84 ± 6,48) a	82,5 (83 ± 2,16) a
1: 100	0 (2,25 ± 4,50) b	0 (0 ± 0) b
1: 1.000	0 (0,75 ± 1,50) b	0 (0 ± 0) b
1: 10.000	3,5 (3 ± 1,41) b	0 (0 ± 0) b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, conforme determinado pelo teste de Dunn.

A variação na sensibilidade bacteriana aos CQDs pode estar relacionada a diferenças estruturais na parede celular e aos mecanismos de resistência intrínsecos de cada espécie ou linhagem. Segundo Dizaj et al. (2015), a resposta de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a nanomateriais de carbono varia em função da estrutura da membrana celular, do tipo de funcionalização das nanopartículas e de seu mecanismo de ação. No presente estudo, além da *Salmonella* sp. isolada de suíno, as bactérias Gram-positivas *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus warneri* também apresentaram alta sensibilidade aos CQDs, com elevados índices de inibição mesmo em diluições intermediárias. Esse comportamento pode estar relacionado à ausência de membrana externa nessas bactérias, o que facilita a ação dos CQDs. Em contrapartida, outros isolados Gram-negativos, como *Escherichia coli* (ave), *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH e o outro isolado de *Salmonella* sp. (equino), mostraram menor susceptibilidade, possivelmente como resultado da barreira seletiva imposta pela membrana externa. Os fatores responsáveis pela diferença de sensibilidade aos CQDs observada entre os dois isolados de *Salmonella* são desconhecidos, apesar de sua arquitetura celular ser semelhante. Essa variação pode estar relacionada a mecanismos de resistência bacteriana, que podem ser classificados como intrínsecos ou adquiridos (ROWLANDS et al., 2014). A resistência intrínseca está naturalmente presente em determinadas espécies bacterianas, como a impermeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativas, que dificulta a entrada de antimicrobianos (ROWLANDS et al., 2014). Já a resistência adquirida ocorre por meio de mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência através de transferência

horizontal, incluindo os processos de conjugação, transdução ou transformação (ROWLANDS et al., 2014). Esses mecanismos podem influenciar a eficácia dos CQDs, resultando em diferenças na sensibilidade entre os isolados.

A análise estatística confirmou a relação direta entre a concentração dos CQDs e a inibição bacteriana, com redução significativa da eficácia em diluições mais elevadas. Esse padrão está de acordo com os mecanismos de ação descritos para nanomateriais de carbono, que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos à membrana celular bacteriana (LI et al., 2016). O teste de Kruskal-Wallis identificou diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas para a maioria das bactérias. No entanto, para *Salmonella sp.* (suíno), não foram observadas diferenças significativas entre as diluições, o que sugere uma resposta diferenciada desse microrganismo à ação dos CQDs (Tabela 4).

As bactérias, por sua vez, enfrentam o estresse oxidativo por meio de enzimas antioxidantes (como SOD, catalase e peroxidases), moléculas redutoras (glutathione e tioredoxina) e reguladores redox (OxyR, SoxRS) (LEMIRE et al., 2017). Além disso, utilizam ácidos ceto (como piruvato e α -cetogluturato), que neutralizam ROS por reações químicas não enzimáticas (LEMIRE et al., 2017). A reprogramação metabólica também favorece a geração de NADPH e reduz a produção de ROS, contribuindo para a adaptação e a sobrevivência em ambientes oxidantes. Esses mecanismos podem, em parte, explicar as diferenças de sensibilidade observadas entre os organismos analisados neste estudo (LEMIRE et al., 2017).

Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial dos CQDs como alternativa promissora no controle de infecções bacterianas em animais de produção e em humanos, estando alinhados com estudos prévios que demonstraram a atividade antimicrobiana de pontos quânticos de carbono. Trabalhos como os de Li et al. (2016) e Gao et al. (2021) destacam o potencial desses nanomateriais para aplicações biomédicas e veterinárias. A relação direta entre concentração e eficiência de inibição indica que a otimização da dosagem é essencial para se garantir a eficácia necessária para o efetivo controle das infecções. Além disso, a combinação de CQDs com outros agentes antimicrobianos pode representar uma estratégia interessante para potencializar sua ação em concentrações reduzidas, minimizando custos e possíveis efeitos colaterais adversos.

Destaca-se que este estudo apresenta algumas limitações, como o número reduzido de isolados bacterianos testados e a faixa de concentrações utilizadas. Pesquisas futuras devem explorar uma gama mais ampla de patógenos e investigar os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre CQDs e as células bacterianas, de modo a entendermos, por exemplo, as diferenças de suscetibilidade bacteriana aos CQDs. Nesse aspecto, o isolado *Salmonella* sp. de suíno pode vir a ser um modelo interessante, tendo em vista o seu comportamento diferenciado face a doses decrescentes de CQDs (Tabela 4). Além disso, estudos toxicológicos são fundamentais para se validar a segurança desses nanomateriais antes de sua aplicação na medicina veterinária e humana para o controle de infecções bacterianas.

2.3.4 Atividade antibiofilme dos compostos antimicrobianos

O estudo sobre a eficiência dos antimicrobianos produzidos neste trabalho em inibir a formação de biofilmes restringiu-se aos três isolados clínicos que apresentaram essa característica em ensaio prévio (SC: *Salmonella* sp. (equino); SS: *Salmonella* sp. (suíno); PA-BH: *Pseudomonas aeruginosa* - Tabela 1).

Todos os compostos avaliados, com exceção de EB₄₇ (extrato bruto de lipopeptídeos de *B. velezensis* TR47II), NPAg (nanopartículas de Ag) e NPAgEB₄₇ foram eficientes em inibir a formação de biofilme por *Salmonella* sp. isolada da colite de equino (inibição > 40%). A baixa eficiência do EB₄₇ em inibir a formação de biofilme por esse isolado clínico é coerente com sua baixa atividade antimicrobiana contra este mesmo isolado (Tabela 2). A eficiência das NPAg em inibir a formação de biofilme por *Salmonella* sp. de equino aumentou significativamente quando se substituiu o EB₄₇ por ramnolipídeos (NPAgRL) ou quando se utilizaram ramnolipídeos juntamente com EB₄₇ para a dopagem das nanopartículas. Em relação aos pontos quânticos de carbono (CQDs), a eficiência em reduzir a formação de biofilme por *Salmonella* sp. de equino foi reduzida à metade quando a solução original foi diluída.

A diferença na inibição de biofilme entre os produtos está associada à sua composição e mecanismos de ação. Produtos contendo nanopartículas podem atuar por interação com a membrana bacteriana, induzindo estresse oxidativo e levando à morte celular (Trpathi et al., 2022). Por outro lado, produtos com baixa inibição podem não interagir eficientemente com a

bactéria ou serem neutralizados por mecanismos de resistência de *Salmonella sp.* (ALEKSANDROWICZ et al., 2023).

De acordo com Khalid e colaboradores (2019), a inibição da formação de biofilme causada pela adição de rannolipídeos (RL) às NPAg pode estar relacionada à modificação da membrana celular bacteriana pelos biossurfactantes, que facilitam a entrada das nanopartículas e potencializam sua eficácia. Um dos principais mecanismos de ação envolve a alteração da permeabilidade da membrana, permitindo uma maior absorção das nanopartículas metálicas. Essas, por sua vez, podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos estruturais às células microbianas.

O chá verde utilizado na síntese de nanopartículas de prata contém catequinas, como a epigalocatequina (EGC) e a epigalocatequina galato (EGCG), que possuem um papel essencial na atividade antimicrobiana e na estabilização de nanopartículas. As catequinas exercem atividade antimicrobiana por diversos mecanismos, incluindo a inibição de fatores de virulência, a perturbação da membrana celular bacteriana, a inibição de enzimas intracelulares, a indução de estresse oxidativo e danos ao DNA (RENZETTI et al., 2020). Também estabilizam nanopartículas metálicas, como as de prata (AgNPs), atuando como agentes redutores e estabilizadores na síntese. Essa estabilização ocorre porque as catequinas se ligam à superfície das nanopartículas, prevenindo sua agregação e preservando sua atividade biológica (COX et al., 2021).

Dessa forma, os resultados demonstram que NPAgCV, NPAgCVEB₄₇ e NPAgRLEB₄₇ são as formulações mais promissoras para a inibição da formação de biofilme por *Salmonella sp.* (equino) em microplaca, enquanto alguns produtos, como CQDs e NPAg apresentam eficácia reduzida (com exceção de CQD quando utilizado em alta concentração). A incorporação de nanopartículas demonstrou ser uma estratégia vantajosa, e a concentração do produto também se mostrou um fator determinante na atividade antimicrobiana.

Tabela 8 - Inibição de biofilme em microplaca utilizando diferentes formulações de compostos antimicrobianos

Composto	<i>Salmonella sp.</i> (equino)	<i>Salmonella sp.</i> (suíno)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA-BH
CQD 1:1	55 (54 ± 2,83)	58,5 (58,5 ± 0,58)	63 (62,5 ± 1,00)

CQD 1:10	29 (23,5 ± 16,09)	21,5 (21,5 ± 9,00)	84,5 (84,25 ± 0,96)
CQD 1:100	24 (25,25 ± 4,99)	35,5 (36,25 ± 1,89)	80 (80,5 ± 1,91)
TR47/2000	41,5 (40,5 ± 6,35)	36 (36,25 ± 6,08)	74,5 (59 ± 40,87)
TR59/1000	50 (49,75 ± 2,99)	40,5 (40,5 ± 3,51)	86,5 (86,25 ± 0,96)
TR59/2000	47,5 (46,5 ± 2,38)	41,5 (41,25 ± 2,50)	86,5 (86,5 ± 0,58)
NPAgEB₄₇	27,5 (30,25 ± 8,26)	4 (4,5 ± 4,12)	64,5 (64,75 ± 0,96)
NPAgRL	53 (51,75 ± 4,72)	20,5 (21,25 ± 7,50)	39 (30,75 ± 20,69)
NPAgCVEB₄₇	60 (59,5 ± 1,91)	25,5 (25 ± 3,56)	61,5 (61,75 ± 0,96)
NPAgRLEB₄₇	48,5 (49,25 ± 3,40)	21,5 (19,25 ± 10,14)	55 (56,75 ± 6,65)
EB₄₇	27 (27,25 ± 3,30)	4 (4,25 ± 3,69)	0 (0 ± 0)
NPAg	4,5 (5,75 ± 6,95)	0 (0 ± 0)	0 (0 ± 0)
NPAgCV	56,5 (55,75 ± 1,89)	23 (23,5 ± 5,92)	63,5 (62 ± 4,97)

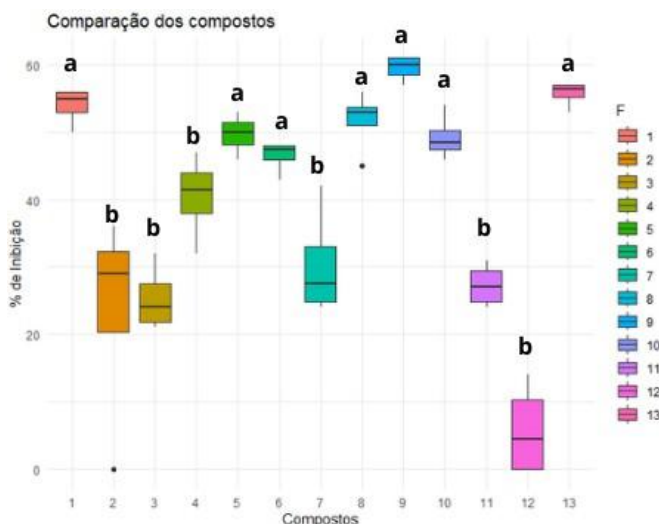
* Os dados representam a mediana, a média e o desvio-padrão das porcentagens de inibição da formação de biofilme em microplaca.

Quadro 2 - Siglas e composições das formulações

F1	CQD 1:1	Ponto Quântico de Carbono 1:1
F2	CQD 1:10	Ponto Quântico de Carbono 1:10
F3	CQD 1:100	Ponto Quântico de Carbono 1:100
F4	TR47/2000	Lipopeptídeo TR47 a 2000 µg mL ⁻¹
F5	TR59/1000	Lipopeptídeo TR59 a 1000 µg mL ⁻¹
F6	TR59/2000	Lipopeptídeo TR59 a 2000 µg mL ⁻¹
F7	NPAgEB ₄₇	Nanopartículas de prata dopadas com extrato bruto de lipopeptídeos produzidos por <i>B. velezensis</i> TR47II (diluição de 1:10)
F8	NPAgRL	Nanopartículas de prata dopadas com ramnolipídeo (diluição de 1:10)
F9	NPAgCVEB ₄₇	Nanopartículas de prata mediada por chá verde e associada a extrato

		bruto de lipopeptídeo (diluição de 1:10)
F10	NPAgRLEB ₄₇	Nanopartículas de prata dopadas com ramnolipídeos e extrato bruto de lipopeptídeos produzidos por <i>B. velezensis</i> TR47II (diluição de 1:10)
F11	EB ₄₇	Extrato bruto de lipopeptídeos produzidos por <i>B. velezensis</i> TR47II (diluição de 1:10)
F12	NPAg	Nanopartícula de prata com síntese mediada (diluição de 1:10)
F13	NPAgCV	Nanopartícula de prata com síntese mediada por chá verde (diluição de 1:10)

Figura 5 - Comparação das médias de porcentagem de inibição de biofilme para o isolado *Salmonella sp.* (equino)



A comparação das médias foi realizada pelo teste de Dunn. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa entre si a 5% de significância. As caixas coloridas representam a distribuição dos dados de porcentagem de inibição para cada composto testado. A linha preta dentro de cada caixa indica a mediana dos dados, enquanto as extremidades da caixa mostram os quartis (valores que delimitam 50% dos dados centrais). As

linhas que se estendem a partir das caixas representam a variação dos dados, e os pontos pretos fora dessas linhas são valores atípicos (outliers).

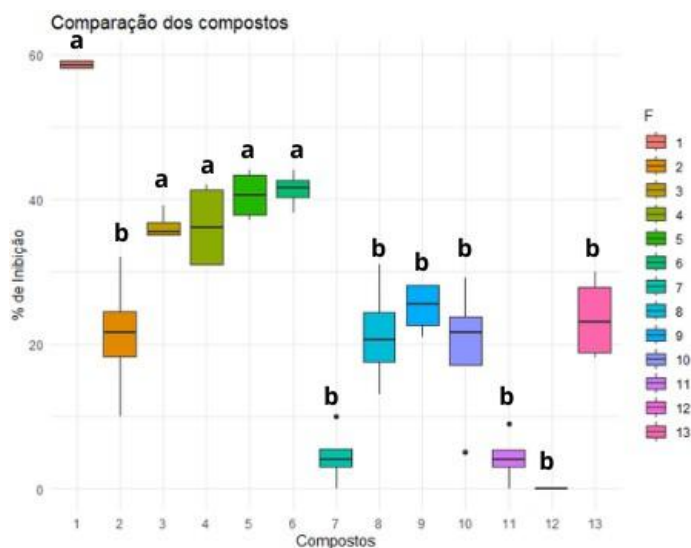
Em relação ao isolado de *Salmonella sp.* proveniente de linfonodo mesentérico suíno, a maior inibição da formação de biofilme (58,5%) foi alcançada com a formulação de CQDs na concentração máxima testada (CQD1:1). Em contraste, os compostos NPAg (0%), EB₄₇ (4,25%) e NPAgEB₄₇ (4,5%) não demonstraram eficácia significativa contra esta cepa, sugerindo ausência de componentes ativos em concentrações suficientes para inibição de biofilme. Estes resultados corroboram os achados de Koul et al. (2024), que descrevem a capacidade dos CQDs em desestabilizar a matriz extracelular de biofilmes e interferir na expressão gênica relacionada à virulência e nos sistemas de *quorum sensing* de bactérias, comprometendo a organização da comunidade microbiana.

Os produtos CQD1:10 e CQD1:100 apresentaram eficácia intermediária, com valores de inibição da formação de biofilme de 21,5% e 36,25%, respectivamente, demonstrando uma relação dose-dependente característica da atividade antimicrobiana e, neste caso, antibiofilme. Padrão semelhante foi observado para as formulações TR47/2000 e TR59/2000, que exibiram inibições de 36,25% e 40,5%, respectivamente, indicando atividade antibiofilme moderada.

As formulações contendo nanopartículas de prata (NPAgRL, NPAgCV, NPAgCVEB₄₇ e NPAgRLEB₄₇) apresentaram baixa eficácia (4,5-25%), possivelmente como resultado de: (i) interações moleculares inadequadas com este isolado específico, ou (ii) mecanismos de resistência intrínsecos da cepa bacteriana. A análise do perfil de resistência a antimicrobianos (Quadro 1) revelou que este isolado apresentou sensibilidade apenas à enrofloxacin, reforçando seu fenótipo multirresistente.

Comparando com os resultados obtidos para o isolado equino de *Salmonella sp.*, verificou-se variação significativa na suscetibilidade aos compostos testados. Embora o CQD1:1 tenha mantido sua eficácia superior em ambos os isolados, o desempenho das nanopartículas de prata foi particularmente reduzido contra a cepa suína. Estas diferenças inter-isolados destacam a importância de: (i) caracterização molecular das cepas, (ii) ajustes nas formulações, e (iii) otimização de concentrações para garantir amplo espectro de ação contra diferentes linhagens de *Salmonella sp.*

Figura 6 - Comparação das médias de porcentagem de inibição de biofilme para o isolado *Salmonella sp.* (suíno)



A comparação das médias foi realizada pelo teste de Dunn. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa entre si a 5% de significância. As caixas coloridas representam a distribuição dos dados de porcentagem de inibição para cada composto testado. A linha preta dentro de cada caixa indica a mediana dos dados, enquanto as extremidades da caixa mostram os quartis (valores que delimitam 50% dos dados centrais). As linhas que se estendem a partir das caixas representam a variação dos dados, e os pontos pretos fora dessas linhas são valores atípicos (outliers).

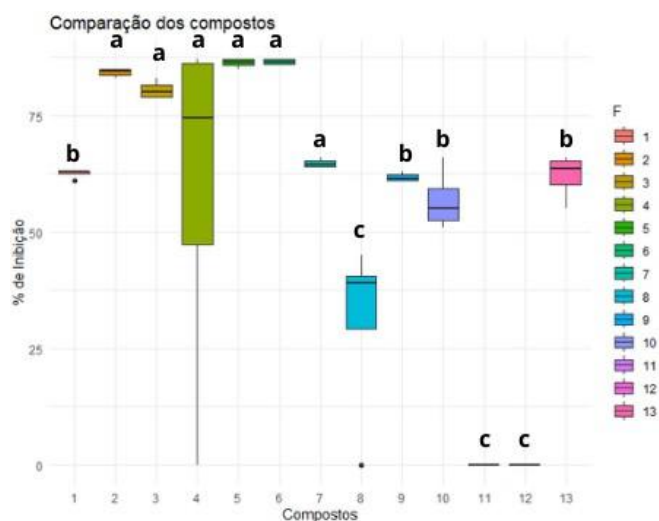
Os dados da Figura 7 demonstram variações significativas na inibição de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH pelos compostos testados. O produto TR59/2000 apresentou a maior eficácia (86,5% de inibição), seguido por TR59/1000 (86,25%) e CQD1:10 (84,25%). O CQD1:1 também mostrou eficácia relevante (62,5% de inibição). Os lipopeptídeos derivados de *Bacillus velezensis* TR59II exibiram dupla ação, inibindo tanto o crescimento bacteriano (Tabela 2) quanto a formação de biofilmes, corroborando estudos recentes que descrevem seus múltiplos mecanismos de ação, incluindo interação com a matriz extracelular, perturbação de membranas celulares e interferência no sistema de *quorum sensing* (SREELAKSHMI et al., 2024).

As formulações com nanopartículas de prata (NPAg) apresentaram eficácia moderada: NPAgEB₄₇ (65%), NPAgCV (62%), NPAgCVEB₄₇ (62%) e NPAgRLEB₄₇ (57%), enquanto NPAgRL (30%) mostrou desempenho inferior. Essa variabilidade sugere dependência da formulação, consistente com os mecanismos multifatoriais descritos por Kamer et al. (2024), em que as nanopartículas de prata (NPAg) combateram biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* através de múltiplos mecanismos: inibindo a formação do biofilme (redução de até 89%), diminuindo a motilidade bacteriana (até 66,6%), suprimindo fatores de virulência como protease, gelatinase (redução de até 100%) e piocianina (até 79%) e reduzindo a expressão de genes reguladores de virulência (LasR, PqsR, RhIR). Além disso, as nanopartículas de prata potencializam a ação de antibióticos como gentamicina e ciprofloxacina, diminuindo suas concentrações inibitórias em até 10 vezes.

Por outro lado, os ramnolipídeos são agentes duais, pois *P. aeruginosa* os produz para competir com outros microrganismos (ALMEIDA, 2024), mas sua aplicação externa pode desagregar biofilmes e sensibilizar bactérias resistentes, sendo promissores em terapias combinadas. Estudos com di-ramnolipídeos de *Lysinibacillus sp.* BV152.1 revelaram inibição de 50% na formação de biofilmes (50 µg/mL) de *P. aeruginosa*, com derivados de morfolina alcançando 90% de eficácia através da desestabilização da matriz extracelular e bloqueio da adesão bacteriana (ALEKSIC et al., 2017).

Os resultados obtidos neste estudo destacam o potencial diferenciado de cada classe de compostos. A otimização de formulações, particularmente para nanopartículas, e a investigação de sinergias entre estas classes podem representar estratégias valiosas para o controle de biofilmes patogênicos.

Figura 7 - Comparação das médias de porcentagem de inibição de biofilme para o isolado *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH



A comparação das médias foi realizada pelo teste de Dunn. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa entre si a 5% de significância. As caixas coloridas representam a distribuição dos dados de porcentagem de inibição para cada composto testado. A linha preta dentro de cada caixa indica a mediana dos dados, enquanto as extremidades da caixa mostram os quartis (valores que delimitam 50% dos dados centrais). As linhas que se estendem a partir das caixas representam a variação dos dados, e os pontos pretos fora dessas linhas são valores atípicos (outliers).

2.3.5 Inibição de biofilme em cateter

Para os ensaios de inibição de biofilme em cateter, foram selecionadas quatro formulações que demonstraram bom desempenho na inibição de biofilme em microplaca para os três isolados testados.

Para avaliar o desempenho das diferentes formulações na inibição do biofilme em cateteres, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para os isolados de *Salmonella sp.*, conforme detalhado no APÊNDICE A. Para o isolado de *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH, cujos dados não apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados indicaram ausência de diferenças significativas entre as formulações na inibição de *Salmonella sp.* (equino) e *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH. Entretanto, para *Salmonella sp.* (suíno), foram observadas diferenças

estatisticamente significativas. Dessa forma, procedeu-se à aplicação do teste de Tukey para comparação de médias, permitindo a identificação da formulação com melhor desempenho.

A inibição da formação de biofilme observada para os isolados de *Salmonella sp.* (equino) e *Pseudomonas aeruginosa* PA-BH foi relativamente baixa quando comparada ao isolado *Salmonella sp.* (suíno). Esse resultado pode ser justificado, em parte, pelas características intrínsecas desses microrganismos.

A Tabela 9 apresenta os percentuais de inibição da formação de biofilme em cateter pelos diferentes isolados bacterianos em resposta aos compostos avaliados. Em relação ao isolado de *Salmonella sp.* (suíno), o composto NPAgRLEB₄₇ demonstrou o maior efeito inibitório, com média de inibição em torno de 60% e baixa dispersão dos dados, o que indica alta reprodutibilidade e consistência nos resultados. Por outro lado, NPAgCVEB₄₇ apresentou maior variabilidade, com valores de inibição variando entre 20% e 50%. O composto NPAgCV exibiu um perfil intermediário, com inibição entre 30% e 40% e presença de um *outlier*, possivelmente associado à variabilidade experimental ou à sensibilidade do isolado à concentração do composto. Os CQDs apresentaram o menor desempenho inibitório, com mediana próxima de 30% e ampla dispersão, indicando baixa eficácia na inibição do biofilme para esse isolado.

Os resultados obtidos corroboram achados prévios da literatura que demonstram o potencial das nanopartículas, em especial as nanopartículas de prata (NPAg), na prevenção da adesão bacteriana e na inibição da formação de biofilmes em superfícies. Estudo conduzido por Riau et al. (2019) evidenciou que a incorporação de NPAg imobilizadas em superfícies poliméricas apresentou efeito anti-biofilme significativo, principalmente frente a patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, tal efeito está relacionado à liberação controlada de íons prata (Ag⁺), capazes de interagir com componentes essenciais da célula bacteriana, promovendo desestabilização da membrana, inibição da replicação celular e consequente destruição da estrutura do biofilme.

O composto NPAgRLEB₄₇ apresentou o maior potencial de aplicação no controle de biofilmes do isolado de *Salmonella sp.* (suíno) em cateter de silicone, especialmente pela sua elevada taxa de inibição associada à baixa variabilidade dos resultados. Os demais compostos

apresentaram desempenho inferior para este isolado, apresentando valores similares de inibição da formação de biofilme pelo outro isolado de *Salmonella*.

Tabela 9 - Inibição de biofilme em cateter

Composto	<i>Salmonella sp. (equino)</i>	<i>Salmonella sp. (suíno)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa PA-BH</i>
NPAgRLEB₄₇	27 (28,5 ± 13,20)	58,5 (56,75 ± 5,44)	0,5 (3,5 ± 6,35)
NPAgCVEB₄₇	34 (28,75 ± 20,27)	34 (28,75 ± 20,27)	0 (0 ± 0)
NPAgCV	31 (26,25 ± 18,55)	37 (36,25 ± 6,18)	0 (0 ± 0)
CQD 1:1	35,5 (35 ± 10,80)	28,5 (28,5 ± 8,58)	0 (0 ± 0)

*Os dados representam a mediana, a média e o desvio-padrão das porcentagens de inibição da formação de biofilme em cateter.

2.3.6 Caracterizações físico-químicas

2.3.6.1 Potencial zeta

Todos os materiais sintetizados apresentaram potencial zeta com valores negativos (Tabela 10). O valor próximo de zero do potencial zeta dos pontos quânticos de carbono (CQD) indica um estado de baixa estabilidade coloidal, o que favorece a agregação das partículas ao longo do tempo. Em sistemas coloidais, é amplamente aceito que potenciais zeta situados entre -30 mV e +30 mV refletem estabilidade limitada, enquanto valores com módulo superior a ±30 mV indicam maior repulsão eletrostática entre as partículas, contribuindo para a manutenção da dispersão coloidal (SANGWAI, 2020).

Os maiores valores (em módulo) foram obtidos com NPAgCV, NPAgCVEB₄₇ e NPAgRL, cujos potenciais zeta ficaram abaixo de -46 mV, indicando maior estabilidade coloidal e, portanto, menor propensão à agregação. Já as formulações NPAgEB₄₇ e NPAgRLEB₄₇ exibiram valores de potencial zeta próximos de -24 mV, o que sugere estabilidade incerta.

Os resultados estão de acordo com estudos recentes que investigam a estabilidade coloidal de nanopartículas de prata em diferentes meios. De acordo com Oliveira (2020), a modificação da superfície das partículas, por meio de funcionalização com surfactantes ou biopolímeros, pode melhorar significativamente a dispersão e aumentar a estabilidade da

suspensão. Além disso, fatores como o ajuste do pH do meio e a presença de eletrólitos influenciam diretamente a distribuição da carga superficial, alterando o potencial zeta e, conseqüentemente, o comportamento coloidal do sistema (GUIMARÃES, 2014).

É importante destacar que, em aplicações de caráter biomédico ou antimicrobiano, a baixa estabilidade coloidal pode comprometer a biodisponibilidade das nanopartículas e sua interação eficiente com microrganismos. Assim, a adoção de estratégias para aumentar a estabilidade do sistema torna-se essencial, como a adição de agentes estabilizantes ou a regulação do pH da solução, garantindo melhor desempenho e segurança em aplicações clínicas e veterinárias.

Tabela 10 - Potencial zeta

Composto	Potencial Zeta (mV)
CQD	-3,987567638
NPAgCV	-51,20495876
NPAgCVEB₄₇	-48,85341702
NPAgRL	-46,3652287
NPAgEB₄₇	-24,3965416
NPAgRLEB₄₇	-24,83516868

2.3.6.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

2.3.6.2.1 Nanopartículas de Prata (NPAg) com diferentes dopagens

A análise comparativa dos espectros de FTIR das diversas formulações de nanopartículas de prata permitiu a elucidação da presença de diversos grupos funcionais e de características químicas dos compostos.

O espectro da formulação NPAgRL evidenciou a presença de bandas características dos ramnolípídeos. Observou-se uma banda larga e intensa na região de 3500-3200 cm⁻¹, atribuível às vibrações de estiramento O-H (hidroxila) (SMITH, 2011). A presença das cadeias alifáticas

dos ácidos graxos constituintes dos ramnolipídeos foi confirmada pelas bandas de estiramento C-H em $\sim 2.920\text{ cm}^{-1}$ (assimétrico) e $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$ (simétrico) (SMITH, 2011; EL-HOUSSEINY et al., 2020). Adicionalmente, a região de $1.600\text{--}1.550\text{ cm}^{-1}$ revelou uma banda proeminente, característica da vibração de estiramento C=O de grupos carboxilato ionizados ($-\text{COO}^-$) (SMITH, 2011). Por fim, múltiplas bandas intensas entre $1.200\text{--}1.000\text{ cm}^{-1}$ são típicas das vibrações de estiramento C-O e C-O-C da porção de ramnose, confirmando inequivocamente a presença da porção glicosídica do ramnolipídeo (SMITH, 2011; EL-HOUSSEINY et al., 2020). A predominância do grupo carboxilato em sua forma ionizada ($-\text{COO}^-$) é um forte indicativo de seu envolvimento na interação com os íons Ag^+ e/ou na estabilização das NPAg por meio de coordenação (SMITH, 2011; BAZYLYAK et al., 2023).

Para a formulação NPAgCV, sintetizada com chá verde, o espectro de FTIR apresentou um perfil distintamente diferente, o que reflete a composição polifenólica do chá verde (RENZETTI et al., 2020; COX et al., 2021). Detectou-se ainda uma banda larga de estiramento O-H entre $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, consistente com a abundância de grupos hidroxila em polifenóis e flavonoides do chá verde (SMITH, 2011; RENZETTI et al., 2020; COX et al., 2021). Em contraste com o espectro da NPAgRL, as bandas de estiramento C-H alifático ($\sim 2.920\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$) mostraram-se muito fracas ou ausentes, corroborando a menor proporção de cadeias alifáticas longas presentes no chá verde (SMITH, 2011). Uma banda em $\sim 1.630\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída a vibrações de estiramento C=O (de carbonilas ou ácidos carboxílicos) e/ou C=C de anéis aromáticos, ambos abundantes nos componentes do chá verde (SMITH, 2011).

A formulação NPAgCVEB₄₇, que combinou chá verde e extrato bruto de lipopeptídeos (EB₄₇), apresentou um espectro híbrido, integrando características de ambos os mediadores. Observou-se a banda larga de estiramento O-H ($3.500\text{--}3.200\text{ cm}^{-1}$) e bandas em $\sim 1.630\text{ cm}^{-1}$ (C=O e/ou C=C aromático) e na região de $1.200\text{--}1.000\text{ cm}^{-1}$ (C-O/C-N), consistentemente com os grupos funcionais esperados de ambos os componentes (SMITH, 2011; COX et al., 2021). Entretanto, as bandas de C-H alifático ($\sim 2.920\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$) permaneceram fracas, similarmente ao perfil da NPAgCV. Este achado sugere que, apesar da inclusão do EB₄₇, a contribuição das porções alifáticas dos lipopeptídeos pode ser menos proeminente na superfície final das nanopartículas, ou que os polifenóis do chá verde continuam dominando o perfil espectral nesta região.

No que tange à NPAgRLEB₄₇, que contém ramnolípídeos e extrato bruto de lipopeptídeos, o espectro revelou um perfil complexo resultante da combinação de ambos os biossurfactantes. As bandas de estiramento O-H ($3.500-3.200\text{ cm}^{-1}$) foram proeminentes, conforme esperado. Em contraste com a NPAgCVEB₄₇, as intensas bandas de estiramento C-H alifáticos ($\sim 2.920\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$) foram notavelmente evidentes, similarmente ao espectro da NPAgRL. Este fato aponta para uma contribuição significativa das porções lipídicas tanto dos ramnolípídeos quanto dos lipopeptídeos do extrato bruto na composição superficial dessas nanopartículas. Bandas em $\sim 1.600-1.550\text{ cm}^{-1}$ (atribuíveis a carboxilatos e/ou amida) e na região de $1.250-1.000\text{ cm}^{-1}$ (C-O/C-N) também foram observadas, sugerindo o envolvimento de grupos carboxila e amida na estabilização das NPAg (SMITH, 2011; COX et al., 2021).

Finalmente, a formulação NPAgEB₄₇, mediada exclusivamente pelo extrato bruto de lipopeptídeos, exibiu um espectro que confirmou a presença dos componentes esperados. A banda larga de O-H ($3.500-3.200\text{ cm}^{-1}$) e as bandas de C-H alifáticos (2.920 cm^{-1} , 2.850 cm^{-1}) foram claramente visíveis, indicando a predominância da porção lipídica. A região de $1.600-1.550\text{ cm}^{-1}$ mostrou bandas sugestivas de carboxilatos ionizados e amida I, enquanto a região de $1.250-1.000\text{ cm}^{-1}$ indicou a presença de grupos C-O e C-N, todos característicos de lipopeptídeos (SMITH, 2011; COX et al., 2021). A forte presença desses grupos funcionais, conhecidos por sua capacidade de interagir com íons metálicos, é uma evidência de que o extrato bruto está associado às nanopartículas (SMITH, 2011; COX et al., 2021). Contudo, é importante correlacionar esses achados com outras caracterizações.

2.3.6.2.2 Pontos Quânticos de Carbono (CQDs)

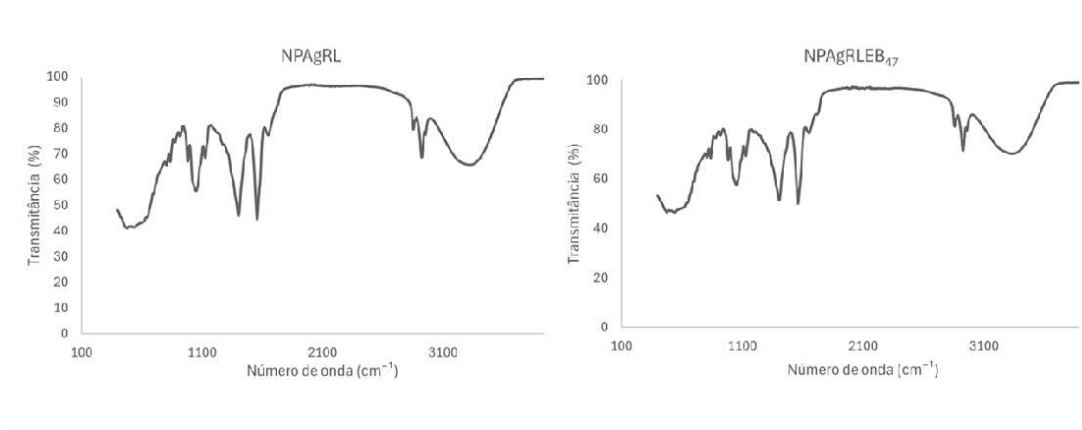
O espectro de FTIR dos CQDs, sintetizados a partir de ácido cítrico e ureia, apresentou uma banda larga e intensa entre $3.500-3.200\text{ cm}^{-1}$, correspondendo às vibrações de estiramento de O-H (de grupos carboxílicos e hidroxilas) e N-H (de aminas e amidas), bem como à água adsorvida (LAI et al., 2020; SMITH, 2011). As bandas de estiramento C-H alifáticos ($\sim 2.920\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2.850\text{ cm}^{-1}$) apresentaram intensidade moderada, indicando que a superfície dos CQDs pode conter alguns grupos alifáticos (LAI et al., 2020; SMITH, 2011).

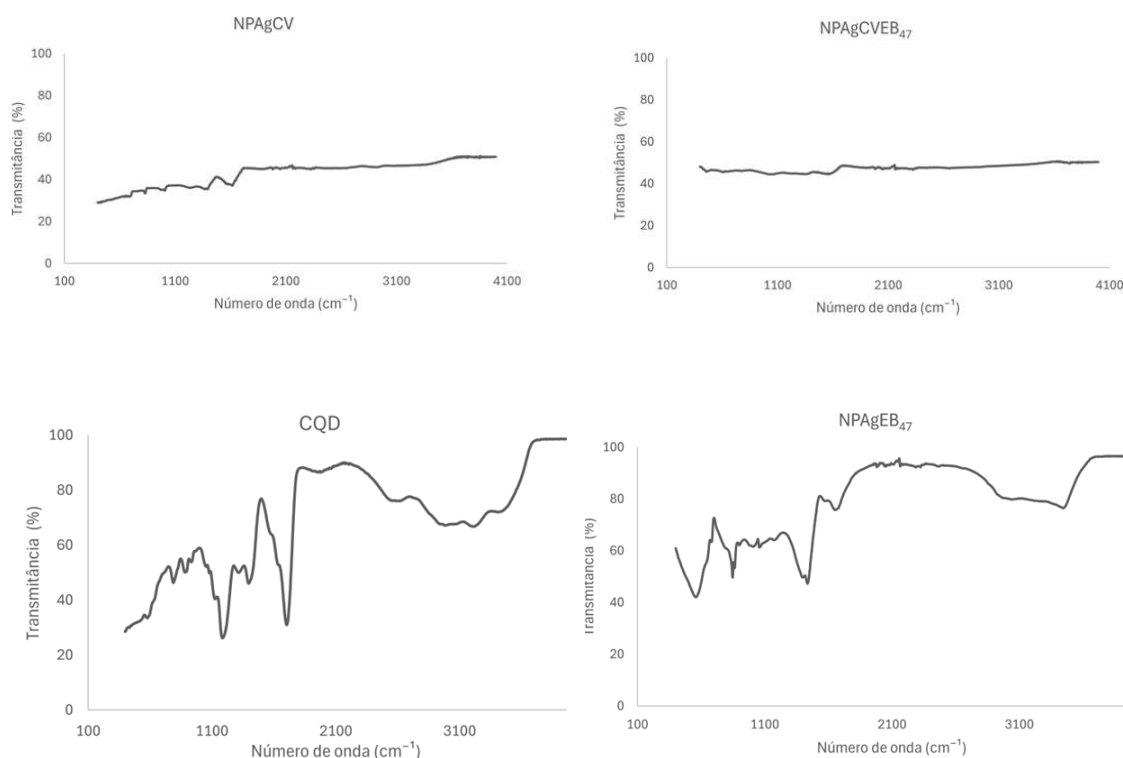
De particular importância, o espectro revelou um pico proeminente em torno de $1.700-1.650\text{ cm}^{-1}$, que pode ser atribuído às vibrações de estiramento C=O, tanto de grupos carboxílicos (derivados do ácido cítrico) quanto da banda amida I (originada da ureia

incorporada) (LAI et al., 2020; SMITH, 2011). A presença de uma banda em $\sim 1.600-1.550\text{ cm}^{-1}$ pode ser associada às vibrações de estiramento C=C do arcabouço aromático dos CQDs e/ou à banda amida II (flexão de N-H e estiramento C-N), confirmando a introdução de nitrogênio na estrutura (LAI et al., 2020; SMITH, 2011). Por fim, as múltiplas e intensas bandas na região de $1.250-1.000\text{ cm}^{-1}$ são características das vibrações de estiramento C-O e C-N, corroborando a rica funcionalização da superfície dos CQDs com grupos oxigenados e nitrogenados (LAI et al., 2020; SMITH, 2011). Tais grupos funcionais são cruciais para a hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e, conseqüentemente, para muitas das aplicações dos CQDs.

Em conclusão, a espectroscopia FTIR confirmou a presença dos grupos funcionais esperados nas superfícies das NPAg e CQDs, além de indicar o papel do chá verde e dos biossurfactantes na estabilização dessas nanopartículas. Os perfis espectrais obtidos reforçam a incorporação desses compostos e evidenciam a funcionalização característica dos CQDs, fornecendo uma base estrutural sólida para a correlação com suas propriedades antimicrobianas e aplicações potenciais.

Figura 8 - Espectros de FTIR das formulações de nanopartículas de prata com diferentes dopagens e dos Pontos Quânticos de Carbono





A figura apresenta os espectros de FTIR dos seguintes compostos: Nanopartículas de prata dopadas com ramnolipídeo (NPAgRL); Nanopartículas de prata dopadas com ramnolipídeos e extrato bruto de lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* TR47II (NPAgRLEB₄₇); Nanopartícula de prata com síntese mediada por chá verde (NPAgCV); Nanopartículas de prata mediada por chá verde e associada a extrato bruto de lipopeptídeo (NPAgCVEB₄₇); Ponto Quântico de Carbono (CQD); Nanopartículas de prata dopadas com extrato bruto de lipopeptídeos produzidos por *B. velezensis* TR47II (NPAgEB₄₇).

2.3.6.3 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

2.3.6.3.1 Nanopartículas de Prata (NPAg) com diferentes dopagens

Para as NPAg, a detecção de um pico de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) na região visível (tipicamente entre 400 e 450 nm) é o principal indicador de sua formação. Esse pico, intrinsecamente ligado ao tamanho, forma e estado de agregação das nanopartículas, foi o foco da análise dos espectros de absorbância UV-Vis das diversas formulações de NPAg desenvolvidas neste estudo.

O espectro da formulação NPAgCV, sintetizada com chá verde, revelou um pico de LSPR intenso e bem definido, centrado em aproximadamente 395-400 nm, com uma absorbância máxima de cerca de 0,8. A estreita largura da banda e a alta intensidade do pico

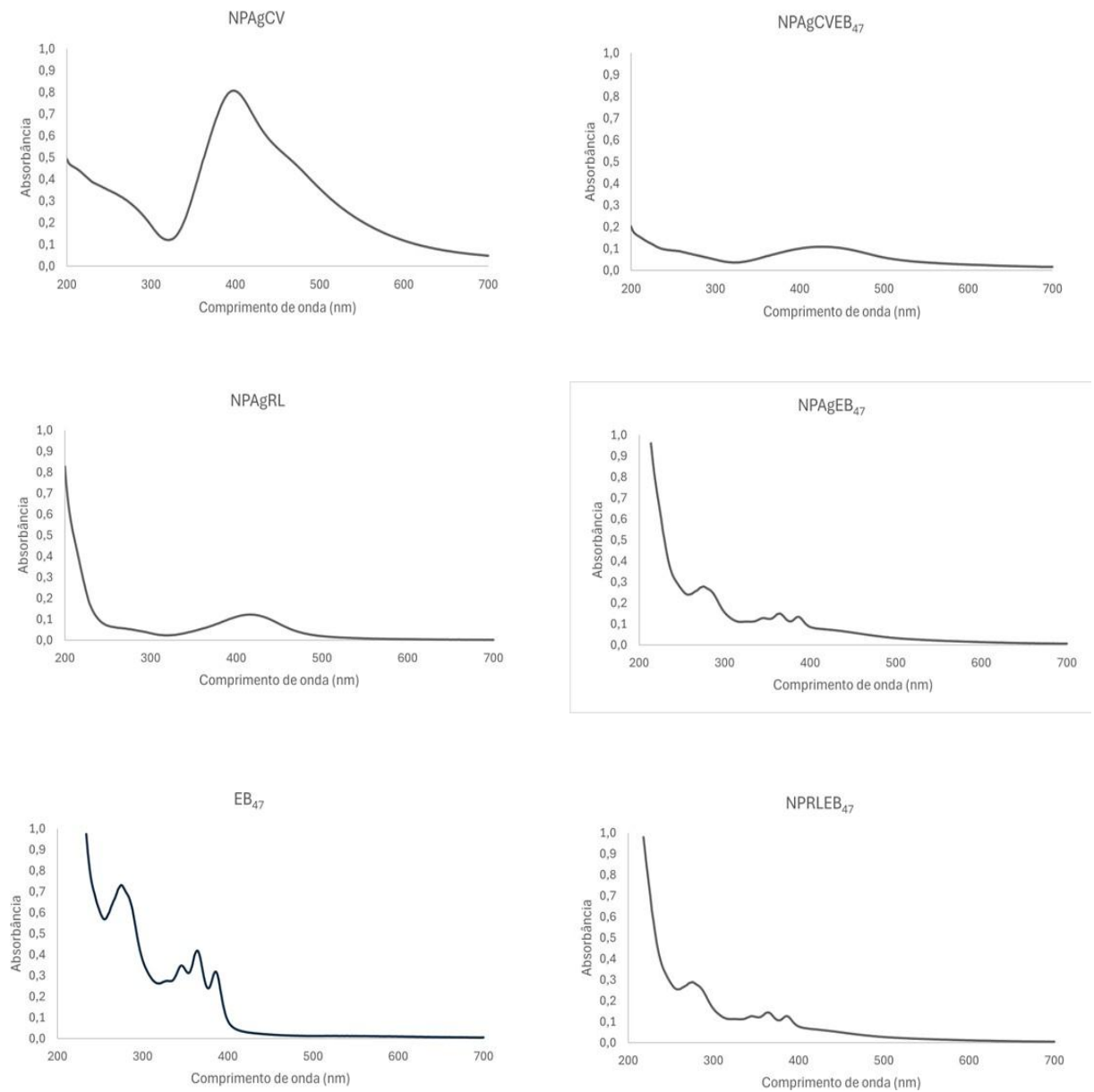
corroboram a literatura, que reconhece os polifenóis e flavonoides do chá verde como excelentes agentes redutores e estabilizantes, capazes de facilitar a nucleação e controlar o crescimento das nanopartículas (GHAFFARI-MOGHADDAM et al., 2014; VANAJA et al., 2013). A absorvância observada na região UV abaixo de 300 nm, por sua vez, é atribuída aos cromóforos orgânicos do chá verde.

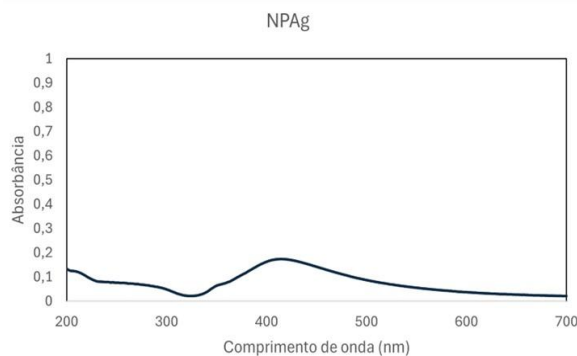
Ainda no contexto das NP_{Ag}, a formulação NP_{Ag}RL, que empregou ramnolípídeos, apresentou um pico de LSPR discernível em aproximadamente 415-420 nm. Embora a presença do pico confirme a formação de NP_{Ag}, a menor intensidade pode indicar uma eficiência de síntese reduzida ou uma menor concentração de nanopartículas. Adicionalmente, o deslocamento do λ max para comprimentos de onda maiores, em comparação com a NP_{Ag}CV, sugere que as NP_{Ag} mediadas por ramnolípídeos podem ter um tamanho médio ligeiramente superior (GHAFFARI-MOGHADDAM et al., 2014; VANAJA et al., 2013). Embora os ramnolípídeos, como biossurfactantes, possuam grupos hidroxila e carboxila que lhes permitem atuar como agentes redutores e estabilizantes, sua eficácia pode ser inferior à dos polifenóis do chá verde ou exigir uma otimização específica das condições de síntese para gerar partículas com propriedades comparáveis.

A análise da formulação NP_{Ag}CV_{EB₄₇}, que combinou chá verde e extrato bruto de lipopeptídeos (EB₄₇), revelou um pico de LSPR em aproximadamente 420-430 nm. Sua intensidade (cerca de 0,1 de absorvância) foi bem inferior ao da NP_{Ag}CV, mas comparável à da NP_{Ag}RL. O deslocamento do λ max para o vermelho, em relação à NP_{Ag}CV, aponta para uma influência do EB₄₇, possivelmente resultando em partículas de maior tamanho médio. A redução da intensidade do pico sugere uma possível diminuição na eficiência ou estabilidade das NP_{Ag} na presença do EB₄₇. Isso pode ser atribuído a interações competitivas entre os componentes do chá verde e do EB₄₇ pelos sítios de redução ou estabilização dos íons Ag⁺.

Por fim, as formulações NP_{Ag}EB₄₇ e NP_{Ag}RLEB₄₇ não apresentaram picos de LSPR característicos na região esperada para as NP_{Ag}. Seus espectros foram, em vez disso, dominados por picos na região UV (especialmente em 270-280 nm) e ombros menores entre 320-380 nm. O espectro de EB₄₇ isolado confirmou que esses picos de absorção na região UV e UV-Vis são intrínsecas ao próprio extrato bruto de lipopeptídeos, sendo atribuíveis a proteínas, peptídeos e outros compostos orgânicos presentes no material.

Figura 9 - Espectros de absorbância UV-Vis das nanopartículas de prata





2.3.6.3.2 Pontos Quânticos de Carbono (CQDs)

A espectroscopia UV-Vis também desempenhou um papel crucial na caracterização dos Pontos Quânticos de Carbono (CQDs) sintetizados a partir de ácido cítrico e ureia. Os CQDs, como nanomateriais de carbono, são conhecidos por suas propriedades ópticas singulares, incluindo padrões de absorvância específicos na região UV e UV-Vis, frequentemente associados a transições eletrônicas intrínsecas à sua estrutura.

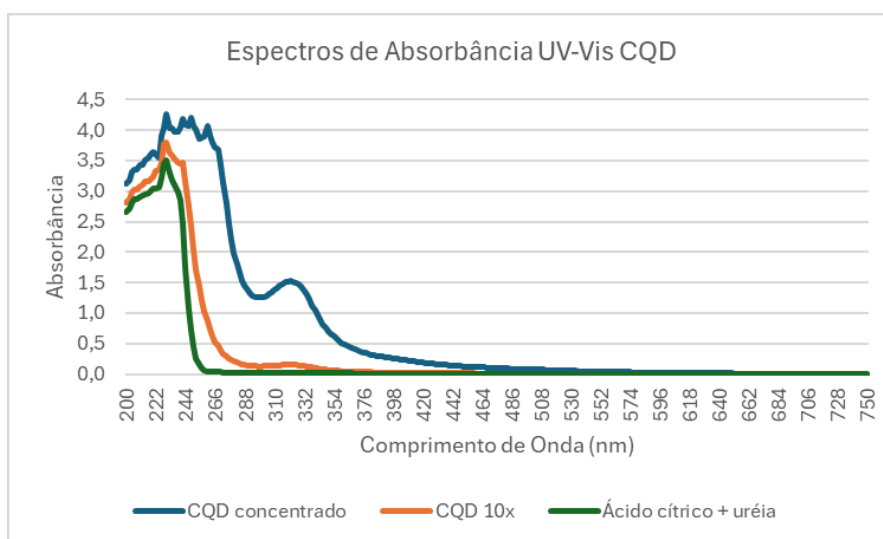
O gráfico de absorvância UV-Vis das amostras de CQD apresentou perfis distintos que validam a formação bem-sucedida desses nanomateriais. A amostra de "CQD concentrado" exibiu uma forte absorvância na região UV, com um pico proeminente centrado em aproximadamente 260-270 nm. Esta absorção é tipicamente atribuída a transições $\pi-\pi^*$ de domínios sp^2 presentes no arcabouço de carbono dos CQDs (OZYURT et al., 2023). Adicionalmente, um pico largo e característico foi observado em aproximadamente 330-340 nm. Este segundo pico é amplamente reconhecido como uma assinatura espectroscópica dos CQDs, frequentemente relacionado a transições $n-\pi^*$ de grupos funcionais contendo heteroátomos, como C=O e C-N, que são incorporados na superfície do CQD durante o processo de síntese a partir do ácido cítrico e ureia (OZYURT et al., 2023; LI et al., 2012).

A amostra "CQD 10x" demonstrou um espectro análogo ao do "CQD concentrado", porém com intensidades de absorvância aproximadamente dez vezes menores, confirmando a relação de diluição e a aderência à Lei de Beer-Lambert para esses nanomateriais. É relevante

notar que, embora a amostra dos precursores (ácido cítrico e ureia) apresentasse alguma absorvância na região de 230-270 nm (com um pico mais nítido em ~230-240 nm), sua absorvância foi mínima ou nula na região de 300-400 nm. Isso reforça que o pico característico em 330-340 nm é intrínseco aos CQDs formados e não meramente um remanescente dos reagentes de partida. A absorvância que se estende para a região do visível (uma "cauda" longa após 400 nm) é uma característica comum dos CQDs e pode estar associada às suas propriedades de fluorescência e à distribuição de tamanhos (OZYURT et al., 2023; LI et al., 2012).

Em suma, os dados de espectroscopia UV-Vis fornecem evidências robustas da formação e das propriedades ópticas tanto das diferentes formulações de NPAg quanto dos CQDs. Os resultados obtidos ressaltam a importância da seleção e otimização dos agentes mediadores para a síntese de nanomateriais com características desejadas, e demonstram a eficácia da espectroscopia UV-Vis como ferramenta para o monitoramento dessas propriedades.

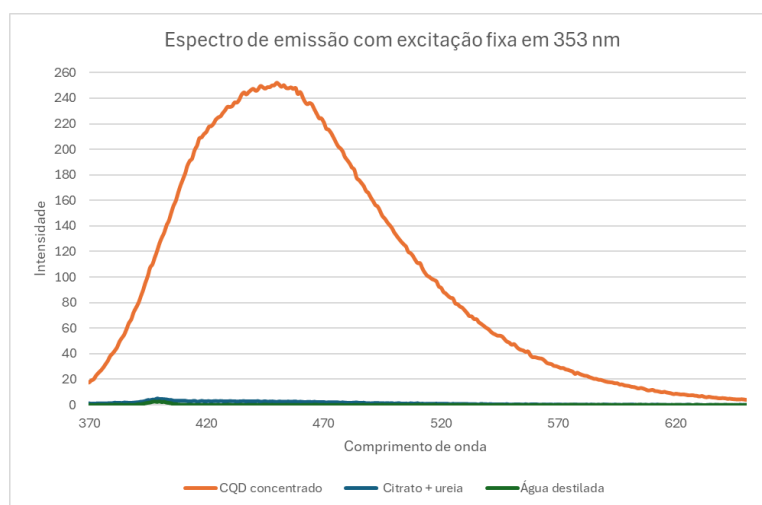
Figura 10 - Espectros de absorvância UV-Vis CQD



Análise de fluorescência

A análise espectral demonstrou que os pontos quânticos de carbono (CQDs) sintetizados apresentaram fluorescência significativa sob excitação a 353 nm, com emissão máxima em torno de 450 nm. Esse perfil é característico de CQDs com emissão na região do azul, frequentemente associado à presença de grupos funcionais oxigenados e à conjugação $\pi-\pi^*$ em estruturas gráficas (DA SILVA et al., 2023). Os controles (citrato + ureia e água destilada) não exibiram picos relevantes de emissão ao longo do espectro avaliado (370–650 nm) (DA SILVA et al., 2023). Esse resultado corrobora que a fluorescência observada está diretamente relacionada à formação dos CQDs durante a síntese, descartando interferência dos precursores ou do meio reacional. A alta intensidade de emissão e a ausência de fluorescência nos controles evidenciam o sucesso do processo de síntese. Estudos adicionais, como análise de tempo de vida de fluorescência e dependência da emissão com o pH ou a polaridade do meio, poderão aprofundar a compreensão das propriedades fotofísicas dos CQDs obtidos.

Figura 11 - Espectro de emissão com excitação fixa em 353 nm



Espectros de emissão de pontos quânticos de carbono (CQD) sob diferentes comprimentos de onda de emissão, variando de 370 nm a 650 nm.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As infecções associadas ao uso de dispositivos médicos, como cateteres e sondas, representam um desafio significativo na medicina humana e veterinária, especialmente frente ao aumento da resistência antimicrobiana e à formação de biofilmes. Neste contexto, a busca por novas estratégias de controle microbiano se faz urgente e indispensável.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial de diferentes formulações - como nanopartículas de prata, pontos quânticos de carbono (CQDs), lipopeptídeos e ramnolipídeos - na inibição do crescimento de bactérias patogênicas e na redução da formação de biofilmes. As análises revelaram que os lipopeptídeos extraídos das linhagens *Bacillus velezensis* TR47II e TR59II foram eficazes contra *Pseudomonas aeruginosa* isolada de sepse humana e *Escherichia coli* isolada de peritonite bovina, indicando seu alto potencial como agentes antimicrobianos naturais. Os CQDs também apresentaram efeito inibitório dependente da concentração, inibindo o crescimento de diversos patógenos testados. De forma semelhante, as combinações de nanopartículas de prata, bem como os lipopeptídeos purificados, mostraram-se promissoras na inibição de biofilmes formados por *P. aeruginosa* e *Salmonella sp.*

No ensaio com cateteres, o composto NPAgRLEB₄₇ se destacou, com 58,5% de inibição da formação de biofilme de *Salmonella sp.* (suíno), demonstrando a aplicabilidade desses nanocompósitos no revestimento de dispositivos médicos. No entanto, estudos mais aprofundados sobre a adesão dos compostos à superfície do cateter, especialmente quanto à sua estabilidade, fixação e liberação controlada, são ainda necessários. Além disso, destaca-se a importância de uma caracterização físico-química mais detalhada e ensaios de biocompatibilidade.

A integração entre nanotecnologia e biossurfactantes se apresenta como uma estratégia promissora e inovadora para o enfrentamento da resistência antimicrobiana, com potencial de aplicação na prevenção de infecções relacionadas a dispositivos médicos, promovendo maior segurança em ambientes clínicos e veterinários.

A próxima etapa deste trabalho será investir na funcionalização e no revestimento de dispositivos médicos com os compostos mais promissores identificados, sobretudo os nanocompósitos contendo lipopeptídeos e nanopartículas de prata. O foco principal será a avaliação da adesão e da liberação sustentada desses compostos bioativos na superfície dos

cateteres, além da realização de ensaios de toxicidade e biocompatibilidade em culturas celulares, visando garantir a segurança desses materiais para aplicação clínica.

Com base nos resultados obtidos e nas lacunas identificadas, uma pergunta relevante a ser explorada em estudos futuros é: quais os mecanismos moleculares envolvidos na inibição da formação de biofilmes bacterianos por lipopeptídeos e nanomateriais, e como esses mecanismos variam entre cepas Gram-positivas e Gram-negativas? Para responder a essa questão, propõe-se o uso de técnicas como microscopia confocal para análise tridimensional de biofilmes, transcriptômica (RNA-seq) para avaliação da expressão gênica diferencial, ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos e estudos de liberação controlada simulando condições clínicas. Essas abordagens permitirão aprofundar a compreensão sobre os mecanismos de ação e a aplicabilidade dos compostos estudados, contribuindo para o avanço de soluções antimicrobianas inovadoras e seguras, tanto na medicina veterinária quanto na humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSIC, Ivana et al. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2454, 2017.

ALEKSANDROWICZ, Adrianna et al. Better together—Salmonella biofilm-associated antibiotic resistance. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, p. 2229937, 2023.

ALMEIDA, Michelle Fernandes. **Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada Bacillus subtilis LBBMA RI4914 IsrfA utilizando glicerol como fonte de carbono**. 2022. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022.

BAZYLYAK, L. I. et al. Silver nanoparticles produced via a green synthesis using the rhamnolipid as a reducing agent and stabilizer. **Applied Nanoscience**, v. 13, n. 7, p. 5251-5263, 2023.

BERGAMO, Greici et al. Formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, p. e-48029, 2020.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BRCast. *Documentos do Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos – Tabelas de pontos de corte e interpretação de CIM e diâmetro de halos*. 6ª ed. São Paulo: BRCast, 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br/>. Acesso em: 8 fev. 2025.

CHEN, Haiyan et al. Preparation and characterisation of bifunctional surface-modified silicone catheter in lumen. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 46-54, 2020.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 33rd ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.

COX, Harrison J.; SHARPLES, Gary J.; BADIYAL, Jas Pal S. Tea–Essential Oil–Metal Hybrid Nanocoatings for Bacterial and Viral Inactivation. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 11, p. 12619-12628, 2021.

DA SILVA, Livia E. et al. Carbon dots-based fluorescent films to act as a potential antioxidant agent and pH ratiometric sensor for skin applications. **Frontiers in Carbon**, v. 2, p. 1300811, 2023.

DA SILVEIRA GUIMARÃES, Bruna et al. Síntese de nanopartícula via química verde e caracterização por potencial zeta. **BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 1, p. 72-79, 2014.

DE OLIVEIRA SILVA, Bruna Santiago; SEABRA, Amedea Barozzi. Characterization of iron nanoparticles produced with green tea extract: a promising material for nitric oxide delivery. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 6, n. 3, 2016.

DIZAJ, Solmaz Maleki et al. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 1, p. 19, 2015.

EL-HOUSSEINY, Ghadir S. et al. Structural and Physicochemical Characterization of Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* P6. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 201, 2020.

FERREIRA, Nicolly Soares et al. Bacteriologia clínica: antibiograma na medicina veterinária. **TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL XII**, p. 127, 2023.

FREIRE, Naiana B. et al. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 244-249, 2018.

GAKIYA-TERUYA, Miguel; PALOMINO-MARCELO, Luis; RODRIGUEZ-REYES, Juan Carlos F. Synthesis of highly concentrated suspensions of silver nanoparticles by two versions of the chemical reduction method. **Methods and protocols**, v. 2, n. 1, p. 3, 2018.

GAO, Xiang et al. Carbon quantum dots modified Ag₂S/CS nanocomposite as effective antibacterial agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 220, p. 111456, 2021.

GHAFFARI-MOGHADDAM, Mansour et al. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 548-557, 2014.

GUAN, Ruqun et al. Microspherical nitrogen-doped carbon nanotube assembly derived from Pickering droplets. **Carbon**, v. 148, p. 124-133, 2019.

HUNTER, Robert J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. Academic press, 2013.

KHALID, Hafiza Faiza et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. **Journal of hazardous materials**, v. 364, p. 441-448, 2019.

KOUL, Khyati et al. Quantum dots: a next generation approach for pathogenic microbial biofilm inhibition; mechanistic insights, existing challenges, and future potential. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 4, p. 158, 2024.

LAI, Xuefei et al. Hydrothermal synthesis and characterization of nitrogen-doped fluorescent carbon quantum dots from citric acid and urea. **Ferroelectrics**, v. 566, n. 1, p. 116-123, 2020.

LEMIRE, J. et al. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 798-809, 2017.

LI, Haitao et al. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications. **Journal of materials chemistry**, v. 22, n. 46, p. 24230-24253, 2012.

LIU, Wei; SPERANZA, Giorgio. Functionalization of carbon nanomaterials for biomedical applications. **C**, v. 5, n. 4, p. 72, 2019.

LI, Yu-Jia et al. Synthesis of self-assembled spermidine-carbon quantum dots effective against multidrug-resistant bacteria. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 19, p. 2545-2554, 2016.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, p. 670-673, 2004.

MACHADO, Claudia Emanuele et al. Pontos quânticos de carbono: Síntese química, propriedades e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306-1346, 2015.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 39, 2017.

OZYURT, Derya et al. Properties, synthesis, and applications of carbon dots: A review. **Carbon Trends**, v. 12, p. 100276, 2023.

OLIVEIRA, Lucas Paulo Ribeiro de. Síntese de nanopartículas de prata utilizando plasma e diferentes agentes estabilizadores. 2020.

PARMANIK, Ankita et al. Current treatment strategies against multidrug-resistant bacteria: a review. **Current microbiology**, v. 79, n. 12, p. 388, 2022.

PEREIRA, Lígia Beatriz Rizzanti. **Uso de MALDI-TOF MS para tipagem de Streptococcus agalactiae isolados de mastite bovina e bubalina**. 2024. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RIAU, Andri K. et al. Surface immobilization of nano-silver on polymeric medical devices to prevent bacterial biofilm formation. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 93, 2019.

ROLIM, Wallace R. et al. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 463, p. 66-74, 2019.

ROWLANDS, Ruth Estela Gravato et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in Salmonella spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 461-467, 2014.

RENZETTI, Andrea et al. Antibacterial green tea catechins from a molecular perspective: Mechanisms of action and structure–activity relationships. **Food & function**, v. 11, n. 11, p. 9370-9396, 2020.

SANGWAI, Jitendra S. **Nanotechnology for energy and environmental engineering**. Springer, 2020.

SILVA, JMB da; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363-369, 2010.

SILVA, Rafael Almeida da et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em debate**, v. 44, p. 607-623, 2020.

SMITH, Brian C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. CRC press, 2011.

SREELAKSHMI, K. P. et al. Microbial lipopeptides: their pharmaceutical and biotechnological potential, applications, and way forward. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 135, 2024.

TRIPATHI, Neetu; GOSHISHT, Manoj Kumar. Recent advances and mechanistic insights into antibacterial activity, antibiofilm activity, and cytotoxicity of silver nanoparticles. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 4, p. 1391-1463, 2022.

ULSENHEIMER, Bruna Carolina et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Streptococcus uberis* isoladas de mastite bovina na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22549-22557, 2021.

VANAJA, Mahendran; ANNADURAI, Gurusamy. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. **Applied nanoscience**, v. 3, n. 3, p. 217-223, 2013.

VATER, Joachim et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

YAN, Fanyong et al. Surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review. **Microchimica Acta**, v. 185, p. 1-34, 2018.

YU, Fan et al. Efficient preparation of extremely high-purity surfactin from fermentation broth by ethanol extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 304, p. 122278, 2023.

APÊNDICE A - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela A.1 - Inibição do crescimento de microrganismos utilizando a formulação com lipopeptídeos de *B. velezensis* TR47II

Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Salmonella sp. (suíno)</i>	<i>Salmonella sp. (cavalo)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
37	15,5 (16,5 \pm 15,59) a	34,5 (27 \pm 18,35) a	0 (0 \pm 0) b	0 (3,25 \pm 6,5) a	0 (0 \pm 0) b
60	0 (7,5 \pm 15) a	20,5 (18,75 \pm 15) a	0 (0 \pm 0) b	0 (0 \pm 0) a	0 (0 \pm 0) b
95	0 (5,5 \pm 11) a	12,5 (14,25 \pm 15,76) a	20,5 (19,75 \pm 16,70) a	6 (6,25 \pm 7,23) a	0 (0 \pm 0) b
153	0 (5,25 \pm 10,5) a	5,5 (8,75 \pm 11,41) a	21,5 (23,5 \pm 10,66) a	5,5 (5,5 \pm 6,35) a	0 (1,5 \pm 3) b
244	0 (0 \pm 0) a	5,5 (7,75 \pm 9,67) a	26 (26 \pm 17,98) a	5 (6,75 \pm 8,30) a	18,5 (22,75 \pm 24,46) a
391	0 (0 \pm 0) a	1 (3,25 \pm 5,25) a	27,5 (26,75 \pm 21,56) a	3 (4,75 \pm 6,18) a	0 (7,25 \pm 14,5) b
625	0 (2,25 \pm 4,5) a	0 (0 \pm 0) a	18 (19,25 \pm 17,75) ab	0 (1,25 \pm 2,5) a	0 (0 \pm 0) b
1000	0 (0 \pm 0) a	0 (0 \pm 0) a	0 (3,25 \pm 6,5) b	0 (0 \pm 0) a	0 (0 \pm 0) b

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados. Os resultados indicaram que os dados não seguem uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de Dunn para comparação das médias. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não possuem diferença significativa a 5% de significância.

Tabela A.2 - Inibição do crescimento de microrganismos utilizando a formulação com lipopeptídeos de *B. velezensis* TR47II

Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli (caprino)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa PA-BH</i>	<i>Escherichia coli (bovino)</i>
37	16,5 (19 \pm 22,32) a	13,5 (16,25 \pm 15,88) a	2 (2,5 \pm 2,65) b	86 (86,25 \pm 1,26) a
60	0 (25 \pm 50) a	25,5 (23,25 \pm 17,37) a	38 (39,5 \pm 31,14) ab	83 (82,75 \pm 1,5) a
95	0 (10,75 \pm 21,5) a	32 (26 \pm 17,74) a	78 (67 \pm 41,46) a	87 (86 \pm 5,10) a

153	0 (9,75 ± 19,5) a	33 (26,5 ± 16,52) a	90,5 (75 ± 38,39) a	92 (89,5 ± 7,54) a
244	5,5 (11,5 ± 16,50) a	4 (12,5 ± 20,02) a	88,5 (76,5 ± 33,47) a	90 (89,25 ± 6,65) a
391	0 (4,25 ± 8,5) a	0 (6,5 ± 13) a	81 (72,5 ± 31,26) a	91,5 (90,25 ± 6,95) a
625	0 (10,75 ± 21,5) a	2,5 (4,75 ± 6,60) a	70 (64 ± 17,47) a	86 (85,75 ± 7,93) a
1000	53,5 (53,5 ± 53,69) a	0 (0 ± 0) a	45 (36 ± 25,46) ab	76,5 (72,25 ± 13,5) a

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados. Os resultados indicaram que os dados não seguem uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de Dunn para comparação das médias. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não possuem diferença significativa a 5% de significância.

Tabela A.3 - Inibição do crescimento de microrganismos utilizando a formulação com lipopeptídeos de *B. velezensis* TR59II

Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Salmonella sp. (suíno)</i>	<i>Salmonella sp. (cavalo)</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
37	0 (0 ± 0) a	37 (37 ± 2,58) a	0 (0 ± 0) b	0 (0 ± 0) b	0 (0 ± 0) b
60	0 (4,25 ± 8,5) a	32,5 (33,5 ± 6,56) ab	8 (8 ± 6,38) b	13,5 (13,5 ± 4,51) ab	0 (0 ± 0) b
95	0 (8,5 ± 17) a	29 (28,5 ± 3,70) ab	33,5 (35,75 ± 8,58) b	17,5 (18,75 ± 4,35) ab	0 (0 ± 0) b
153	15 (24,5 ± 30,95) a	26,5 (27 ± 1,41) ab	59,5 (53,75 ± 14,71) a	26 (33 ± 18,97) a	31,5 (32,75 ± 3,77) ab
244	24,5 (24,5 ± 28,29) a	18 (17,5 ± 6,24) ab	59 (59,25 ± 2,06) a	42 (41,75 ± 23,53) a	56,5 (56,25 ± 5,06) a
391	7,5 (14,75 ± 20,74) a	0 (0 ± 0) b	61,5 (60,5 ± 3,87) a	35,5 (36,5 ± 26,24) ab	49 (48,75 ± 22,28) ab
625	3,5 (4 ± 4,69) a	0 (0 ± 0) b	51,5 (51,5 ± 9,40) a	21 (27,25 ± 25,45) ab	20,5 (17,25 ± 12,37) ab
1000	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	33 (35,25 ± 10,56) b	1 (2,5 ± 3,79) ab	0 (0 ± 0) b

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados. Os resultados indicaram que os dados não seguem uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de Dunn para comparação das médias. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não possuem diferença significativa a 5% de significância.

Tabela A.4 - Inibição do crescimento de microrganismos utilizando a formulação com lipopeptídeos de *B. velezensis* TR59II

Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli (caprino)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa PA-BH</i>	<i>Escherichia coli (bovino)</i>
37	49 (49,5 ± 57,16) a	67 (58,5 ± 49,03) a	26 (24,75 ± 20,90) ab	41 (40,5 ± 29) b

60	0 (25 ± 50) a	0 (1,25 ± 2,5) b	96,5 (96,25 ± 4,35) ab	74 (74 ± 6,22) ab
95	0 (0 ± 0) a	0 (1,5 ± 3) b	100 (100 ± 0) a	77 (77,5 ± 5,26) ab
153	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	100 (100 ± 0) a	89,5 (87,75 ± 4,72) ab
244	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	100 (100 ± 0) a	94,5 (93 ± 3,37) ab
391	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	100 (100 ± 0) a	94,5 (94,75 ± 1,71) ab
625	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	73 (72,75 ± 4,03) ab	94,5 (95 ± 1,41) a
1000	0 (0 ± 0) a	0 (0 ± 0) b	0 (9,75 ± 19,5) b	96,5 (95 ± 5,60) a

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição dos dados. Os resultados indicaram que os dados não seguem uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, seguido do teste de Dunn para comparação das médias. Os tratamentos seguidos pela mesma letra não possuem diferença significativa a 5% de significância.

Tabela A.5 - Inibição de biofilme em cateter (ANOVA para o isolado SS)

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	P-valor
Fatores (F)	3	2119	706,2	5,114	0,0165*
Resíduos	12	1657	138,1	-	-

Níveis de significância: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabela A.6 - teste Tukey para SS

F	Média SS	DP	Grupo
1	56,75	5,44	a
3	36,25	6,18	ab
2	28,75	20,3	b
4	28,50	8,58	b

Tratamentos com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).