

COLÉGIO MILITAR DO RECIFE

**MicroZEIN: Avaliação de nanopartículas de zeína com ácido úsnico
frente a *Escherichia coli* indutora de câncer colorretal**

Recife, PE

2025



João Gabriel Dutra de Barros Brito
Breno Alves Chagas Rabelo
João Pedro Fonseca das Neves Braga

Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Dra. Maria Goretti Cabral de Lima

**MicroZEIN: Avaliação de nanopartículas de zeína com ácido úsnico
frente a *Escherichia coli* indutora de câncer colorretal**

Relatório apresentado à 9ª FEMIC - Feira
Mineira de Iniciação Científica.

Orientação da Prof. Dra. Maria Goretti Cabral
de Lima e coorientação da Prof. Dra. Isabella
Macário Ferro Cavalcanti.

Recife, PE

2025



RESUMO

Escherichia coli, bactéria Gram-negativa e patogênica, apresenta importantes fatores de virulência associados ao câncer colorretal (CCR), como por exemplo, a produção de genotoxinas, em especial a colibactina, uma toxina instável e capaz de induzir danos citogenéticos. Globalmente, o CCR é a neoplasia mais frequente do trato gastrointestinal, responsável por mais de 1,85 milhão de casos e 850 mil mortes por ano, e a infecção microbiana é reconhecida como fator de risco em cerca de 20% dos tumores em humanos. Nesse contexto, o ácido úsnico (AU), um metabólito natural extraído de líquenes e amplamente utilizado na medicina tradicional, surge como alternativa terapêutica promissora, embora seu uso seja limitado pela baixa solubilidade em água e pela hepatotoxicidade. Para superar essas limitações, este estudo propôs a nanoencapsulação do AU em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (AU-ZNP-CH) e avaliou sua atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas de *E. coli* carcinogênicas. As AU-ZNP-CH apresentaram tamanho médio de $332 \pm 0,7$ nm, PDI 0,23 e potencial zeta de $+51,1 \pm 1,0$ mV. Os testes antimicrobianos da concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) demonstraram CIM de 7,81–15,62 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 15,62–31,25 $\mu\text{g/mL}$. Das quatro cepas de *E. coli* testadas, três apresentaram perfil moderado para a produção de biofilme, enquanto que apenas uma apresentou perfil forte. Para os testes de inibição (CIMB) e erradicação (CEMB), as AU-ZNP-CH apresentaram CIMB de 7,81–250 $\mu\text{g/mL}$ e CEMB de 7,81 $\mu\text{g/mL}$. Assim, os resultados evidenciam que as AU-ZNP-CH possuem caracterização estável e expressiva atividade antibacteriana e antibiofilme, configurando uma estratégia inovadora, sustentável e eficaz contra cepas de *E. coli* associadas à indução do CCR.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, Terapia antimicrobiana, Nanocarreador.



SUMÁRIO

RESUMO.....	3
SUMÁRIO.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Objetivo Geral.....	10
3.2. Objetivos Específicos.....	10
4. METODOLOGIA.....	11
4.1. Preparação e caracterização das nanopartículas.....	11
4.2. Avaliação da atividade antibacteriana.....	11
4.3. Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos.....	12
4.4. Avaliação da inibição da formação do biofilme.....	12
4.5. Avaliação da erradicação do biofilme.....	12
5. RESULTADOS OBTIDOS.....	13
5.1. Caracterização das nanopartículas.....	13
5.2. Avaliação da atividade antibacteriana.....	14
5.3. Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos.....	16
5.4. Avaliação da inibição e erradicação da formação do biofilme.....	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
REFERÊNCIAS.....	22



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécime de *Usnea barbata*, conhecida popularmente como “barba de velho” (Popovici *et al.*, 2023), molécula e formulação em pó do ácido úsnico.

Fonte: Autores, 2025..... 7

Figura 2 - Espécime de *Zea mays* L. (milho), grão de milho, molécula e formulação em pó da zeína. Fonte: Autores, 2025..... 8

Figura 3 - Principais fontes para extração de quitina e quitosana, molécula de quitosana e formulação em pó de quitina e quitosana. Fonte: Adaptado de Isa *et al.*, 2024. 8

Figura 4 - Soluções preparadas de zeína com ácido úsnico antes da adição do antissolvente (A) e remoção do solvente orgânico em evaporador rotativo (B). Fonte: Autores, 2025..... 11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da caracterização físico-química quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta da AU-ZNP-CH..... 13

Tabela 2 - Atividade antibacteriana de AU e AU-ZNP-CH. 15

Tabela 3 - Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos. 17

Tabela 4 - Atividade antibiofilme de ácido úsnico livre e encapsulado..... 18



1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli, bactéria gram-negativa pertencente à ordem das Enterobacterales, é encontrada naturalmente no trato gastrointestinal de seres humanos. Apesar disso, essa espécie pode se tornar patogênica, desencadeando diversas doenças, como infecções gastrointestinais, do trato urinário, infecção abdominal, pneumonia, bacteremia e meningite, entre outras (Feng *et al.*, 2011; Almugadam *et al.*, 2018). A variedade de cepas de *E. coli* está associada a um conjunto específico de fatores de virulência que podem contribuir para o desenvolvimento de processos infecciosos, estimulando a inflamação e causando lesões no hospedeiro, nesse caso, o ser humano (Farrokl *et al.*, 2013). Estudos recentes têm sugerido uma associação entre certas cepas de *E. coli* e lesões tumorais, sugerindo que algumas delas podem ter um efeito pró-oncogênico devido à produção de toxinas específicas (Hernández-Luna *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019).

Um dos fatores de virulência da *E. coli* é a produção de uma genotoxina, a colibactina, que tem por função desempenhar um efeito carcinogênico nas células epiteliais do cólon. Essa substância danifica a estrutura do DNA, causando quebras na dupla fita e instabilidade cromossômica, consequentemente a um aumento dos níveis de quimiocinas, atraindo as células do sistema fagocitário mononuclear para eliminar bactérias. Esse processo induz estresse oxidativo, fragmentação do DNA e liberação de mediadores inflamatórios, promovendo a proliferação celular e aumentando as chances de desenvolvimento de tumores (Bakthavatchalu *et al.*, 2018; Fais *et al.*, 2018; Sai *et al.*, 2022). A tumorigênese do câncer colorretal (CCR) está relacionada aos fatores de resistência bacteriana e a formação de biofilme de *E. coli*, que contribuem para o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal e da proliferação celular (Fais *et al.*, 2018).

Deste modo, torna-se necessário a busca por novas abordagens terapêuticas capazes de eliminar *E. coli* patogênica e, consequentemente, reduzir o risco de indução do CCR. O ácido úsnico (AU), um metabólito secundário isolado do líquen marinho e conhecido por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais, tem despertado interesse científico. Os líquenes são plantas talófitas compostas por uma alga e um fungo que crescem em associação simbiótica sobre uma superfície sólida, sendo o AU encontrado em diversas espécies, com destaque ao gênero



Usnea (Figura 1). O mecanismo de ação antibacteriana dos líquenes do gênero *Usnea* é associado à interrupção da função metabólica, por meio do desacoplamento da fosforilação oxidativa na membrana mitocondrial interna, com a retirada do suprimento energético do organismo de forma efetiva (Croce *et al.*, 2022). No entanto, sua baixa solubilidade em água e hepatotoxicidade limitam seu uso (Chandika *et al.*, 2022). A nanotecnologia permite encapsular o AU em nanopartículas poliméricas, melhorando sua administração oral e reduzindo seus efeitos colaterais (Crawford, 2015).

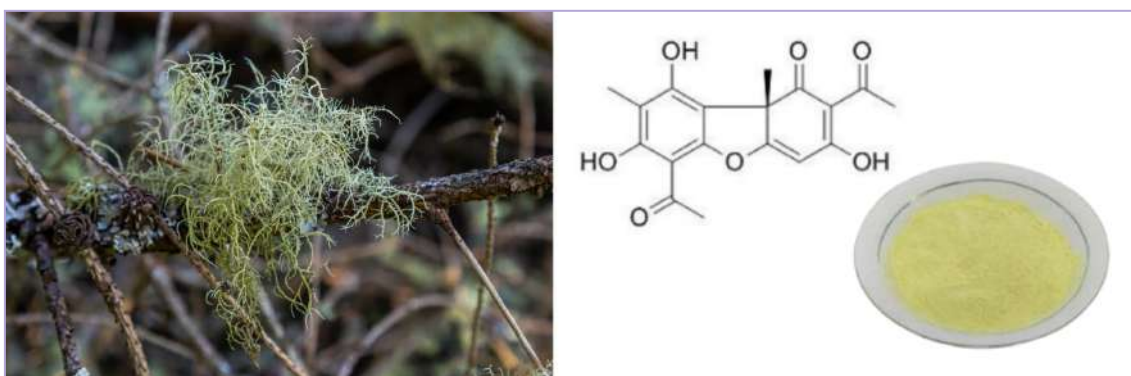


Figura 1 - Espécime de *Usnea barbata*, conhecida popularmente como “barba de velho” (Popovici *et al.*, 2023), molécula e formulação em pó do ácido úsnico. Fonte: Autores, 2025.

Nesse contexto, as nanopartículas poliméricas, especificamente de zeína revestidas com quitosana (AU-ZNP-CH), são uma estratégia promissora para a entrega direcionada e controlada de fármacos. A zeína é a principal proteína de armazenamento do milho (*Zea mays* L.), representando mais de 50% das proteínas totais do grão e pertencendo ao grupo das prolaminas, as quais são insolúveis em ambiente aquoso e possuem similaridade conformacional às proteínas globulares (Tran *et al.*, 2019) (Figura 2). Em contraste às proteínas hidrofílicas, a zeína tem capacidade de aprisionar fisicamente os compostos hidrofóbicos e induzir a liberação sustentada do fármaco (Liu *et al.*, 2023). Além de considerada como um excipiente seguro para produtos farmacêuticos orais pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América, a zeína é atóxica, biodegradável e resistente à degradação gastrointestinal, possibilitando a formulação eficiente de nanopartículas que permitem o encapsulamento de uma ampla variedade de compostos (Campos *et al.*, 2023).



Figura 2 - Espécime de *Zea mays* L. (milho), grão de milho, molécula e formulação em pó da zeína.
Fonte: Autores, 2025.

Por sua vez, a quitosana é um polissacarídeo linear obtido a partir da desacetilação da quitina, constituinte dos exoesqueletos de crustáceos, da parede celular de fungos e de outros organismos (Figura 3). A quitosana destaca-se significativamente por sua elevada atividade biológica, como antifúngica, antimicrobiana e antioxidante (Harugade *et al.*, 2023). A sua atividade antibacteriana é objeto de múltiplos estudos, visto que varia com diversos fatores como sua estrutura, a estrutura do microorganismo, suas características físico-químicas, além dos parâmetros do ambiente em que atua (Cai-Ling *et al.*, 2021). Além disso, outras características como alta biocompatibilidade, acessibilidade, biodegradabilidade e caráter atóxico a tornam um biopolímero extremamente relevante no combate a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos (Ardean *et al.*, 2023). Quanto à administração oral, esta é facilitada com a resistência da quitosana ao pH ácido e a boa interação com o muco intestinal.

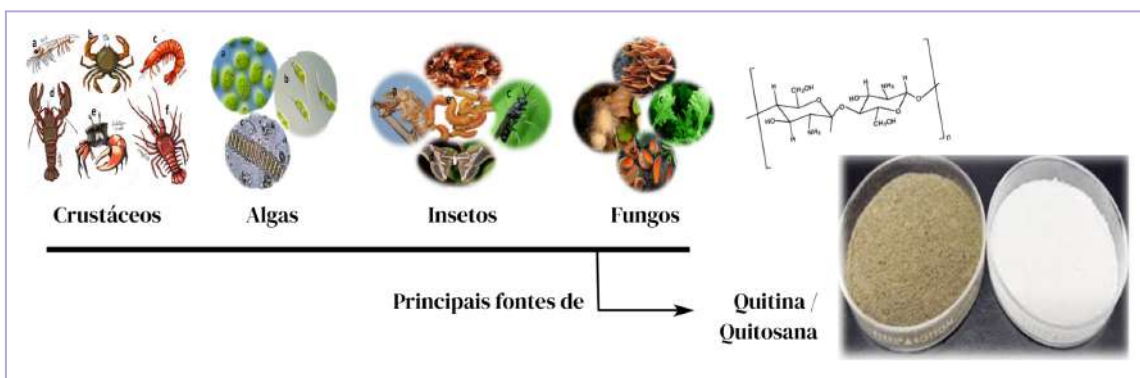


Figura 3 - Principais fontes para extração de quitina e quitosana, molécula de quitosana e formulação em pó de quitina e quitosana. Fonte: Adaptado de Isa *et al.*, 2024.

Usar ZNP-CH para encapsular ácido úsnico melhora a especificidade, solubilidade e reduz efeitos citotóxicos, oferecendo uma nova possibilidade terapêutica para essa condição clínica desafiadora. Por isso, ao direcionar bactérias intestinais como alvos terapêuticos e usar AU encapsulado em nanopartículas poliméricas de zeína, oferece-se uma estratégia promissora e inovadora para evitar o início e progressão do câncer colorretal.

2. JUSTIFICATIVA

Escherichia coli, embora seja um bacilo Gram-negativo e comensal, possui cepas que adquiriram fatores de virulência e se tornaram patogênicas, com destaque para os grupos filogenéticos B2 e D (Sadeghi *et al.*, 2024). Graças à sua adaptabilidade e capacidade de produzir toxinas e biofilmes, *E. coli* tem sido fortemente associada ao câncer colorretal (CCR) (Dejea e Sears, 2016). Globalmente, o CCR é classificado como o segundo tipo mais mortal de câncer e o terceiro mais comum, com previsões de aumento de 60% na incidência até 2030 (Siegel *et al.*, 2019). No Brasil, mais de 45 mil novos casos são estimados para 2025, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA). Entre os fatores de risco envolvidos na indução do CCR, a microbiota intestinal desempenha papel crucial na iniciação e progressão da neoplasia, sendo amplamente investigada nas pesquisas mais recentes (Li *et al.*, 2022). Diante desse cenário, torna-se essencial a busca por alternativas terapêuticas frente a *E. coli* indutora de CCR. Nesse contexto, o presente estudo analisa nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ácido úsnico (AU-ZNP-CH) como produto sustentável e eficaz no combate às cepas de *E. coli* carcinogênicas, configurando um avanço biotecnológico e alinhando-se ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3 - Saúde e bem-estar, estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU).



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia do ácido úsnico encapsulado em nanopartículas de zeína quanto à sua atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas bacterianas indutoras de câncer colorretal.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ácido úsnico (AU-ZNP-CH), com ênfase na determinação do potencial zeta, tamanho da partícula e índice de polidispersão;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das formulações AU-ZNP-CH frente a cepas de *E. coli* indutoras de câncer colorretal (CCR);
- Investigar o potencial antibiofilme das nanopartículas AU-ZNP-CH sobre biofilmes bacterianos formados por cepas de *E. coli* indutoras de câncer colorretal (CCR).



4. METODOLOGIA

4.1. Preparação e caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de zeína contendo ácido úsnico revestidas com quitosana (AU-ZNP-CH) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação adaptado de Moreno *et al.* (2017) por meio de metodologias previamente estabelecidas pelo grupo de pesquisa MicroNAT - Microbiologia, Nanotecnologia e Abordagens Tecnológicas (Campos *et al.*, 2023). As AU-ZNP-CH obtidas, foram caracterizadas quanto ao potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão também seguindo as mesmas metodologias estabelecidas.



Figura 4 - Soluções preparadas de zeína com ácido úsnico antes da adição do antissolvente (A) e remoção do solvente orgânico em evaporador rotativo (B). Fonte: Autores, 2025.

4.2. Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) através do método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023). Inicialmente, o caldo Mueller-Hinton foi depositado nas placas e em seguida as AU-ZNP-CH foram distribuídas em diluição seriada. Por fim, as bactérias foram depositadas e as placas incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. A CIM foi a menor concentração que inibe 90% do crescimento bacteriano, enquanto a CBM foi a menor concentração sem crescimento microbiano.



4.3. Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

A determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos foi realizada pelo método do cristal violeta. Suspensões bacterianas foram adicionadas ao TSB + glicose em placas de microdiluição e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h. Após processamento da placa, a leitura espectrofotométrica a 570 nm classificou as cepas em quatro categorias (forte, moderada, fraca e não aderente) com base nos valores de OD dos biofilmes bacterianos (Stepanović *et al.*, 2000).

4.4. Avaliação da inibição da formação do biofilme

A avaliação da inibição da formação do biofilme foi realizada segundo Albano *et al.* (2019). Inicialmente, foi distribuído o meio de cultura, em seguida, as AU-ZNP-CH foram distribuídas em concentrações subinibitórias e, posteriormente, foram adicionadas as suspensões bacterianas. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação, foi realizado o método do cristal violeta para quantificação, como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como Concentração Inibitória Mínima da Inibição de Biofilme (CIMB).

4.5. Avaliação da erradicação do biofilme

A erradicação do biofilme foi avaliada conforme Albano *et al.* (2019). Inicialmente, inóculos bacterianos foram ajustados em densidade de 0,5 de McFarland e distribuídos nas placas de microdiluição. Após 24 h de incubação a 35 ± 2 °C, o meio foi substituído e as AU-ZNP-CH foram adicionadas nas concentrações suprainibitórias. Após nova incubação, foi realizado o método do cristal violeta para quantificação. Os resultados foram expressos como Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme (CEMB).



5. RESULTADOS OBTIDOS

5.1. Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de zeína (ZNP) foram caracterizadas quanto ao potencial zeta (mV), tamanho de partícula (nm) e índice de polidispersão (PDI) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da caracterização físico-química quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta da AU-ZNP-CH.

Amostras	Tamanho da partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
AU-ZNP-CH	332 ± 0,7	0,23	+51,1 ± 1,0

AU-ZNP-CH: ácido úsnico encapsulado em nanopartículas de zeína revestida com quitosana; PDI: índice de polidispersão.

O tamanho de partícula, PDI e potencial zeta são parâmetros utilizados na caracterização de nanopartículas estáveis, as quais visam aplicações médicas e nutricionais (Wang *et al.*, 2018). O tamanho da partícula (nm) influencia diretamente na captação das nanopartículas pelos enterócitos e na estabilidade da formulação no trato gastrointestinal (TGI). Logo, desempenha um papel relevante ao influenciar na adesão das partículas, na interação com a membrana mucosa e na cinética de liberação do medicamento em administrações orais (Alqahtani *et al.*, 2021). No presente estudo, os resultados obtidos para os tamanhos de partícula de AU-ZNP-CH foram de 332 nm. Portanto, além de gerar um subproduto inofensivo e biocompatível devido à sua biodegradabilidade (Idrees *et al.*, 2020), as nanopartículas ultrapassam o TGI através de canais paracelulares, visto que atingem um espectro de 100-500 nm (Alqahtani *et al.*, 2021).

O PDI oferece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas desenvolvidas (Nogueira, 2022). Na caracterização, as AU-ZNP-CH indicaram uniformidade entre as nanopartículas, considerando-se que suspensões com PDI de até 0,3 são consideradas monodispersas e favoráveis para



aplicações *in vivo* (Danaei *et al.*, 2018). O PDI de AU-ZNP-CH desenvolvidas no presente estudo assemelha-se aos das ZNPs encapsulando extrato diclorometânico das raízes de *Fridericia platyphylla* produzidas por Neves e colaboradores (2024), as quais obtiveram PDI de 0,207, indicando elevado nível de homogeneidade como AU-ZNP-CH.

O potencial zeta é empregado para avaliar a estabilidade de uma dispersão coloidal através da força de repulsão entre as partículas (Nunes *et al.*, 2023). Nesse parâmetro, as AU-ZNP-CH apresentaram resultados favoráveis de estabilidade, visto que o resultado acima de 30 mV (em módulo) costuma indicar as soluções mais estáveis (Santos, 2023). O potencial zeta de AU-ZNP-CH aproxima-se ao relatado nas ZNPs encapsulando ácido elágico produzidas por De Souza Tavares e colaboradores (2021) e às ZNPs elaboradas por Wang (2019), porém AU-ZNP-CH possui valores significativamente maiores às ZNPs supracitadas, garantindo maior estabilidade eletrostática. Dessa forma, considera-se os resultados favoráveis perante os três critérios de caracterização das nanopartículas supracitados, constatando-se que AU-ZNP-CH estão aptas para o emprego nos ensaios microbiológicos.

5.2. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana de AU-ZNP-CH é pioneira frente a cepas de *Escherichia coli* indutora de câncer colorretal (CCR) – dentre elas, a *E. coli* NC101 Δ pks, na qual há deleção da ilha genômica (“pks”), responsável por sintetizar a genotoxina colibactina. Além de *E. coli* NC101 Δ pks, analisaram-se as cepas *E. coli* H10407, *E. coli* NC101 Δ clbP e *E. coli* NC101 WT (Tabela 2).

Os resultados demonstraram que o AU livre não obteve atividade frente às cepas bacterianas selecionadas, apresentando CIM e CBM superiores a 500 μ g/mL em todos os casos. Por sua vez, AU-ZNP-CH apresentou CIM de 7,81 μ g/mL para *E. coli* H10407, *E. coli* NC101 Δ clbP e *E. coli* NC101 WT, enquanto CIM de 15,62 μ g/mL para *E. coli* NC101 Δ pks. A CBM de AU-ZNP-CH foi de 15,62 μ g/mL para *E. coli* NC101 Δ clbP, *E. coli* NC101 WT e *E. coli* NC101 Δ pks, já para a cepa *E. coli* H10407 a CBM foi 31,25 μ g/mL.



Tabela 2 - Atividade antibacteriana de AU e AU-ZNP-CH.

	AU		AU-ZNP-CH	
	CIM	CBM	CIM	CBM
Cepas bacterianas	$\mu\text{g/mL}$			
<i>Escherichia coli</i> H10407	>500	>500	7,81	31,25
<i>Escherichia coli</i> NC101 ΔclbP	>500	>500	7,81	15,62
<i>Escherichia coli</i> NC101 WT	>500	>500	7,81	15,62
<i>Escherichia coli</i> NC101 Δpks	>500	>500	15,62	15,62

AU: ácido úsnico; AU-ZNP-CH: ácido úsnico encapsulado em nanopartículas de zeína revestida com quitosana; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; *Escherichia coli* H10407: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* NC 101 WT: *Escherichia coli* sem modificação genética e isolada de camundongo; *Escherichia coli* NC101 ΔclbP : *Escherichia coli* com deleção do gene precursor da colibactina; *Escherichia coli* NC101 Δpks : *Escherichia coli* com deleção da ilha pks necessária para a produção de colibactina.

A atividade do AU frente a bactérias gram-negativas foi pouco explorada na literatura, embora o composto liquênico esteja evidente em estudos científicos mais recentes. Os ensaios microbiológicos mais próximos são os de Souza e colaboradores (2024), os quais testaram AU encapsulado em lipossomas revestidos com quitosana (Lipo-AU-CH) para administração oral frente a cepas de *E. coli* indutoras de CCR. Os testes foram realizados com uma das cepas contempladas no presente estudo, *E. coli* H10407, obtendo a concentração de CIM e CBM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Por sua vez, as nanopartículas de zeína encapsuladas com AU e revestidas com quitosana (AU-ZNP-CH) apresentaram a CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ e a CBM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ frente a *E. coli* H10407, o que indica a maior atividade inibitória e bactericida após encapsulação em nanopartículas de zeína (AU-ZNP-CH) em comparação a lipossomas (Lipo-AU-CH).

Outros estudos também analisaram o AU nanoencapsulado frente a bactérias



gram-negativas. Dentre eles, Grumezescu e colaboradores (2013) que formularam nanopartículas à base de óxido de ferro (Fe_3O_4) contendo AU e testaram frente a *E. coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, alcançaram valores de CIM e CBM de 10 e 60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além de Khan, Yu e Kim (2020) que obtiveram concentrações inibitórias de 512 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, substancialmente maiores com nanopartículas de quitosana frente a *E. coli* KCTC 1682 (1024 $\mu\text{g/mL}$) e *P. aeruginosa* KCTC 1637.

Ressalta-se que AU-ZNP-CH, ao possuir CIM e CBM de até 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para todas as cepas testadas, destaca-se como uma alternativa eficaz e de simples obtenção quando comparada a outros nanocarreadores. Isso ocorre a partir do momento que as ZNPs, além de apresentarem características de grande relevância biotecnológica, como a capacidade de controlar a liberação do fármaco, otimizar sua absorção pelo organismo e reduzir a toxicidade em comparação às formulações sintéticas, essas estruturas podem ser obtidas por meio da precipitação polimérica (nanoprecipitação) e outros métodos de formulação que favorecem sua viabilidade em escala industrial (Campos *et al.*, 2023).

5.3. Determinação da produção de biofilme pelos isolados bacterianos

As cepas de *Escherichia coli* com potencial carcinogênico (*E. coli* H10407, *E. coli* NC101 WT, *E. coli* NC101 ΔclbP e *E. coli* NC101 Δpks) foram classificadas quanto à produção de biofilme segundo os valores de Densidade Óptica (OD) obtidos pelo método do cristal violeta. Os dados foram analisados e divididos em: Não-aderente, Fraca, Moderada ou Forte (Tabela 3).

Os resultados indicaram a produção de biofilme moderada por *E. coli* H10407, *E. coli* NC101 WT e *E. coli* NC101 Δpks , enquanto a forte produção de biofilme por *E. coli* NC101 ΔclbP .

Tabela 3 – Classificação da produção de biofilme dos isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes aos antibióticos.



Cepas bacterianas	Classificação quanto à produção de biofilme
<i>Escherichia coli</i> H10407	Moderada
<i>Escherichia coli</i> NC101 WT	Moderada
<i>Escherichia coli</i> NC101 Δ clbP	Forte
<i>Escherichia coli</i> NC101 Δ pks	Moderada

Escherichia coli H10407: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* NC 101 WT: *Escherichia coli* sem modificação genética e isolada de camundongo; *Escherichia coli* NC101 Δ clbP: *Escherichia coli* com deleção no gene precursor da colibactina; *Escherichia coli* NC101 Δ pks: *Escherichia coli* com deleção da ilha pks necessária para a produção de colibactina.

O segmento colorretal é protegido por uma barreira de muco rica em mucinas e glicoproteínas que evitam o contato direto entre células epiteliais e o microbioma (Dejea e Sears, 2016). No cólon saudável, há uma camada de muco firme, comumente relatada como ausente em bactérias, e outra solta, com microrganismos comensais benéficos (Johansson *et al.*, 2008). Em casos de inflamação ou dano, bactérias incomuns podem se proliferar no muco firme, cujo estabelecimento é facilitado pela formação de biofilmes bacterianos (Li *et al.*, 2019).

Os biofilmes são comunidades microbianas envoltas em matriz extracelular produzida por elas mesmas (Schulze *et al.*, 2021). A produção de biofilme estabelece uma estrutura espacial que promove a interação entre o epitélio colorretal e o microbioma, o que aumenta a agressividade de *Escherichia coli* e, possivelmente, possui atuação direta na indução do câncer colorretal (CCR) (Jian *et al.*, 2024).

Dentre os impactos do biofilme no segmento colorretal, há o prejuízo significativo à função da barreira epitelial, com alteração no metabolismo da poliamina, aumento das respostas pró-inflamatórias e pró-cancerígenas e desregulação no microbioma intestinal (Li *et al.*, 2017). Além disso, foi relatado que o biofilme induz inflamação, aumenta a proliferação de células cancerígenas e influencia em metástase e

resistência a medicamentos, impactando os processos biológicos das neoplasias dentro do microambiente tumoral (Motta *et al.*, 2021).

Quanto à ocorrência em pacientes com CCR, Tomkovich e colaboradores (2019) descobriram biofilmes bacterianos invasivos na mucosa do cólon de aproximadamente 50% dos pacientes com CCR, em comparação a 13% dos indivíduos saudáveis; enquanto Dejea e colaboradores (2018) identificaram a invasão da camada de células epiteliais em todas amostras com biofilme, após análise de espécimes de cólon de cinco pacientes com polipose adenomatosa familiar (FAP) e um paciente com síndrome de polipose juvenil.

Por sua vez, em estudo com 35 isolados clínicos de ExPEC (*Escherichia coli* patogênica extraintestinal) positivos para ilha de patogenicidade *pks*, vindos de um hospital terciário em Pune (Índia), Suresh e colaboradores (2018) identificaram que a maioria possuía produção de biofilme forte (21/35) ou moderada (10/35); enquanto Ballén e colaboradores (2022) caracterizaram 376 cepas de ExPEC, vindas de quatro hospitais na Catalunha (Espanha), identificando produção de biofilme fraca (23,1%), moderada (35,6%) e forte (25,6%). Os resultados na literatura, logo, são condizentes à produção moderada de biofilme por *E. coli* H10407, *E. coli* NC101 WT, *E. coli* NC101 Δpks e forte por *E. coli* NC101 $\Delta clbP$, sendo esses fatores que ratificam o seu alto potencial de virulência.

5.4. Avaliação da inibição e erradicação da formação do biofilme

A avaliação da atividade antibiofilme do AU livre resultou em CIMB de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* NC101 $\Delta clbP$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* NC101 WT e *E. coli* NC101 Δpks e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* H10407, além de CEMB de 250 $\mu\text{g/mL}$ frente a todas cepas bacterianas selecionadas.

Por sua vez, as AU-ZNP-CH apresentaram CIMB de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* NC101 WT e *E. coli* NC101 $\Delta clbP$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* NC101 Δpks e 250 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* H10407, enquanto CEMB de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ frente a todas as cepas (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade antibiofilme de ácido úsnico livre e encapsulado.

Cepas bacterianas	AU		AU-ZNP-CH	
	CIMB	CEMB	CIMB	CEMB
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> H10407	250	250	250	7,81
<i>Escherichia coli</i> NC101 WT	62,5	250	7,81	7,81
<i>Escherichia coli</i> NC101 ΔclbP	31,25	250	7,81	7,81
<i>Escherichia coli</i> NC101 Δpks	62,5	250	62,5	7,81

CIMB: Concentração Inibitória Mínima do Biofilme; CEMB: Concentração de Erradicação Mínima do Biofilme; *Escherichia coli* H10407: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* NC 101 WT: *Escherichia coli* sem modificação genética e isolada de camundongo; *Escherichia coli* NC101 ΔclbP: *Escherichia coli* com deleção do gene precursor da colibactina; *Escherichia coli* NC101 Δpks: *Escherichia coli* com deleção da ilha pks necessária para a produção de colibactina. AU (ácido úsnico), AU-ZNP-CH (ácido úsnico encapsulado em nanopartícula de zeína revestida com quitosana).

Um dos objetivos mais significativos do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é a ruptura de biofilmes. Esse processo pode levar a melhores resultados no tratamento e na redução da resistência a antibióticos, sendo um dos processos mais relevantes em análises microbiológicas quanto a fatores de virulência (Badr-Eldin *et al.*, 2024). Nesse contexto, as nanopartículas são promissoras na desestabilização dos biofilmes, previnem sua reformação e aumentam a eficácia dos tratamentos convencionais, o que se deve às suas propriedades físico-químicas únicas (Sahli *et al.*, 2022; Ikuma, Decho e Lau, 2015). Devido ao seu pequeno tamanho e à sua grande relação “área de superfície/volume”, é facilitada a penetração aprimorada em biofilmes, interrompendo as substâncias poliméricas extracelulares que envolvem as comunidades bacterianas (Tanzil *et al.*, 2016; Quayyum e Khan, 2016).

A atividade antibiofilme do AU livre frente a bactérias gram-negativas ainda é pouco descrita na literatura. Os resultados encontrados na presente pesquisa referente à



atividade antibiofilme de AU para *E. coli* NC101 WT, *E. coli* NC101 Δ cblP e *E. coli* NC101 Δ pks corroboram com as pesquisas de Chlumsky e colaboradores (2021), os quais identificaram percentuais de inibição de $\approx 30\%$ frente a cepas de *E. coli* 683/17 e *E. coli* 693/17.

As AU-ZNP-CH apresentaram resultados mais expressivos em CIMB e CEMB, os quais coincidiram com sua atividade em CIM. Quanto a CIMB, as AU-ZNP-CH superaram a maior parte das ZNPs testadas na literatura frente a biofilmes de bactérias Gram-negativas, como as ZNPs revestidoras de curcumina produzidas por Badr-Eldin e colaboradores (2024), as quais inibiram 70% do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* a 50 $\mu\text{g/mL}$. Quanto a CEMB, as AU-ZNP-CH obtiveram alta atividade, superando as nanopartículas de ouro revestidas com zeína (Ze-AuNPs) produzidas por Suganya e colaboradores (2017), as quais erradicaram o biofilme produzido por *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa* a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Ressalta-se que Campos e colaboradores (2024) identificaram que as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (ZNP-CH), sem a encapsulação de fármaco, não demonstraram atividade antibiofilme frente a cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Isso confirma o caráter decisivo da encapsulação do AU no desenvolvimento de um produto nanobiotecnológico com essa propriedade. Desse modo, as AU-ZNP-CH mostram-se como uma alternativa promissora com atividade antibiofilme frente a cepas de *E. coli* indutora de CCR.



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de abordagens terapêuticas frente às bactérias envolvidas na indução do CCR é uma área de pesquisa inovadora, sendo essa uma preocupação emergente na comunidade científica. Essa pesquisa demonstrou que as nanopartículas de zeína revestidas com quitosana contendo ácido úsnico (AU-ZNP-CH) possuem elevada atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas patogênicas de *Escherichia coli*, além de apresentarem uma caracterização favorável à administração oral como antimicrobiano.

Portanto, com base nessas descobertas, é possível afirmar que o ácido úsnico (AU), encapsulado em nanopartículas poliméricas de zeína revestidas com quitosana (AU-ZNP-CH), apresenta um elevado biopotencial, configurando-se como uma alternativa natural e sustentável para terapias antibacterianas. Esse resultado reforça a importância de desenvolver novas formulações a partir de compostos naturais, sobretudo por meio da experimentação com diferentes polímeros, oferecendo soluções inovadoras diante dos desafios emergentes da saúde pública global.

Diante do exposto, o presente estudo espera contribuir para o avanço das pesquisas sobre os mecanismos de indução do CCR por meio de bactérias, assim como propõe uma alternativa viável para mitigação da problemática. Sugere-se, por fim, a aplicação da terapia nanobiotecnológica utilizada neste estudo frente a outras cepas bacterianas associadas ao CCR, como *Fusobacterium nucleatum* (Gram-negativa), *Bacteroides fragilis* (Gram-negativa) e *Enterococcus faecalis* (Gram-positiva), o que promoverá maior conhecimento acerca do biopotencial da formulação diante de uma maior variedade de espécies patogênicas relacionadas à tumorigênese colônica.



REFERÊNCIAS

ALBANO, M.; CRULHAS, B.; ALVES, F.; PEREIRA, A.; ANDRADE, B.; BARBOSA, L.; FURLANETTO, A.; LYRA, L.; RALL, V.; JÚNIOR, A. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. **Microbial pathogenesis**, v. 126, p. 231-238, 2019.

ALQAHTANI, M. S.; KAZI, M.; ALSENAIDY, M. A.; AHMAD, M. Z. Advances in oral drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 618411, 2021.

ALZHRANI, S. M.; AL DOGHAITHER, H. A.; AL-GHAFARI, A. B. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 15, n. 6, p. 271, 2021.

ARDEAN, C.; DAVIDESCU, C.; NEMES, N.; NEGREA, A.; CIOPEC, M.; DUTEANU, N.; NEGREA, P.; DUDA-SEIMEN, D.; MUSTA, V. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7449, 2021.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; MOHAMMADPOUR, N.; ABEDIN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 58-63, 2010.

BADR-ELDIN, S. M.; ALDAWSARI, H. M.; AHMED, O. A.; KOTTA, S.; ABUALSUNUN, W.; ESHMAWI, B. A.; SELEEM, N. M. Utilization of zein nano-based system for promoting antibiofilm and anti-virulence activities of curcumin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Nanotechnology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 20230212, 2024.

BALLÉN, V.; GABASA, Y.; RATIA, C.; SÁNCHEZ, M.; SOTO, S. Correlation between antimicrobial resistance, virulence determinants and biofilm formation ability among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Catalonia, Spain. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 803862, 2022.

BALLESTER, V.; RASHTAK, S.; BOARDMAN, L. Clinical and molecular features of young onset colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, n.22, v.5, p.17361744, 2016.

BILLER, L. H.; SCHRAG, D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review. **Jama**, v. 325, n. 7, p. 669-685, 2021.

CAMPOS, L. A. A.; NETO, A. F. S.; NORONHA, M. C. S.; DE LIMA, M. F.; CAVALCANTI, I. M. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Zein nanoparticles for drug delivery: preparation methods and biological applications. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122754, 2023.

CAMPOS, L. A. D. A.; NETO, A. F. S.; SCAVUZZI, A. M. L.; LOPES, A. C. D. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CAVALCANTI, I. M. F. Ceftazidime/Tobramycin Co-Loaded Chitosan-Coated Zein Nanoparticles against Antibiotic-Resistant and Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 3, p. 320, 2024.

CHANDIKA, P.; KHAN, F.; HEO, S. Y.; KIM, Y. M.; YI, M.; JUNG, W. K. Enhanced wound-healing capability with inherent antimicrobial activities of usnic acid incorporated poly (ϵ -caprolactone)/decellularized extracellular matrix nanofibrous scaffold. **Biomaterials Advances**, v. 140, p. 213046, 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2022.

CRAWFORD, Stuart D. Lichens used in traditional medicine. In: Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential. **Cham: Springer international publishing**, 2019. p. 31-97.

CROCE, N.; PITARO, M.; GALLO, V.; ANTONINI, G. Toxicity of usnic acid: A narrative review. **Journal of Toxicology**, v. 2022, n. 1, p. 8244340, 2022.

DAI, L.; SUN, C.; LI, R.; MAO, L.; LIU, F.; GAO, Y. Structural characterization, formation mechanism and stability of curcumin in zein-lecithin composite nanoparticles fabricated by antisolvent co-precipitation. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1163-1171, 2017.

DANAEI, M. R. M. M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAIEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; MOZAFARI, Y. M. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DEJEA, C. M.; SEARS, C. L. Do biofilms confer a pro-carcinogenic state?. **Gut Microbes**, v. 7, n. 1, p. 54-57, 2016.

DEJEA, C. M.; WICK, E. C.; HECHENBLEIKNER, E. M.; WHITE, J. R.; MARK WELCH, J. L.; ROSSETTI, B. J.; SEARS, C. L. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 51, p. 18321-18326, 2014.

DE OLIVEIRA ALVES, N.; DALMASSO, G.; NIKITINA, D.; VAYSSE, A.; RUEZ, R.; LEDOUX, L.; CHAMAILLARD, M.. The colibactin-producing *Escherichia coli* alters the tumor microenvironment to immunosuppressive lipid overload facilitating colorectal cancer progression and chemoresistance. **Gut microbes**, v. 16, n. 1, p. 2320291, 2024.

DE SOUZA, J. B.; DE LACERDA, D. C.; DOS SANTOS, R. C. S.; DA COSTA, S. D. J.; DE ALMEIDA, L. A. C.; CAVALCANTI, I. D. L.; CAVALCANTI, I. M. F. Ceftazidime and Uronic Acid Encapsulated in Chitosan-Coated Liposomes for Oral



Administration against Colorectal Cancer-Inducing *Escherichia coli*. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 6, p. 802, 2024.

DE SOUZA TAVARES, W.; PENA, G. R.; MARTIN-PASTOR, M.; DE SOUSA, F. F. O. Design and characterization of ellagic acid-loaded zein nanoparticles and their effect on the antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Molecular Liquids**, v. 341, p. 116915, 2021.

DOUGHERTY, M.; VALDÉS-MAS, R.; WERNKE, K.; GHARAIBEH, R.; YANG, Y.; BRANT, J.; JOBIN, C. The microbial genotoxin colibactin exacerbates mismatch repair mutations in colorectal tumors. **Neoplasia**, v. 43, p. 100918, 2023.

ELMIZADEH, A.; GOLI, S. A. H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; RAHIMMALEK, M. Fabrication and characterization of pectin-zein nanoparticles containing tanshinone using anti-solvent precipitation method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 260, p. 129463, 2024.

GAAB, M.; LOZANO, P.; IBÁÑEZ, D.; MANESE, K.; RIEGO, F.; TIONGCO, R.; ALBANO, P. A meta-analysis on the association of colibactin-producing pks+ *Escherichia coli* with the development of colorectal cancer. **Laboratory Medicine**, v. 54, n. 1, p. 75-82, 2023.

GAGLIARDI, A.; PAOLINO, D.; IANNONE, M.; PALMA, E.; FRESTA, M.; COSCO, D. Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, p. 601-614, 2018.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GRUMEZESCU, A. M.; COTAR, A. I.; ANDRONESCU, E., Ficăi, A.; GHITULICA, C. D., GRUMEZESCU, V.; CHIFIRIUC, M. C. In vitro activity of the new water-dispersible Fe₃O₄@ usnic acid nanostructure against planktonic and sessile bacterial cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 7, p. 1-10, 2013.

HABIMANA, O.; STEENKESTE, K.; FONTAINE-AUPART, M. P.; BELLON-FONTAINE, M. N.; KULAKAUSKAS, S.; BRIANDET, R. Diffusion of nanoparticles in biofilms is altered by bacterial cell wall hydrophobicity. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 1, p. 367-368, 2011.

IDREES, H.; ZAIDI, S. Z. J.; SABIR, A.; KHAN, R. U.; ZHANG, X.; HASSAN, S. U. A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 1970, 2020.

IKUMA, K.; DECHO, A. W.; LAU, B. L. T. When nanoparticles meet biofilms—interactions guiding the environmental fate and accumulation of nanoparticles. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 591, 2015.

ISA, M.; ABDULKARIM, A.; BELLO, A.; BELLO, T.; ADAMU, Y. Synthesis and characterization of chitosan for medical applications: A review. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 38, n. 10, p. 1036-1057, 2024.

JIAN, C.; YINHANG, W.; JING, Z.; ZHANBO, Q.; ZEFENG, W.; SHUWEN, H. *Escherichia coli* on colorectal cancer: A two-edged sword. **Microbial Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. e70029, 2024.

JOHANSSON, M. E.; PHILIPSON, M.; PETERSSON, J.; VELCICH, A.; HOLM, L.; HANSSON, G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 39, p. 15064-15069, 2008.

KHAN, F.; YU, H.; KIM, Y. M. Bactericidal activity of usnic acid-chitosan nanoparticles against persister cells of biofilm-forming pathogenic bacteria. **Marine Drugs**, v. 18, n. 5, p. 270-281, 2020.

LI, S.; KONSTANTINOV, S. R.; SMITS, R.; PEPPELENBOSCH, M. P. Bacterial biofilms in colorectal cancer initiation and progression. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 1, p. 18-30, 2017.

LI, S.; PEPPELENBOSCH, M. P.; SMITS, R. Bacterial biofilms as a potential contributor to mucinous colorectal cancer formation. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1872, n. 1, p. 74-79, 2019.

LICHTENSTERN, C.; LAMICHHANE-KHADKA, R. A tale of two bacteria—*Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, and colorectal cancer. **Frontiers in Bacteriology**, v. 2, p. 1229077, 2023.

LIU, G.; AN, D.; LI, J.; DENG, S. Zein-based nanoparticles: Preparation, characterization, and pharmaceutical application. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1120251, 2023.

MALIKI, S.; SHARMA, G.; KUMAR, A.; MORAL-ZAMORANO, M.; MORADI, O.; BASELGA, J.; GARCÍA-PEÑAS, A. Chitosan as a tool for sustainable development: A mini review. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1475, 2022.

MOTTA, J. P.; WALLACE, J. L.; BURET, A. G.; DERAISON, C.; VERGNOLLE, N. Gastrointestinal biofilms in health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 5, p. 314-334, 2021.

NEVES, M. A. D.; JESUS, C. M. D.; OLIVEIRA, J. L. D.; BUNA, S. D. S. S.; SILVA, L. A.; FRACETO, L. F.; ROCHA, C. Q. D. Zein Nanoparticles-Loaded Flavonoids-Rich Fraction from *Fridericia platyphylla*: Potential Antileishmanial Applications. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 12, p. 1603, 2024.

NOGUEIRA, Beatriz Ribeiro. Desenvolvimento e abordagem dosimétrica de nanopartículas de 198-Au para aplicação em braquiterapia. 2022. **Tese (Doutorado)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.



NUNES, M. R.; TEIXEIRA, S. C. O.; SALVADOR, G.; MUNARETTO, G. A.; DA ROSA, C. G. Avaliação das propriedades físico-químicas de nanopartículas de zeína contendo curcumina por espalhamento dinâmico de luz. **62º Congresso Brasileiro de Química**, 2023.

NUNES, R.; BAIÃO, A.; MONTEIRO, D.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 826-837, 2020.

PAKBIN, B.; BRÜCK, W.; ROSSEN, J. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: **A review. International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021.

POPOVICI, V.; BUCUR, L.; POPESCU, A.; SCHRÖDER, V.; COSTACHE, T.; RAMBU, D.; BADEA, V. Antioxidant and cytotoxic activities of *Usnea barbata* (L.) FH Wigg. dry extracts in different solvents. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 909, 2021.

QAYYUM, S.; KHAN, A. U. Nanoparticles vs. biofilms: a battle against another paradigm of antibiotic resistance. **MedChemComm**, v. 7, n. 8, p. 1479-1498, 2016.

REBERSEK, Martina. Gut microbiome and its role in colorectal cancer. **BMC cancer**, v. 21, n. 1, p. 1325, 2021.

SADEGHI, M.; MESTIVIER, D.; SOBHANI, I. Contribution of pks+ *Escherichia coli* (*E. coli*) to Colon Carcinogenesis. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1111, 2024.

SAHLI, C.; MOYA, S. E.; LOMAS, J. S.; GRAVIER-PELLETIER, C.; BRIANDET, R.; HÉMADI, M. Recent advances in nanotechnology for eradicating bacterial biofilm. **Theranostics**, v. 12, n. 5, p. 2383, 2022.

SANTOS, Shaydy Silva. Principais técnicas empregadas para a caracterização de nanopartículas de ouro. 2024. 60 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica e Industrial)** – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2023.

SCHULZE, A.; MITTERER, F.; POMBO, J. P.; SCHILD, S. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance-development, composition and regulation-therapeutical strategies. **Microbial Cell**, v. 8, n. 2, p. 28, 2021.

SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; SOERJOMATARAM, I.; HAYES, R. B.; BRAY, F.; WEBER, T. K.; JEMAL, A. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. **Gut**, v. 68, n. 12, p. 2179-2185, 2019.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SURESH, A.; RANJAN, A.; JADHAV, S.; HUSSAIN, A.; SHAIK, S.; ALAM, M.; AHMED, N. Molecular genetic and functional analysis of pks-harboring,

extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* from India. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2631, 2018.

SUGANYA, P.; VASEEHARAN, B.; VIJAYAKUMAR, S.; BALAN, B.; GOVINDARAJAN, M.; ALHARBI, N. S.; BENELLI, G. Biopolymer zein-coated gold nanoparticles: Synthesis, antibacterial potential, toxicity and histopathological effects against the Zika virus vector *Aedes aegypti*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 404-411, 2017.

TANZIL, A. H.; SULTANA, S. T.; SAUNDERS, S. R.; SHI, L.; MARSILI, E.; BEYENAL, H. Biological synthesis of nanoparticles in biofilms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 95, p. 4-12, 2016.

TOMKOVICH, S.; DEJEA, C. M.; WINGLEE, K.; DREWES, J. L.; CHUNG, L.; HOUSSEAU, F.; SEARS, C. L. Human colon mucosal biofilms from healthy or colon cancer hosts are carcinogenic. **The Journal of Clinical Investigation**, 129(4), 1699–1712, 2019.

TRAN, P.; DUAN, W.; LEE, B.; TRAN, T. The use of zein in the controlled release of poorly water-soluble drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 566, p. 557-564, 2019.

WANG, L.; ZHANG, Y. Heat-induced self-assembly of zein nanoparticles: Fabrication, stabilization and potential application as oral drug delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 403-412, 2019.

WANG, M.; FU, Y.; CHEN, G.; SHI, Y.; LI, X.; ZHANG, H.; SHEN, Y. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate β -carotene by anti-solvent precipitation method. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 577-587, 2018.

WANG, Y.; FU, K. Genotoxins: the mechanistic links between *Escherichia coli* and colorectal cancer. **Cancers**, v. 15, n. 4, p. 1152, 2023.

YUAN, Y.; LI, H.; ZHU, J.; LIU, C.; SUN, X.; WANG, D.; XU, Y. Fabrication and characterization of zein nanoparticles by dextran sulfate coating as vehicles for delivery of curcumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1074-1083, 2020.

YUAN, Y.; LI, H.; LIU, C.; ZHU, J.; XU, Y.; ZHANG, S.; WANG, D. Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 30-39, 2019.

ZHANG, G.; SUN, D. The synthesis of the novel *Escherichia coli* toxin—colibactin and its mechanisms of tumorigenesis of colorectal cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1501973, 2024.



ZHOU, F.; WANG, D.; HU, J.; ZHANG, Y.; TAN, B.K.; LIN, S. Control measurements of *Escherichia coli* biofilm: A review. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2469, 2022.