



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE FARMÁCIA

AZAEI FRANCISCO SILVA NETO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO QUERCETINA FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

Recife

2023

AZAEI FRANCISCO SILVA NETO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE
NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO QUERCETINA FRENTE A
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador (a): Prof. Dr. Luís André de Almeida Campos

Recife

2023

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE**

Silva-Neto, Azael Francisco.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME
DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO QUERCETINA FRENTE
A ISOLADOS CLÍNICOS DE Klebsiella pneumoniae RESISTENTES AOS
ANTIMICROBIANOS / Azael Francisco Silva-Neto. - Recife, 2023.**

47 p.

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador(a): Luís André de Almeida Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

1. Tecnologia Farmacêutica. 2. Nanotecnologia. 3. Microbiologia Clínica.
I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro. (Orientação). II. Campos, Luís André de Almeida. (Coorientação). IV. Título.

600 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 06/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE)

Profa. Dra. Ana Beatriz Sotero Siqueira
(Presidente e Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Alessandra Silva Araújo
(Examinadora)
Instituto Keizo Asami

Dra. Gerlane Souza de Lima
(Suplente)
Instituto Keizo Asami

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar, inicialmente, toda a minha gratidão a Deus por estar sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis, nos quais eu não conseguia enxergar com clareza e esperança a realidade. À minha mãe, Simone Patrícia, por todo o esforço e suporte, não apenas nesses últimos 5 anos, mas durante toda a minha vida. A ela, sou grato pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo amor e por ter fé, esperança e por sempre se manter otimista quando eu não conseguia ser. Tudo é por nós. Ao meu avô, Azael Silva, e ao meu primo, Kauã Gabriel, que sempre torceram e vibraram por cada conquista minha. Sou grato por serem quem são.

À minha prima, Taynna Cavalcanti, que compartilhou a vida comigo nesses últimos 5 anos, tornando essa jornada mais leve. Obrigado por me ouvir, acolher e abraçar nos momentos mais difíceis. Você é a minha pessoa. A Wallace, que também esteve comigo nos últimos anos, sempre de braços abertos para ajudar e acolher.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado durante essa jornada, em especial Rodrigo, Heloiza, Mirella, Dayana, Adijail, Stefanie, Thiago, Cecília, André e Samilly. Obrigado pelo tempo de convívio, por serem refúgio, cuidado, afeto, amparo e amor. Cada um tem uma importância e um lugar único em meu coração. Vocês me ensinaram e continuam me ensinando muito sobre a vida. À minha amiga Milena, que, além de parceira de pesquisa, se tornou um suporte e acalento, mostrando-me que nem sempre nossos planos saem conforme o esperado, mas como devem ser. Ela me mostrou que as dúvidas são naturais e que o amor existe para ser vivido.

A todos os meus colegas de trabalho no iLIKA, no LNFarm e no MicroNat, em especial a Maria Anndressa, que sempre me mostrou que era possível, me ajudando e me ensinando. Você é luz, e sou grato por quem você é. Agradeço também à minha orientadora, Isabella Macário, que me acolheu e me introduziu no mundo científico, tornando-se uma inspiração de vida. A Luís André, que me guiou nos últimos 4 anos de pesquisa e se tornou um amigo pessoal. Nada disso seria possível sem seus ensinamentos acadêmicos e pessoais. Obrigado pela confiança, por segurar minha mão e por me mostrar que sou capaz de alcançar tudo o que meu coração desejar.

À UFPE, que se tornou minha segunda casa. Estudar nela é a realização de um sonho que, por muito tempo, parecia inalcançável. Que mais pessoas como eu tenham acesso a uma educação de qualidade, transformadora e acessível.

Por fim, à minha própria essência, à minha pessoa interior, sinto uma profunda gratidão por nunca ter desistido. Os últimos anos não foram fáceis, mas sou grato pelas tentativas de ser eu mesmo, de deixar medos para trás e de me encontrar como pessoa no mundo. Sinto, hoje, a mais plena certeza da minha identidade e de quem sou. Sou grato por presenciar o magnífico espetáculo de existir e por alimentar a esperança em um futuro vibrante, colorido e repleto de oportunidades.

EPÍGRAFE

Uma das coisas que aprendi é que se deve viver apesar de. Apesar de, se deve comer. Apesar de, se deve amar. Apesar de, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio apesar de que nos empurra para a frente. Foi o apesar de que me deu uma angústia que insatisfeita foi a criadora de minha própria vida. (Lispector, 1969).

RESUMO

O estudo avaliou a atividade antibacteriana e antibiofilme de quercetina em nanopartículas de zeína e revestidas com quitosana (QUER-ZNP-CH) frente a cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae*. As QUER-ZNP-CH foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e, em seguida, foram caracterizadas através do tamanho de partículas (\varnothing), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e eficiência de encapsulação (%EE). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) do produto nanobiotecnológico desenvolvido foram realizadas pelo método da microdiluição em caldo seguindo o CLSI, e a atividade de inibição e erradicação do biofilme foram realizadas pelo método do cristal violeta. A concentração inibitória mínima (CIM) da quercetina para todas as cepas testadas variou entre 250 e >1000 $\mu\text{g/mL}$, e a concentração bactericida mínima (CBM) da quercetina foi >1000 $\mu\text{g/mL}$ em todas as cepas testadas. A nanoencapsulação potencializou a atividade antibacteriana da quercetina com CIM variando entre 3,90 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e CBM variando entre 15,6 e 125 $\mu\text{g/mL}$. O potencial de inibição do biofilme da quercetina isolada variou entre 40-60%, enquanto a QUER-ZNP-CH apresentou inibição de 60-100%. O potencial de erradicação do biofilme também foi potencializado, com valores de erradicação de 0-60% para quercetina isolada, contra 25-95% da QUER-ZNP-CH. Assim, espera-se que com o desenvolvimento deste projeto seja desenvolvida uma formulação de base nanotecnológica promissora para o tratamento de infecções bacterianas causadas por cepas de *K. pneumoniae* multidrogas-resistentes.

Palavras-chave: quercetina; nanopartículas de zeína; quitosana; *Klebsiella pneumoniae* resistente; atividade antibacteriana e antibiofilme.

ABSTRACT

The study evaluated the antibacterial and antbiofilm activity of quercetin in nanoparticles of zein and coated with chitosan (QUER-ZNP-CH) against resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. QUER-ZNP-CH were prepared by the nanoprecipitation method and then were characterized by particle size (\varnothing), polydispersion index (PDI), zeta potential (ζ) and encapsulation efficiency (%EE). The concentration of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the developed nanobiotechnological product was performed by the broth microdilution method following the CLSI, and the eradication and biofilm eradication activity was performed by the crystal violet method. The inhibitory concentration (MIC) of quercetin for all tested strains ranged between 250 and >1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the minimum bactericidal concentration (MBC) of quercetin was >1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in all minimal strains. Nanoencapsulation potentiated the antibacterial activity of quercetin with MIC ranging from 3.90 to 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and CBM ranging from 15.6 to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The potential for involvement of the educational quercetin biofilm varied between 40-60%, while the QUER-ZNP-CH presented 60-100%. The biofilm eradication potential was also enhanced, with eradication values of 0-60% for primary quercetin versus 25-95% for QUER-ZNP-CH. Thus, it is expected that with the development of this project, a promising nanotechnology-based formulation will be developed for the treatment of bacterial overlays caused by multidrug-resistant strains of *K. pneumoniae*.

Keywords: quercetin; zein nanoparticles; chitosan; resistant *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial and antbiofilm activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Ilustração esquemática da formação do biofilme	17
Figura 2 –	Estrutura química da quercetina	18
Figura 3 –	Modelos estruturais 3D propostos para α -zeína. Modelo cilíndrico (A); modelo tipo fita (22 kDa) (B); modelo hairpin (19 kDa) (C); modelo estrutural super helicoidal (19 kDa) (D)	22
Figura 4 –	Estrutura geral da quitosana (DA: grau de acetilação)	24
Figura 5 –	Avaliação da inibição do biofilme de QUER e QUER-ZNP-CH frente a isolados de <i>K. pneumoniae</i> (%)	34
Figura 6 –	Avaliação da erradicação do biofilme de QUER e QUER-ZNP-CH frente a isolados de <i>K. pneumoniae</i> (%)	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização físico-química das QUE-ZNP-CH	35
Tabela 2 –	Atividade antibacteriana da queracetina e da queracetina encapsulada em nanopartículas de zeína revestida com quitosana	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QUER	Quercetina
CH	Quitosana
QUER-ZNP-CH	Nanopartículas de zeína contendo quercetina revestidas com quitosana
Ø	Tamanho de partícula
PDI	Índice de Polidispersão
ζ	Potencial Zeta
%EE	Eficiência de Encapsulação
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEMB	Concentração de Erradicação Mínima de Biofilme
CIMB	Concentração de Inibição Mínima de Biofilme
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
mV	Milivolt
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	BACILOS GRAM-NEGATIVOS (BGNs) e Klebsiella pneumoniae	15
2.2	BIOFILMES E RESISTÊNCIA BACTERIANA	16
2.3	QUERCETINA	17
2.4	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	19
2.4.1	Nanopartículas de zeína	21
2.4.2	Quitosana	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO QUERCETINA REVESTIDAS COM QUITOSANA (QUER-ZNP- CH)	26
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES	26
4.2.1	Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas	26
4.2.2	Eficiência de encapsulação de quercetina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana	27
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	27
4.4	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	28
4.5	AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DO BIOFILME	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	30
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS NANOFORMULAÇÕES	31
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DAS NANOFORMULAÇÕES	33
6	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo gram-negativo de grande importância clínica, pois é um dos patógenos de caráter oportunista com predomínio nas infecções nos ambientes de saúde. Essas infecções são particularmente comuns em pacientes com comorbidades, neonatos, idosos, imunocomprometidos ou imunossuprimidos. Além disso, cepas de *K. pneumoniae* possuem a capacidade de adquirir diferentes genes de resistência, incluindo genes responsáveis pela produção de bomba de efluxo e síntese de β-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases (KPC) (Russo; Marr, 2019; Wyres; Lam; Holt, 2020).

Além disso, essa espécie tem a capacidade de formar biofilme, nos quais suas células ficam imersas em uma matriz automontada composta por polissacarídeos, proteínas e DNA. Essa matriz proporciona a adesão desse patógeno a cateteres e superfícies internas de dispositivos médicos, representando um desafio adicional no tratamento dessas infecções (Piperaki *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Neste cenário, a utilização de espécies vegetais como fonte de moléculas biologicamente ativas tem sido uma estratégia fundamental na busca por princípios ativos para superar a resistência bacteriana (Fernebro, 2011; Brahmachari, 2012; Carneiro *et al.*, 2022). A quercetina é um flavonoide que pertence à subclasse dos flavonóis, e possui sua atividade antioxidante bem elucidada devido à presença de um grupo hidroxila fenólico e ligações duplas em sua estrutura. Esse composto tem se destacado pelas suas propriedades antibacterianas e antibiofilme (Xu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020).

Entretanto, esta molécula apresenta baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral. Assim, a encapsulação da quercetina em nanossistemas surge como uma estratégia tecnológica promissora para viabilizar a aplicação desse composto no tratamento de infecções bacterianas resistentes a antimicrobianos comerciais (Choudhary *et al.*, 2020; Grewal *et al.*, 2021).

A encapsulação de compostos biologicamente ativos em nanopartículas de zeína tem-se ganhado cada vez mais notoriedade na comunidade científica. A zeína é uma proteína extraída do milho, que possui propriedades físico-químicas e composição química ideais para formação de nanossistemas (Kasaai, 2018; Yan *et al.*, 2022).

Estes nanossistemas viabilizam a encapsulação de moléculas hidrofóbicas em sua matriz polimérica, o que resulta em maior estabilidade e controle de liberação quando administrado por via oral, nasal e intravenosa (Peñalva *et al.*, 2015; De Marco, 2022). Ademais, o revestimento da superfície de nanopartículas de zeína com quitosana fornece maior proteção à molécula encapsulada, favorecendo sua liberação controlada no organismo e potencializando o efeito terapêutico dos compostos ativos (Li *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2022). Assim, encapsular quercetina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana é uma estratégia promissora para potencializar a ação antibacteriana e antibiofilme frente a cepas resistentes de *K. pneumoniae*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BACILOS GRAM-NEGATIVOS (BGNs) e *Klebsiella pneumoniae*

Os bacilos Gram-negativos (BGNs) são microrganismos em formato de bastão caracterizados pela coloração de Gram. Estas bactérias possuem uma estrutura celular única, sendo compostas por membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS) e porinas numa membrana externa, uma fina camada de peptidoglicano na membrana interna e um espaço periplasmático (Wieland; Chhatwal; Vonberg, 2018; Pontefract *et al.*, 2020).

Esses patógenos são comumente encontrados na microbiota intestinal e da pele. Contudo podem causar infecções no trato respiratório e digestório, principalmente, devido à capacidade de evadir do sistema imune e de produzir de fatores de virulência (Pickard *et al.*, 2017).

As infecções causadas por BGNs representam um desafio crescente para a saúde pública, estando associadas a taxas elevadas de morbimortalidade, além de internações hospitalares prolongadas (Agyepong *et al.*, 2018; Jubeh; Breijeh; Karaman, 2020). Em particular, *Klebsiella pneumoniae*, uma espécie importante dentro desse grupo de patógenos, destaca-se como responsável por infecções resistentes relacionadas à assistência à saúde (Effah *et al.*, 2020).

Klebsiella pneumoniae é um BGN pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo não móvel, encapsulado e anaeróbio facultativo, podendo crescer tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (Sathyavathy; Madhusudhan, 2020). Além disso, essa espécie possui cápsula, capacidade de fermentar glicose, sacarose e lactose, não possui citocromo oxidase, hidrolisa ureia e apresenta aspecto mucoide (Vuotto *et al.*, 2017; Koneman *et al.*, 2018; Kano, 2020). Alguns fatores de virulência deste patógeno são a cápsula polissacarídica, lipopolissacárido, fímbrias tipo 1 e tipo 3, proteínas de membrana externa e determinantes para aquisição de ferro e uso de fonte de nitrogênio (Nirwati *et al.*, 2019).

Klebsiella pneumoniae juntamente com *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*, foram listadas, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como algumas das principais bactérias a causarem infecções com altos índices de

morbimortalidade, formando o grupo conhecido como ESKAPE. Esses patógenos apresentam elevado índice de resistência aos antimicrobianos e podem causar pneumonia, endocardite, meningite, infecções cirúrgicas, septicemia e síndrome do choque tóxico (Dar *et al.*, 2022).

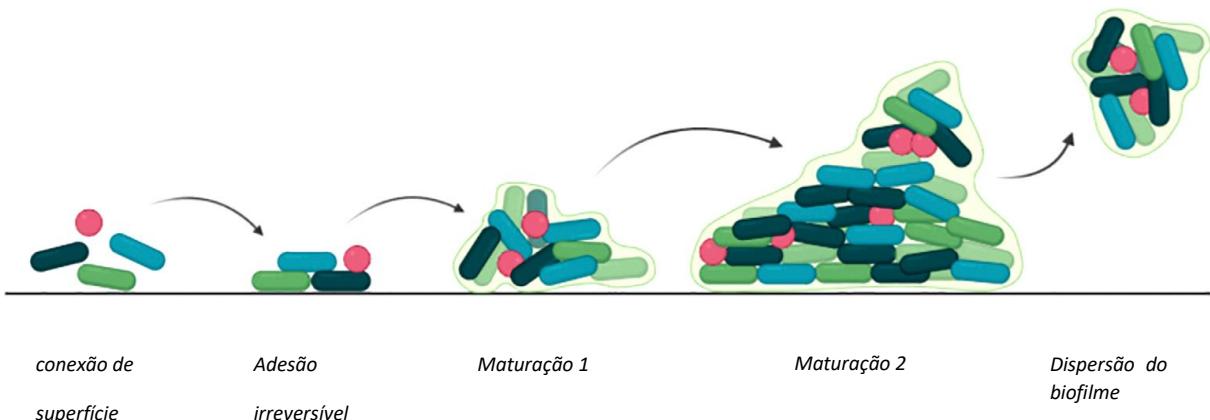
A *K. pneumoniae* é responsável por infecções em ambientes de assistência à saúde, principalmente em pacientes que possuem comorbidades, recém-nascidos, idosos, imunocomprometidos ou com dispositivos intravasculares, tubo endotraqueal e feridas cirúrgicas, levando a infecções que podem progredir para bactеремia. Além disso, cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentam a capacidade de adquirir diversos genes de resistência, como genes responsáveis pela produção de β-lactamases de espectro estendido (ESBLs), bem como os genes que codificam carbapenemases (Russo; Marr, 2019; Wyres; Lam; Holt, 2020). Ademais, *K. pneumoniae* é produtora de biofilme frequentemente presente em cateteres e superfícies internas de dispositivos médicos (Piperaki *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

2.2 BIOFILMES E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os biofilmes são estruturas da ecologia bacteriana formadas por comunidades de microrganismos, envoltas em uma matriz de polissacarídeos contendo proteínas e DNA, que possibilita a resistência aos antimicrobianos, crescimento lento, transferência horizontal de genes e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. As infecções causadas por cepas produtoras de biofilme, como cepas de *K. pneumoniae*, são mais difíceis de eliminar e têm maior propensão à recidiva devido à resistência intrínseca do biofilme (Qi *et al.*, 2016; Saxena *et al.*, 2019).

O desenvolvimento do biofilme envolve quatro etapas (Figura 1), sendo elas: a) fixação na superfície ou tecido, crescimento séssil controlado pela interação intercelular e fatores de *quorum sensing* (QS); b) maturação do biofilme com síntese de matriz de substâncias exopoliméricas (EPS); e c) desprendimento induzido por fatores de desmontagem. Na formação do biofilme em *K. pneumoniae*, fímbrias e os polissacarídeos capsulares são estruturas de superfície essenciais para automontagem e intercomunicação do biofilme (Saxena *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). Além disso, a expressão de marcadores de resistência e as limitações de difusão na matriz extracelular tornam as bactérias do biofilme de *K. pneumoniae* altamente resistentes ao tratamento com antibióticos (Sun *et al.*, 2020).

Figura 1 – Ilustração esquemática da formação do biofilme.



Fonte: Adaptado de Almeida-Campos *et al.* (2022).

K. pneumoniae apresenta vários mecanismos de resistência aos antibióticos. Um dos principais mecanismos é a produção de bombas de efluxos e de enzimas como beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases, juntamente com a perda ou alteração funcional de porinas. Essas enzimas são capazes de inativar uma ampla variedade de antibióticos, incluindo os carbapenêmicos (Nirwati *et al.*, 2019; Mędrzycka-Dąbrowska *et al.*, 2021).

Os mecanismos de resistência bacteriana mencionados são adquiridos por meio da transferência horizontal de genes, tornando o tratamento convencional dessas infecções ineficaz, principalmente em ambientes hospitalares. As infecções causadas por BGNs representam mais de 30% dos casos, incluindo infecções do trato urinário, pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremia, septicemia e infecções nas unidades de terapia intensiva (Pontefract *et al.*, 2020; Holmes *et al.*, 2021). Assim, com o aumento alarmante da resistência aos antibióticos, a produção de biofilme e a limitação nas opções terapêuticas recentes, é necessário adotar novas estratégias incluindo a utilização de produtos naturais com efeito antimicrobiano e antibiofilme.

2.3 QUERCETINA

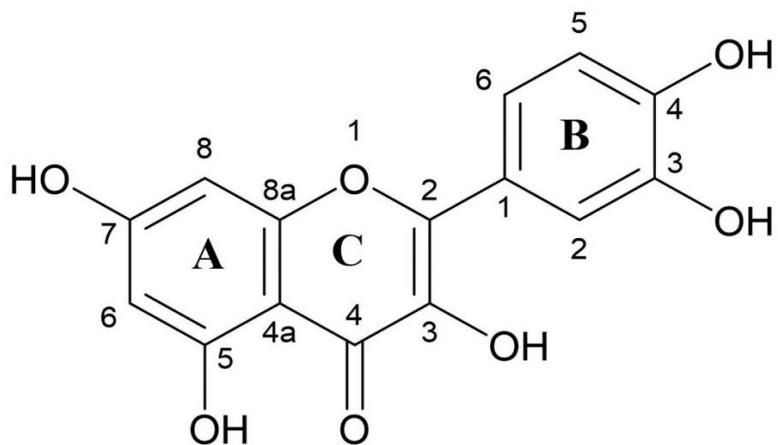
As espécies vegetais se destacam como uma fonte inesgotável para bioprospecção de moléculas biologicamente ativas e têm sido uma das principais fontes de agentes medicinais ao longo dos anos. Os produtos naturais apresentam,

comumente, amplo espectro de ação e podem ser manipulados em diferentes formas farmacêuticas e com atividade frente a inúmeros patógenos conhecidos. Assim, esses produtos desempenham um papel inestimável no tratamento de infecções (Fernebro, 2011; Brahmachari, 2012; Carneiro *et al.*, 2022).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-2-fenilcromeno-4-ona) é o principal constituinte da subclasse de flavonoides denominada flavonóis, amplamente distribuída em diversas espécies vegetais alimentícias, tais como *Brassica oleracea* L. (couve), *Allium cepa* L. (cebola), *Malus domestica* (Suckow) Borkh. (maçãs), *Vitis vinifera* L. (uvas vermelhas), *Brassica oleracea* L. (brócolis) e *Prunus avium* (L.) L. (cerejas), além de ser encontrada em bebidas como determinados tipos de chá e vinho tinto (Xu *et al.*, 2019).

Este flavonoide apresenta em sua estrutura molecular um grupo cetocarbonila, com o átomo de oxigênio da carbonila de caráter básico sendo capaz de formar sais com ácidos fortes. Sua molécula é caracterizada por quatro grupos funcionais ativos, incluindo um grupo di-hidroxila entre o anel A, um grupo o-dihidroxila no anel B, uma ligação dupla no carbono C3 e um grupo carbonila no C4 (Figura 1). Essas características estruturais são de grande importância para as propriedades químicas e bioativas dessa substância (Yang *et al.*, 2020; Alizadeh; Ebrahimzadeh, 2022).

Figura 2 – Estrutura química da quercetina.



Fonte: Adaptado de Ezati; Rhim, (2021).

Devido à presença de um grupo hidroxila fenólico e ligações duplas, a quercetina manifesta notável atividade antioxidante. Além disso, estudos in vitro e in vivo, com camundongos, demonstram que essa molécula exibe propriedades

antibacterianas e antibiofilme, além de inibir genes que promovem a angiogênese tumoral. Sua ação antibacteriana está associada à desestabilização da parede celular bacteriana e à modificação da permeabilidade celular, ocasionando perturbações na síntese de ácidos nucleicos e proteínas, bem como redução das reações bioquímicas e desregulação da osmolaridade (Yang *et al.*, 2020; Chittasupho *et al.*, 2022).

Nos alimentos, a quercetina apresenta-se principalmente na forma de glicosídeos de quercetina, os quais, após a ingestão, são hidrolisados no trato gastrointestinal, liberando a porção aglica (porção sem açúcar) que é absorvida e metabolizada, originando derivados glicuronídeos, metilados e sulfatados (Tang *et al.*, 2020).

Essa substância é altamente solúvel em lipídios e álcool, porém insolúvel em água (Di Petrillo *et al.*, 2022). A biodisponibilidade da quercetina é baixa, podendo variar de 0% a 50%. Após a ingestão de alimentos ou suplementos ricos em quercetina, sua biodisponibilidade diminui rapidamente, com uma meia-vida de eliminação de 1 a 2 horas. Tanto a forma glicosídica quanto a forma aglica da quercetina são absorvidas no intestino delgado por difusão passiva ou através do transportador orgânico de ânions polipeptídicos (Xu *et al.*, 2019; Grewal *et al.*, 2021).

A quercetina apresenta metabolismo complexo e biodisponibilidade variável, aspectos pertinentes para avaliar seus efeitos farmacológicos e potencial terapêutico. No entanto, seu uso terapêutico enfrenta desafios como a baixa solubilidade em água e a baixa biodisponibilidade oral. Assim, a encapsulação de moléculas biologicamente ativas em nanossistemas, especialmente em nanopartículas poliméricas, surge como uma alternativa tecnológica promissora para otimizar o potencial terapêutico da quercetina (Choudharay *et al.*, 2020; Grewal *et al.*, 2021).

2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A nanotecnologia é o campo científico voltado para a manipulação da matéria visando ao desenvolvimento de materiais em escala nanométrica (1 a <1000 nm). Os fenômenos quânticos dos nanomateriais possibilitaram sua aplicação em diversas áreas de pesquisa, incluindo medicina, saúde, química, física e engenharia (Patil; Mehta; Guvva, 2008; Ramos *et al.*, 2018). Quando aplicada à saúde, em especial no setor farmacêutico, essa tecnologia tem experimentado um grande avanço devido ao

seu uso no diagnóstico, prevenção e tratamento de inúmeras enfermidades (Lam *et al.*, 2017; Sultana *et al.*, 2020).

Doenças infecciosas e também as crônicas não transmissíveis, como asma, câncer, Alzheimer e diabetes são apenas algumas das enfermidades que têm se beneficiado amplamente dos avanços na nanotecnologia. Isso ocorre porque as propriedades físico-químicas dos nanomateriais proporcionam maior biodisponibilidade do fármaco, além de possibilitar sua passagem através de barreiras como a hematoencefálica, o sistema pulmonar, o endotélio de tumores e as paredes dos vasos sanguíneos, bem como as junções das células epiteliais da pele (Contera; Bernardino de La Serna; Tetley, 2020; Mazayen *et al.*, 2022).

Outros benefícios englobam a habilidade de direcionar os fármacos de forma seletiva e específica para células e/ou tecidos, mitigação da toxicidade, incremento na solubilidade e, consequentemente, da biodisponibilidade, necessidade de menor número de doses administradas, compatibilidade biológica com as membranas celulares e aceleração no início da ação terapêutica. Por conseguinte, uma maior adesão do paciente ao tratamento farmacoterapêutico, resultando em uma melhor qualidade de vida e uma expectativa de vida mais promissora (Lam *et al.*, 2017; Matteucci *et al.*, 2018).

Dentre as nanoestruturas conhecidas, as nanopartículas poliméricas têm se destacado como ferramentas promissoras para o transporte de fármacos, devido às suas propriedades versáteis e vantagens intrínsecas, como a capacidade de encapsular e proteger o fármaco, controle da liberação sustentada, biocompatibilidade, estabilidade físico-química e a possibilidade de ajustar suas características para atender às necessidades específicas de cada fármaco e aplicação clínica (Vauthier; Cabane; Labarre, 2008; Khalid; El-Sawy, 2017).

As nanopartículas poliméricas (NPs) têm se destacado na comunidade científica desde a descoberta de polímeros biodegradáveis, o que aponta para uma alternativa mais segura e eficaz no desenvolvimento de nanossistemas para administração oral. As NPs podem ser caracterizadas como partículas coloidais sólidas com tamanhos que variam de 0 a 1000 nm (Sur *et al.*, 2019; Lang *et al.*, 2020).

Através de diferentes métodos de preparação e do polímero utilizado, é possível obter diferentes tipos de nanopartículas, sendo elas, nanocápsulas e nanoesferas (Dos Santos-Ramos *et al.*, 2018; Sur *et al.*, 2019).

Nanocápsulas são sistemas vesiculares com uma estrutura de morfologia núcleo-casca, na qual, há um núcleo interno de caráter aquoso ou oleoso que serve como reservatório para moléculas hidrofílicas ou lipofílicas, respectivamente. A casca é formada por um invólucro polimérico que protege e mantém os compostos biologicamente protegidos da degradação físico-química ou biológica, permitindo uma liberação controlada e sustentada no local desejado (Khalid; El-Sawy, 2017).

Por outro lado, as nanoesferas são sistemas matriciais compostos por uma matriz polimérica, na qual o polímero e o insumo farmacêutico ativo estão uniformemente dispersos, podendo o composto estar localizado no centro da esfera ou adsorvido em sua superfície (Cruchó; Barros, 2017).

Os métodos de síntese das nanopartículas podem influenciar no tipo de nanossistema que será obtido. Dentre as inúmeras técnicas utilizadas na pesquisa, a nanoprecipitação é um método que apresenta diversas vantagens, como facilidade de obtenção, baixo custo, facilmente escalável para indústria farmacêutica e proporciona uma distribuição homogênea de tamanhos de partículas (Gan *et al.*, 2020; Hernández-Giottonini *et al.*, 2020). A nanoprecipitação envolve o uso de duas fases miscíveis: uma fase orgânica, na qual o polímero e o princípio ativo estão dissolvidos e uma fase aquosa que, após sua adição causa uma deposição interfacial do polímero utilizado após o deslocamento do solvente orgânico (Lammari *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022).

Os polímeros naturais têm sido amplamente utilizados na síntese de nanopartículas poliméricas devido às suas características em comparação com outras nanopartículas baseadas em polímeros sintéticos (Rai; Alwani; Badea, 2019; Lang *et al.*, 2020). Entre os polímeros naturais, a zeína destaca-se por apresentar propriedades físico-químicas que potencializam sua aplicação na nanotecnologia, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade com os sistemas biológicas, consegue apresentar altas taxas de eficiência de encapsulação de compostos ativos e é aprovada para uso pela Food and Drug Administration (Abdelsalam *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2022).

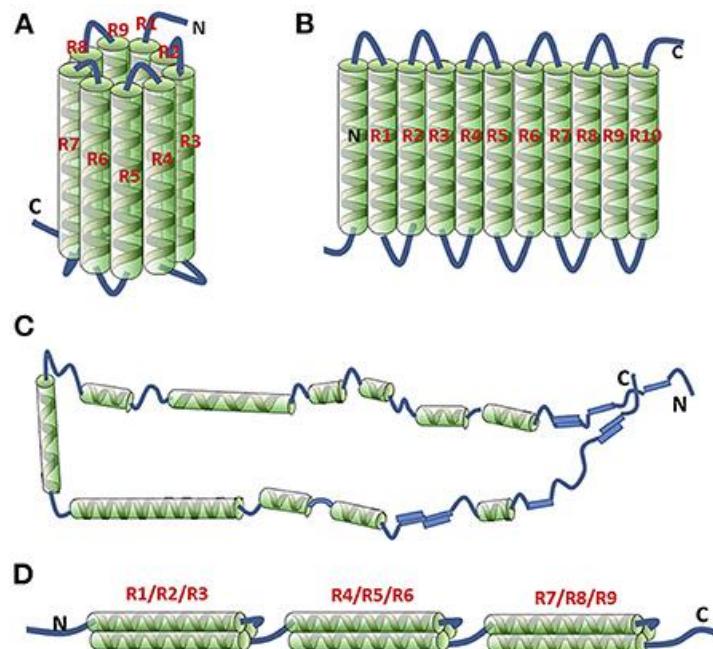
2.4.1 Nanopartículas de zeína

A zeína é uma proteína vegetal presente no milho, formada por diferentes frações peptídicas, sendo elas alfa, beta, gama e delta, que possuem diferentes tamanhos moleculares e solubilidades. A fração alfa é a mais abundante na zeína

comercial, constituindo cerca de 70-85% do total. Além disso, a zeína é composta por mais de 50% de aminoácidos apolares, como leucina, prolina, alanina, fenilalanina, valina e isoleucina, com menor presença de aminoácidos básicos e ácidos (Figura 2). Esta composição única confere à essa proteína propriedades físico-químicas interessantes para a formação de nanossistemas (Kasaai, 2018; Yan *et al.*, 2022).

As propriedades singulares de solubilidade dessa proteína são atribuídas à sua arquitetura estrutural, que é fortemente influenciada pelo pH, temperatura, agentes redutores e oxidantes, concentração iônica e interações com outras moléculas. As principais diferenças entre a zeína e outras proteínas vegetais estão associadas à sua baixa quantidade de lisina e triptofano (Tapia-Hernández *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2022).

Figura 3 – Modelos estruturais 3D propostos para α-zeína. Modelo cilíndrico (A); modelo tipo fita (22 kDa) (B); modelo hairpin (19 kDa) (C); modelo estrutural super helicoidal (19 kDa) (D).



Fonte: Yan *et al.*, 2022.

A zeína tem sido amplamente estudada para diversas finalidades, contemplando a administração oral de proteínas, como a insulina, aplicações em cultura de células, administração de vacinas, entre outros (Abdelsalam *et al.*, 2021). Além disso, a zeína tem sido moldada em formas versáteis, tais como nanopartículas, nanofibras e micelas para encapsulação de fármacos (Li; Yu, 2020).

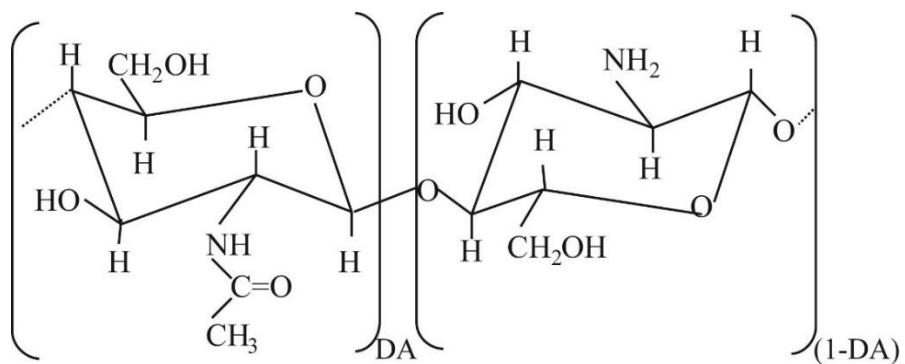
A encapsulação de compostos em nanopartículas de zeína, torna-se, então, uma estratégia tecnológica promissora, visto que este nanossistema possui a capacidade de encapsular compostos insolúveis em água, proporcionando estabilidade e controle de liberação quando administrada por via oral, resultando em uma maior biodisponibilidade e possibilitando a preparação de formas farmacêuticas com liberação controlada (Peñalva *et al.*, 2015; De Marco, 2022). O revestimento de superfície das nanopartículas zeína, especialmente com quitosana, desempenha um papel importante na melhoria da estabilidade físico-química, proteção do princípio ativo, aumento da eficiência de encapsulação e biodisponibilidade (Li *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2022).

2.4.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero modificado, muito similar à celulose, obtido por meio da desacetilação parcial da quitina, apresentando uma estrutura composta por 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranose e 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranose ligados em β -(1→4). Por possuir grupamentos amina e hidroxila na sua estrutura (Figura 3) é capaz de formar pontes de hidrogênio tanto intermoleculares quanto intramoleculares, o que lhe fornece uma estrutura cristalina rígida (Choi; Nam; Nah, 2016; Divya; Jisha, 2018).

Este polímero apresenta propriedades que o torna um material versátil e promissor. Suas principais características incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofilicidade, baixa toxicidade, alta biodisponibilidade, baixa antigenicidade e facilmente modificado quimicamente. Além disso, a quitosana é decomposta no corpo humano em aminoácidos que são facilmente absorvidos (Shariatina, 2019; Yu *et al.*, 2019). Atualmente, a quitosana é amplamente utilizada em diversas aplicações farmacêuticas, incluindo encapsulação e vetorização de fármacos, biofilmes para feridas, engenharia de tecidos, entre outros (Divya; Jisha, 2018).

Figura 4 – Estrutura geral da quitosana (DA: grau de acetilação).



Fonte: DESBRIÈRES; GUIBAL, 2018.

Dentre suas aplicações biológicas, sua propriedade antibacteriana é amplamente reconhecida. O mecanismo de ação antibacteriano da quitosana ocorre, principalmente, devido à interação eletrostática entre os grupos amino da glucosamina que apresentam cargas positivas e as membranas celulares carregadas negativamente das bactérias, desencadeando alterações na superfície celular, resultando na modificação da permeabilidade da membrana e levando ao desequilíbrio osmótico e ao efluxo de substâncias intracelulares, resultando na morte das células bacterianas (Li; Zhuang, 2020; Chandrasekaran; Kim; Chun, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação das atividades antibacteriana e antibiofilme da quercetina e de nanopartículas de zeína contendo quercetina revestidas com quitosana frente às cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogas-resistentes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanopartículas de zeína contendo quercetina e revestidas com quitosana;
- Realizar a caracterização físico-química quanto a tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação das formulações de base nanobiotecnológica;
- Avaliar a atividade antibacteriana da quercetina e de nanopartículas de zeína contendo quercetina revestidas com quitosana frente às cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogas-resistente;
- Avaliar a atividade antibiofilme da quercetina e de nanopartículas de zeína contendo quercetina revestidas com quitosana frente às cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogas-resistente.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE). Durante essa jornada científica, tive a oportunidade de trabalhar ao lado de pesquisadores altamente qualificados e experientes, além de ter acesso a recursos de ponta e tecnologias avançadas.

4.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA CONTENDO QUERCETINA REVESTIDAS COM QUITOSANA (QUER-ZNP-CH)

As nanopartículas de zeína (ZNPs) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação adaptado de Moreno *et al.* (2017). Para as nanopartículas de zeína contendo quercetina, inicialmente, a quercetina foi solubilizada em 1 mL de etanol absoluto. A zeína e a lisina foram solubilizadas em uma solução de etanol 70 %. A solução de zeína:lisina permaneceu sob agitação magnética por 30min e, em seguida, a solução de quercetina foi adicionada diretamente a solução de zeína:lisina sob agitação magnética por 30min. Posteriormente, a água ultrapura foi adicionada à suspensão de zeína e lisina através do método de gotejamento. Em seguida, ocorreu a evaporação do solvente orgânico através da rotaevaporação. Para o revestimento com a quitosana, após a síntese das nanopartículas de zeína, a solução de quitosana a 0,5% na proporção de 5:1 (v/v) de zeína:quitosana foi adicionada a dispersão sob agitação magnética por 1 h. Após a formulação, as nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH e eficiência de encapsulação.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES

4.2.1 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas

As nanopartículas foram mensuradas por espectroscopia de correlação de fôtons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do tamanho de partícula, 50 µL das nanopartículas foram diluídos em 950 µL de água purificada. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90°

e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico (nm). O potencial zeta das nanopartículas também foi medido após a diluição de 50 µL das amostras em 950 µL de água purificada. A carga superficial (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH das partículas foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnopen (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.2.2 Eficiência de encapsulação de quercetina em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana

Para determinar a EE%, uma curva padrão de QUER foi preparada em concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 µg/mL utilizando etanol como solvente. A eficiência de encapsulação (%EE) de QUER foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de QUER-ZNP-CH (1000 µL) foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000rpm g por 1h. Sessenta microlitros da amostra filtrada foram diluídos em etanol (Sánchez-Juárez, 2019). A QUER filtrada foi mensurada por espectrofotometria como descrito anteriormente e determinada seguindo a equação abaixo.

$$\%EE = \frac{\text{Total de QUER} - \text{filtrado de QUER}}{\text{Total de QUER}} \times 100$$

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022). Inicialmente, o caldo Mueller-Hinton (CMH) foi adicionado em placas de microdiluição com fundo em U. Em seguida, QUER e QUER-ZNP-CH foram adicionados através de diluição seriada. As suspensões bacterianas foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de McFarland, e em seguida, depositadas nos poços. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e após a incubação foi realizada a leitura por espectrofotometria no comprimento de onda de 620 nm. A CIM foi determinada

como a menor concentração capaz de inibir mais de 90% do crescimento microbiano. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota da amostra dos poços em que não houve crescimento foi inoculada em ágar Müller Hinton (AMH) e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após este período, a CBM foi determinada como a menor concentração que não há crescimento microbiano (CLSI, 2021).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição de fundo chato. Em seguida, QUER e QUER-ZNP-CH foram adicionadas nas concentrações de CIM/8, CIM/16 e CIM/32 e, posteriormente, foram adicionadas as suspensões bacterianas (105 UFC/mL) dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* ATCC 13883, K A2 26, K A2 29, K A2 312. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo), o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano (controle positivo). Após incubação, a inibição de produção de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (Stepanović *et al.*, 2000) e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (Albano *et al.*, 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias.

4.5 AVALIAÇÃO DA ERRADICAÇÃO DO BIOFILME

Os ensaios para avaliação da erradicação do biofilme foram realizados com as mesmas cepas do estudo anterior. Inicialmente, os inóculos bacterianos dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* ATCC 13883, K A2 26, K A2 29, K A2 31 foram ajustados na densidade de 0,5 da escala de McFarland em TSB + glicose e distribuídos nas placas de microdiluição. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h para permitir a formação do biofilme. Após incubação, o meio de cultura foi retirado e reposto um novo meio. Em seguida, QUER e QUER-ZNP-CH foram distribuídos nas microplacas nas concentrações de 8xCIM, 4xCIM, 2xCIM e CIM, estas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24h. O TSB sem inóculo foi utilizado como controle de esterilidade (controle negativo) e o TSB com inóculo foi utilizado como controle de crescimento microbiano

(controle positivo). Após incubação, a erradicação de biofilme foi quantificada pelo método do cristal violeta (Stepanović *et al.*, 2000) e os resultados foram expressos em porcentagem de erradicação (Albano *et al.*, 2019). Experimentos independentes em triplicata foram realizados para cada condição em diferentes dias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao $\bar{\phi}$, PDI, ζ , pH e %EE (tabela 1). A determinação do tamanho médio e do índice de polidispersão (PDI) das partículas é uma indicação de sua qualidade em relação à distribuição de tamanho e desempenha um papel fundamental na compreensão do seu transporte in vivo. Assim, nanossistemas com tamanhos entre 100 nm e 500 nm são principalmente endocitadas por células M do intestino e pelas células do epitélio respiratório. Já o PDI é utilizado para caracterizar o nível de heterogeneidade de uma distribuição de tamanhos de partículas, de modo que dispersões com PDI até 0,3 apresentam característica monodispersa (Griffin *et al.*, 2016; Danaei *et al.*, 2018).

O potencial Zeta (ζ) fornece uma avaliação da estabilidade potencial de um sistema coloidal. Quando todas as partículas suspensas possuem potencial zeta acima de $\pm 30\text{mV}$ há uma tendência de repulsão eletrostáticas entre elas, o que inibe a formação de agregados e confere estabilidade (Xu, 2008; Singh; Bharti; Meena, 2014; Cacua *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Caracterização físico-química das QUE-ZNP-CH.

Formulação	[QUER] (mg/mL)	$\bar{\phi}$ (nm)	PDI	ζ (mV)	%EE
QUER-ZNP-CH	0,5	$345,0 \pm 0,9$	0,248	$+51,1 \pm 0,2$	$99,9 \pm 0,6$

Fonte: Autoral.

QUER: quercetina; QUER-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestida com quitosana contendo quercetina.

A eficiência de encapsulação está relacionada com a natureza química das moléculas a serem encapsuladas, bem como a concentração de polímero e o método de encapsulação. As ZNPs quando formadas apresentam os aminoácidos hidrofóbicos voltados para o núcleo da partícula, permitindo a interação com a quercetina que apresenta caráter hidrofóbico de modo a facilitar a alta eficiência de encapsulação (Araujo *et al.*, 2021; Zou *et al.*, 2021). Assim, o $\bar{\phi}$, o PDI, o ζ , e a %EE encontrados neste estudo demonstram estabilidade da dispersão coloidal, afinidade

da molécula com as regiões hidrofóbicas do polímero de zeína, além de características promissoras para aplicação via oral e nasal.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS NANOFORMULAÇÕES

Os resultados da atividade antibacteriana (tabela 2) demonstram o potencial antibacteriano de QUER encapsulada nas nanopartículas de zeína revestidas com quitosana. A CIM de QUER variou entre >1000 e 250 µg/mL, e a CBM variou foi de >1000 em todas as cepas testadas. A CIM de QUER-ZNP-CH variou entre 31,25 e 3,90 µg/mL, e a CBM variou entre 125 e 15,6 µg/mL. Os valores de CIM e CBM, quando se compara a molécula não encapsulada e a encapsulada, apresentam uma redução de 32 a 64 vezes, indicando maior eficácia terapêutica com a utilização desse nanossistema.

Tabela 2 - Atividade antibacteriana da quercetina e da quercetina encapsulada em nanopartículas de zeína revestida com quitosana..

	QUER		QUER-ZNP-CH	
	CIM	CBM	CIM	CBM
	µg/mL			
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1000	>1000	15,6	62,5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	1000	>1000	31,25	62,5
<i>K. pneumoniae</i> A2 25	250	>1000	7,81	31,25
<i>K. pneumoniae</i> A2 26	>1000	>1000	31,25	125
<i>K. pneumoniae</i> A2 29	>1000	>1000	31,25	125
<i>K. pneumoniae</i> A2 31	>1000	>1000	15,6	31,25
<i>K. pneumoniae</i> A2 32	250	>1000	3,90	15,6

Fonte: Autoral.

QUER: quercetina; QUER-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestida com quitosana contendo quercetina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ATCC: American Type Culture Collection..

A QUER é um flavonoide com mecanismo de ação pela desestabilização da membrana, como, também, inibição da síntese de ácidos nucleicos, como a girase do DNA (Souza *et al.* 2015; Kumar; Verma; Singh 2016; Wang *et al.*, 2020). Além da ação

da quercetina, as cargas positivas da partícula devido ao revestimento com a quitosana pode potencializar a ação da quercetina ao desestabilizar a membrana externa das bactérias, devido à sua natureza catiônica, que interage com as membranas celulares de caráter negativo dos microrganismos, desestabilizando-as e permitindo a entrada da droga ao seu sítio alvo no meio intracelular bacteriano (Carlson *et al.*, 2008).

Além disso, por causa das propriedades físico-químicas avaliadas, o nanocarreador revestido com quitosana desenvolvido nesse estudo pode otimizar a administração de QUER por via oral e nasal, aumentando sua estabilidade aos fluidos gastrointestinais e biodisponibilidade, tornando-a uma opção para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *K. pneumoniae* (Sousa-Batista *et al.*, 2017; Nalini *et al.*, 2022).

A encapsulação de QUER possibilita o aumento da estabilidade da quercetina, diminuindo à degradação causada pela luz, oxigênio e temperatura, trazendo maior vida útil do composto biologicamente ativo e, também, uma liberação gradual e sustentada de QUER (Lee; Park, 2020; Zou *et al.*, 2021). Assim, a encapsulação de QUER promove uma maior interação com as bactérias em um período prolongado, e a utilização desta tecnologia proporciona maior segurança à molécula e sua liberação controlada, levando a valores de CIM e CBM menores para inibir o crescimento bacteriano ou erradicar as bactérias.

Alguns estudos foram realizados para avaliar a atividade antibacteriana de QUER. Dey, Ray e Hazra (2015) avaliaram a atividade antibacteriana da quercetina extraída do extrato de romã frente a *K. pneumoniae* produtora de ESBL e KPC isolados. A CIM e a CBM de QUER para cepas de *K. pneumoniae* produtora de ESBL variaram entre 64 e 256 µg/mL e 64 a 512 µg/mL para os isolados de KPC.

Pal e Tripathi (2020) avaliaram atividade antibacteriana da quercetina em *K. pneumoniae* patogênicas resistentes a carbapenêmicos. A QUER apresentou CIM de 128 µg/mL, indicando que a quercetina pode ser utilizada como agente terapêutico promissor.

Lin *et al.* (2021) verificaram o efeito sinérgico de quercetina e colistina em cepas de *K. pneumoniae* resistentes à colistina. Foi observado que, quando em associação, a quercetina é capaz de promover uma diminuição na CIM da colistina de quatro cepas de *K. pneumoniae* (FK610, FK 1913, FK4134 e FK6663).

Outros estudos foram realizados avaliando a atividade antibacteriana de QUER encapsulada em nanocarreadores. No estudo realizado por Valencia *et al.* (2021), foram sintetizadas nanopartículas de lecitina-quitosana contendo quercetina e foi possível observar que a nanoformulação apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas. Entretanto, foi reportada maior eficácia contra as bactérias gram-negativas, como *Salmonella paratyphi*, *Vibrio parahemolyticus* e *Escherichia coli*, com valores de CIM de 1,56, 0,78 e 0,09 µg/mL, respectivamente.

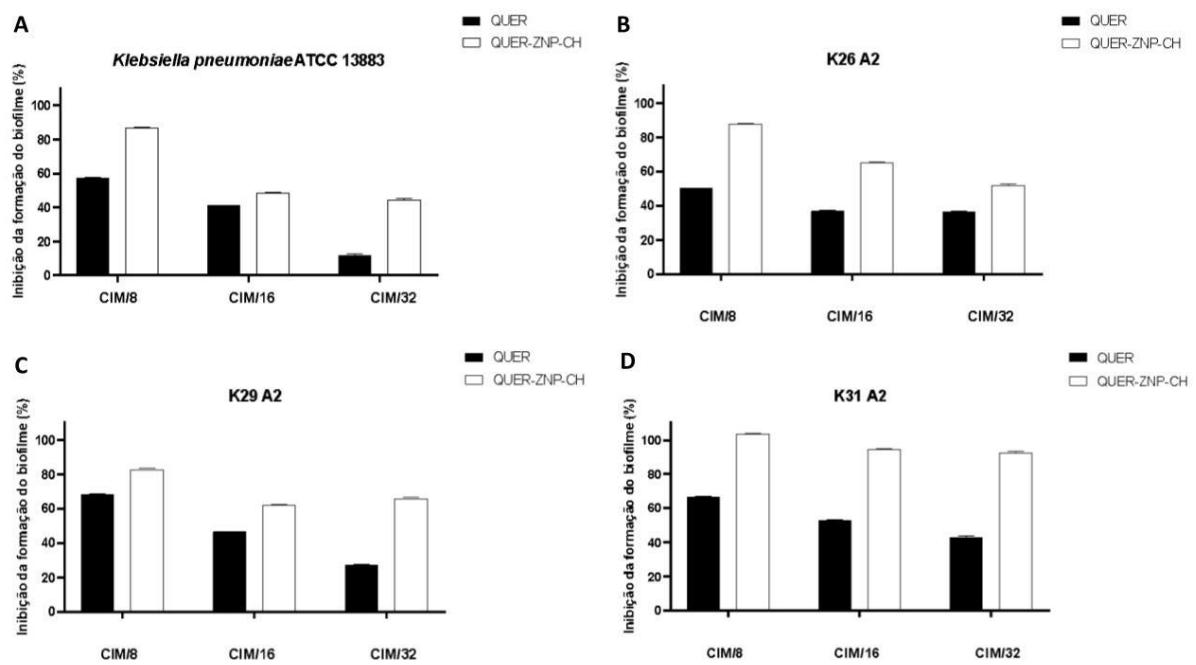
Han *et al.* (2022) realizaram a comparação de nanopartículas de prata e nanopartículas de prata assistidas por quercetina e verificaram que, com a utilização da quercetina, houve uma inibição mais efetiva do crescimento bacteriano, com atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*), no qual, a CIM foi de 7,8 µg/mL, e 3,9 µg/mL para *E. coli* e *S. enterica*, respectivamente.

Assim, torna-se relevante ressaltar que a encapsulação da QUER potencializa sua ação antibacteriana diminuindo os valores de CIM e CBM quando comparada à forma não encapsulada. Sendo assim, essa abordagem representa uma estratégia tecnológica promissora para o desenvolvimento de sistemas antimicrobianos mais eficazes e estáveis (Pinheiro; Pinheiro; Neves, 2021; Nalini *et al.*, 2022b).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DAS NANOFORMULAÇÕES

Para realização desses ensaios, foram utilizadas apenas as cepas que produziram o biofilme de forma moderada ou forte (*K. pneumoniae* ATCC 13883, K26 A2, K29 A2, K31 A2). Os resultados da atividade antibiofilme demonstram a potencialização da inibição e erradicação de biofilmes após a encapsulação de QUER nas nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, no qual, o potencial de inibição do biofilme da quercetina isolada variou entre 40-60%, enquanto a QUER-ZNP-CH apresentou inibição de 60-100% e o potencial de erradicação do biofilme com valores de erradicação de 0-60% para quercetina isolada, contra 25-95% da QUER-ZNP-CH (figura 5 e 6).

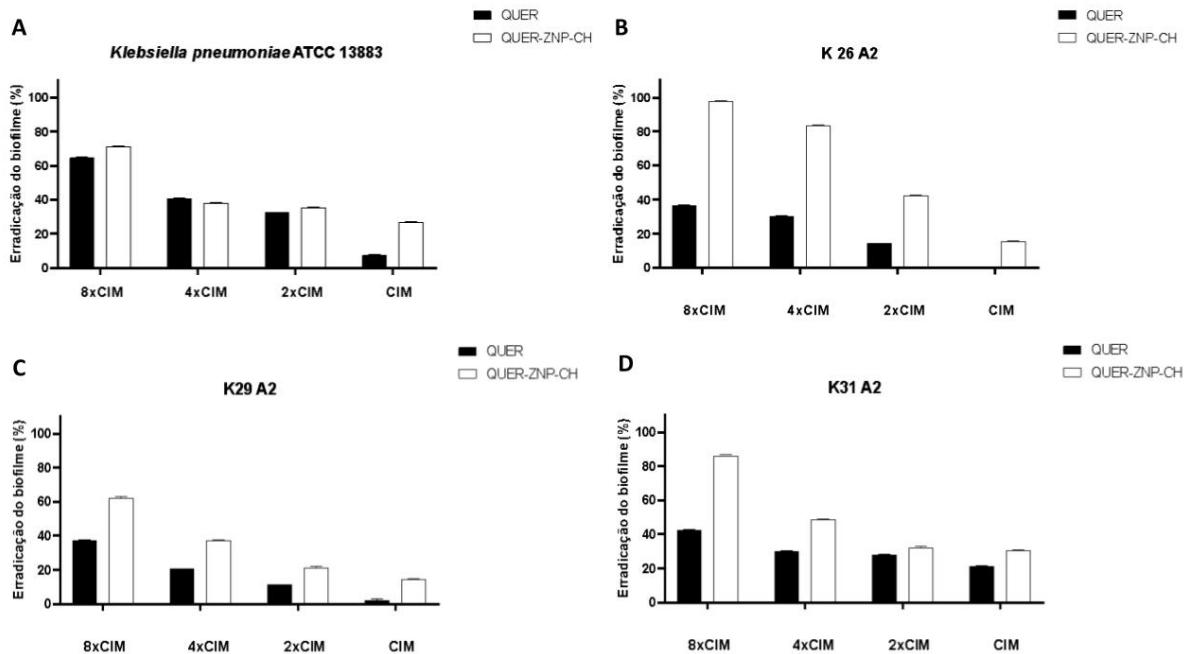
Figura 5 – Avaliação da inibição do biofilme de QUER e QUER-ZNP-CH frente a isolados de *K. pneumoniae* (%).



Fonte: Autoral.

QUER: quercetina; QUER-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestida com quitosana contendo quercetina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ATCC: American Type Culture Collection; K: *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 6 - Avaliação da erradicação do biofilme de QUER e QUER-ZNP-CH frente a isolados de *K. pneumoniae* (%).



Fonte: Autoral.

QUER: quercetina; QUER-ZNP-CH: nanopartículas de zeína revestida com quitosana contendo quercetina; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; ATCC: American Type Culture Collection; K: *Klebsiella pneumoniae*.

Biofilmes de *K. pneumoniae* podem colonizar os tratos respiratório, gastrointestinal e urinário, levando ao desenvolvimento de infecções invasivas, especialmente em pacientes imunodeficientes e imunossuprimidos. Dentro dos biofilmes, as células de *K. pneumoniae* são parcialmente protegidas das defesas imunológicas, e sua resistência aos antibióticos é aumentada devido ao estado de crescimento bacteriano fornecido pela complexidade da matriz. Inibir o desenvolvimento de biofilmes é uma abordagem terapêutica importante no tratamento de infecções bacterianas (Vuotto *et al.*, 2014; Piperaki *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Nesse sentido, alguns estudos avaliaram a capacidade da quercetina de inibir e erradicar o biofilme de bacilos Gram-negativos.

Vipin *et al.* (2019) avaliaram a atividade antibiofilme contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados revelaram que em uma concentração de 500 µg/ml, a quercetina foi capaz de inibir completamente (100%) todos os isolados testados, sugerindo seu possível uso como agente terapêutico no combate a infecções causadas por essa bactéria.

Zhang e Cheng (2022) discutiram sobre as próteses colocadas nas articulações de lesões ósseas e como essas próteses estão associadas ao desenvolvimento de infecções bacterianas com formação de biofilme. A atividade de erradicação do biofilme através da atividade da quercetina isolada apresentou uma redução significativa do biofilme em $87,64 \pm 7,56\%$.

Outros estudos foram realizados avaliando a atividade antibiofilme de QUER encapsulada/associada a nanocarreadores. Yu *et al.* (2018) também investigou o efeito inibitório de nanopartículas de prata associadas à quercetina para avaliação da inibição do biofilme de *Escherichia coli*. Nessa pesquisa, a concentração de 20 µg/mL da nanoformulação foi capaz de inibir em cerca de 50% o biofilme de *Escherichia coli*.

Messias *et al.* (2022) desenvolveram nanopartículas de quitosana contendo quercetina frente isolados multirresistentes de *E. coli*. Em uma concentração subinibitória de 25 mg/ml da nanoformulação, houve uma redução da formação do biofilme em cerca de 50%. Além disso, a concentração subinibitória também prejudicou a produção de exopolissacarídeos, com uma redução de 91,22%.

A atividade de inibição e erradicação do biofilme através das nanoformulações pode ser atribuída à ação da quercetina, visto que este flavonoide pode atuar na alteração de genes envolvidos na formação, desenvolvimento, maturação e estabilização dos biofilmes, reduzindo a adesão das bactérias às superfícies e interrompendo as interações entre bactérias patogênicas, incluindo *K. pneumoniae* (Vazquez-Armenta *et al.*, 2018).

A presença de cinco hidroxilos em sua estrutura contribui para seus efeitos inibitórios na formação do biofilme quando comparada a outros flavonoides. Ademais, a carga positiva da quitosana pode opsonizar a bactéria, impedindo a adesão, bem como facilitando a entrega da quercetina alterando a produção de moléculas envolvidas na produção de EPS e no QS (Messias *et al.*, 2022).

Além disso, a carga positiva associado ao tamanho de partícula menor que 500nm facilita a entrada das nanoestruturas nos canalículos e poros de água presentes nos biofilmes, permitindo a liberação do princípio ativo no núcleo da estrutura facilitando a ação desestabilizadora da quercetina (Azzem *et al.*, 2022).

Assim, a encapsulação da quercetina em ZNPs revestidas com quitosana potencializa a ação antibiofilme, e consolida-se como promissor para estudos in vivo, pois o uso de biopolímeros, como a zeína e a quitosana, apresenta-se mais seguro e ecológico (Messias *et al.*, 2022).

6 CONCLUSÃO

Foram sintetizadas nanopartículas de zeína contendo quercetina e revestidas com quitosana através do método de nanoprecipitação, as quais demonstraram características físico-químicas em conformidade com os parâmetros esperados. Além disso, QUER-ZNP-CH demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* e mostrou potencial para potencializar a inibição e erradicação de biofilmes de cepas de *K. pneumoniae*. Dessa forma, esse estudo traz importantes contribuições científicas e avanços tecnológicos na área de nanobiotecnologia, além da possibilidade depósito de patente e transferência de tecnologia para indústria farmacêutica para o desenvolvimento de um produto farmacêutico destinado ao tratamento de infecções causadas por cepas de *K. pneumoniae* multidrogas-resistentes, visando proporcionar uma melhor terapia da doença e contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes afetados.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, A. M. *et al.* Surface-tailored zein nanoparticles: Strategies and applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1354, 2021.
- ABID, H. M. U. *et al.* Wound-healing and antibacterial activity of the quercetin-4-formyl phenyl boronic acid complex against bacterial pathogens of diabetic foot ulcer. **ACS omega**, v. 7, n. 28, p. 24415-24422, 2022.
- AGYEONG, N. *et al.* Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in a teaching hospital in Ghana. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018.
- ALBANO, M. *et al.* Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. **Microbial pathogenesis**, v. 126, n. 1, p. 231-238, 2019.
- ALIZADEH, S. R.; EBRAHIMZADEH, M. A. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 229, n. 1, p. 114068, 2022.
- ARAUJO, J. T. C. *et al.* Development of anacardic acid-loaded zein nanoparticles: Physical chemical characterization, stability and antimicrobial improvement. **Journal of Molecular Liquids**, v. 332, p. 115808, 2021.
- BRAHMACHARI, G. Natural products in drug discovery: impacts and opportunities - an assessment. **Bioactive natural products: opportunities and challenges in medicinal chemistry**, v.1, n. 1, p. 1-199, 2012.
- BREIYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.
- CACUA, K. *et al.* Concentração de surfactante e efeitos de pH nos valores de potencial zeta de nanofluidos de alumina para inspecionar a estabilidade. **Colóides e Superfícies A: Aspectos Físico-Químicos e de Engenharia**, v. 583, p. 123960, 2019.
- CARLSON, R. P. *et al.* Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 8, p. 1035-1046, 2008.
- CARNEIRO, D. C. *et al.* A patent review of the antimicrobial applications of lectins: Perspectives on therapy of infectious diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 841-854, 2022.
- CHAHARDOLI, A. *et al.* Optimization of Quercetin-Assisted Silver Nanoparticles Synthesis and Evaluation of Their Hemocompatibility, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial effects. **Global Challenges**, v. 5, n. 12, p. 2100075, 2021.
- CHANDRASEKARAN, M.; KIM, K. D.; CHUN, S. C. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. **Processes**, v. 8, n. 9, p. 1173, 2020.

- CHITTASUPHO, C. *et al.* Effects of quercetin and curcumin combination on antibacterial, antioxidant, in vitro wound healing and migration of human dermal fibroblast cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 1, p. 142, 2021.
- CHOI, C.; NAM, J. P.; NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1-10, 2016.
- CHOUDHARY, A *et al.* Quercetin loaded chitosan tripolyphosphate nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in Wistar rats. **European journal of pharmacology**, v. 880, n. 1, p. 173172, 2020.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 27th Edition (M100-S27). Wayne, PA, 2021.
- CONTERA, S.; BERNARDINO DE LA SERNA, J.; TETLEY, T. D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 6, p. 551-554, 2020.
- CRUCHO, C. I. C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering**: C, v. 80, p. 771-784, 2017.
- DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.
- DAR, M. A. *et al.* Antibacterial activity of cerium oxide nanoparticles against ESKAPE pathogens. **Crystals**, v. 12, n. 2, p. 179, 2022.
- DE MARCO, I. Zein microparticles and nanoparticles as drug delivery systems. **Polymers**, v. 14, n. 11, p. 2172, 2022.
- DESBRIÈRES, J.; GUIBAL, E. Chitosan for wastewater treatment. **Polymer international**, v. 67, n. 1, p. 7-14, 2018.
- DEY, D.; RAY, R.; HAZRA, B. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 10, p. 1474-1480, 2015.
- DIVYA, K.; JISHA, M. S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. **Environmental chemistry letters**, v. 16, p. 101-112, 2018.
- DI PETRILLO, A. *et al.* Quercetin and its derivates as antiviral potentials: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 266-278, 2022.
- DONG, H. *et al.* Preparation and characterization of nanoparticles from field pea starch by batch versus continuous nanoprecipitation techniques. **Food Hydrocolloids**, v. 122, p. 107098, 2022.

- DOS SANTOS-RAMOS, M. A. D. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1179, 2018.
- EFFAH, C. Y. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2020.
- ERCI, F. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Carboxymethyl Cellulose Stabilized Silver Nanoparticles Synthesized using Quercetin and Their Effects on Soil Respiration and Enzymes. **Geomicrobiology Journal**, v. 39, n. 8, p. 679-688, 2022.
- EZATI, P.; RHIM, J. W. Fabrication of quercetin-loaded biopolymer films as functional packaging materials. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 3, n. 4, p. 2131-2137, 2021.
- FERNEBRO, J. Fighting bacterial infections - future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 125-139, 2011.
- GAN, Z. *et al.* Preparation of carbon nitride nanoparticles by nanoprecipitation method with high yield and enhanced photocatalytic activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 2, p. 513-516, 2020.
- GREWAL, A. K. *et al.* Mechanistic insights and perspectives involved in neuroprotective action of quercetin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, n. 1, p. 111729, 2021.
- GRiffin, B. T. *et al.* Pharmacokinetic, pharmacodynamic and biodistribution following oral administration of nanocarriers containing peptide and protein drugs. **Advanced drug delivery reviews**, v. 106, p. 367-380, 2016.
- HAMZAH, H. *et al.* Efficacy of quercetin against polymicrobial biofilm on catheters. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 11, p. 5277-5282, 2020.
- HAN, K. *et al.* Synthesis of Biomolecule Functionalized Biocompatible Silver Nanoparticles for Antioxidant and Antibacterial Applications. **Coatings**, v. 12, n. 9, p. 1292, 2022.
- HERNÁNDEZ-GIOTTONINI, K. Y. *et al.* PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters. **Rsc Advances**, v. 10, n. 8, p. 4218-4231, 2020.
- HOLMES, C. L. *et al.* Pathogenesis of Gram-negative bacteremia. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. e00234-20, 2021.
- HU, D. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **Journal of food engineering**, v. 109, n. 3, p. 545-552, 2012.
- JUBEH, B.; BREIYEH, Z.; KARAMAN, R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2888, 2020.

KANO, C. H. Disseminação de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC): revisão epidemiológica. **Disseminação de Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC): revisão epidemiológica**, p. 38-38, 2020.

KASAAI, M. R. Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 184-197, 2018.

KÄTZEL, D. I. U. **Dynamic light scattering for the characterization of polydisperse fractal systems by the example of pyrogenic silica**. 2007.

KHALID, M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 675-691, 2017.

KHAN, M. A. et al. Alginate/chitosan-coated zein nanoparticles for the delivery of resveratrol. **Journal of Food Engineering**, v. 258, p. 45-53, 2019.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2018.

KUMAR, V. D.; VERMA, P. R. P.; SINGH, S. K. Morphological and in vitro antibacterial efficacy of quercetin loaded nanoparticles against food-borne microorganisms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 638-650, 2016.

LAM, P. L. et al. Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. **Nanomedicine**, v. 12, n. 4, p. 357-385, 2017.

LAMMARI, N. et al. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 5, p. 431, 2020.

LANG, X. et al. Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, n. 1, p. 433-445, 2020.

LEE, Y. J.; PARK, Y. Green synthetic nanoarchitectonics of gold and silver nanoparticles prepared using quercetin and their cytotoxicity and catalytic applications. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 20, n. 5, p. 2781-2790, 2020.

LI, H. et al. Zein/soluble soybean polysaccharide composite nanoparticles for encapsulation and oral delivery of lutein. **Food Hydrocolloids**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2020.

LI, J.; ZHUANG, S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European Polymer Journal**, v. 138, p. 109984, 2020.

LI, M.; YU, M. Development of a nanoparticle delivery system based on zein/polysaccharide complexes. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 12, p. 4108-4117, 2020.

- LIN, Y. *et al.* Quercetin rejuvenates sensitization of colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to colistin. **Frontiers in Chemistry**, p. 1033, 2021.
- LIU, Y. *et al.* Treatment with ultrasound improves the encapsulation efficiency of resveratrol in zein-gum Arabic complex coacervates. **Lwt**, v. 153, p. 112331, 2022.
- LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 3, p. 836-843, 2012.
- MATTEUCCI, F. *et al.* Deployment and exploitation of nanotechnology nanomaterials and nanomedicine. **AIP conference proceedings**, v. 1990, n. 1, p. 1-26, 2018.
- MAZAYEN, Z. M. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology: From the bench to the market. **Future journal of pharmaceutical sciences**, v. 8, n. 1, p. 12, 2022.
- MĘDRZYCKA-DĄBROWSKA, W. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in ICU COVID-19 Patients—A scoping review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 2067, 2021.
- MESSIAS S. G. *et al.* Quercetin-loaded chitosan nanoparticles as an alternative for controlling bacterial adhesion to urethral catheter. **International Journal of Urology**, v. 29, n. 10, p. 1228-1234, 2022.
- MILLER, S. I.; SALAMA, N. R. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. **PLoS biology**, v. 16, n. 1, p. e2004935, 2018.
- MOHAMED, E. H. *et al.* Susceptibility assessment of multidrug resistant bacteria to natural products. **Dose-Response**, v. 18, n. 3, p. 1559325820936189, 2020.
- MORENO, L. C. G. I. *et al.* Effect of the oral administration of nanoencapsulated quercetin on a mouse model of Alzheimer's disease. **International journal of pharmaceutics**, v. 517, n. 1-2, p. 50-57, 2017.
- MUSINI, A. *et al.* Quercetin's antibiofilm effectiveness against drug resistant *Staphylococcus aureus* and its validation by in silico modeling. **Research in Microbiology**, p. 104091, 2023.
- NALINI, T. *et al.* Assessment of acute oral toxicity of quercetin loaded alginate/chitosan nanoparticles: in vivo study. **Polymer Bulletin**, p. 1-17, 2022.
- NALINI, T. *et al.* Pectin/chitosan nanoparticle beads as potential carriers for quercetin release. **Materials Today Communications**, v. 33, p. 104172, 2022.
- NIRWATI, H. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. In: **BMC proceedings. BioMed Central**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2019.
- PAL, A.; TRIPATHI, A. Demonstration of bactericidal and synergistic activity of quercetin with meropenem among pathogenic carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial pathogenesis**, v. 143, p. 104120, 2020.

- PARK, C E.; PARK, D. J.; KIM, B K. Effects of a chitosan coating on properties of retinol-encapsulated zein nanoparticles. **Food science and biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 1725-1733, 2015.
- PATIL, M.; MEHTA, D. S.; GUVVA, S. Future impact of nanotechnology on medicine and dentistry. **Journal of Indian society of periodontology**, v. 12, n. 2, p. 34, 2008.
- PEÑALVA, R. *et al.* Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. **Food hydrocolloids**, v. 44, n. 1, p. 399-406, 2015.
- PEÑALVA, R. *et al.* Zein nanoparticles for oral folic acid delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 450-457, 2015.
- PICKARD, J. M. *et al.* Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. **Immunological reviews**, v. 279, n. 1, p. 70-89, 2017.
- PINHEIRO, R. G. R.; PINHEIRO, M.; NEVES, A. R. Nanotechnology innovations to enhance the therapeutic efficacy of quercetin. **Nanomaterials**, v. 11, n. 10, p. 2658, 2021.
- PIPERAKI, E. T. *et al.* *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.
- PONTEFRACT, B. A. *et al.* Drugs for gram-negative bugs from 2010–2019: a decade in review. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2020. p. ofaa276.
- QI, L. *et al.* Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. 1, p. 483, 2016.
- RAI, R.; ALWANI, S.; BADEA, I. Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications. **Polymers**, v. 11, n. 4, p. 745, 2019.
- RUSSO, T A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 3, p. e00001-19, 2019.
- SÁNCHEZ-JUÁREZ, C. *et al.* Study of the properties and colloidal stability for the technological application of zein-based nanospheres. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 2, p.715-728, 2019.
- SATHYAVATHY, K.; MADHUSUDHAN, B. K. Review on clinical diseases caused by *klebsiella*. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 32, n. 21, p. 12-19, 2020.
- SAXENA, P. *et al.* Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. **Indian journal of microbiology**, v. 59, p. 3-12, 2019.
- SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in colloid and interface science**, v. 263, n. 1, p. 131-194, 2019.

- SINGH, S.; BHARTI, A.; MEENA, V. K. Structural, thermal, zeta potential and electrical properties of disaccharide reduced silver nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 25, n. 1, p. 3747-3752, 2014.
- SOUSA-BATISTA, A. J. et al. Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, v. 144, n. 13, p. 1769-1774, 2017.
- SOUZA, M. P. et al. Development and characterization of an active chitosan-based film containing quercetin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 2183-2191, 2015.
- SUN, F. et al. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the ibpA gene and extracellular indole. **Journal of Chemotherapy**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2020.
- SUR, S. et al. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, n. 1, p. 100397, 2019.
- SULTANA, S. et al. Stability issues and approaches to stabilized nanoparticles based drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, v. 1, n. 1, p. 1-43, 2020.
- STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A. et al. Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: A strategy for prevention of chronic degenerative diseases. **Food Research International**, v. 111, n. 1, p. 451-471, 2018.
- TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A et al. Gallic acid-loaded zein nanoparticles by electrospraying process. **Journal of food science**, v. 84, n. 4, p. 818-831, 2019.
- VALENCIA, M. S. et al. Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 101879, 2021.
- VANARAJ, S.; KEERTHANA, B. B.; PREETHI, K. Biosynthesis, characterization of silver nanoparticles using quercetin from *Clitoria ternatea* L to enhance toxicity against bacterial biofilm. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 27, n. 1, p. 1412-1422, 2017.
- VAUTHIER, C.; CABANE, B.; LABARRE, D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 466-475, 2008.
- VAZQUEZ-ARMENTA, F. J. et al. Quercetin reduces adhesion and inhibits biofilm development by *Listeria monocytogenes* by reducing the amount of extracellular proteins. **Food Control**, v. 90, n. 1, p. 266-273, 2018.

- VIPIN, C. et al. Anti-biofilm and cytoprotective activities of quercetin against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 5, p. 464-471, 2019.
- VUOTTO, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743-758, 2014.
- VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.
- WANG, G. et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.
- WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.
- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C; HOLT, K E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344-359, 2020.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112-115, 2008.
- XU, J et al. A review of anti-inflammatory compounds from marine fungi, 2000–2018. **Marine drugs**, v. 17, n. 11, p. 636, 2019.
- YAN, Xiaojia et al. Zein-based nano-delivery systems for encapsulation and protection of hydrophobic bioactives: A review. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 999373, 2022.
- YU, L. et al. The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. **PeerJ**, v. 6, n. 1, p. e5711, 2018.
- YU, S. et al. Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. **International journal of pharmaceutics**, v. 560, n. 1, p. 282-293, 2019.
- YUAN, Y. et al. Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, n. 1, p. 1-15, 2022.
- ZENG, Y. et al. Activity of quercetin and kaemferol against *Streptococcus mutans* biofilm. **Archives of oral biology**, v. 98, n. 1, p. 9-16, 2019.
- ZHANG, H.; LI, S.; CHENG, Y. Antibiofilm activity of allicin and quercetin in treating biofilm-associated orthopaedics infection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2022.
- ZHANG, T. et al. Ethanol-soluble polysaccharide from sugar beet pulp for stabilizing zein nanoparticles and improving encapsulation of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 124, n. 1, p. 107208, 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. **Food chemistry**, v. 142, n. 1, p. 269-275, 2014.

ZOU, Y. *et al.* Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. **Food Hydrocolloids**, v. 120, n. 1, p. 106980, 2021.