



UFAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

IVANILDES DOS SANTOS BASTOS

EFETIVIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO E
FUNCIONALIZADA COM TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag₂WO₄)

MANAUS-AM
2023

IVANILDES DOS SANTOS BASTOS

EFETIVIDADE DE MEMBRANA POLIMÉRICA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO E
FUNCIONALIZADA COM TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag₂WO₄)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, exigida como requisito para a obtenção do título de doutora em Biotecnologia (área de concentração Biotecnologia para a Saúde).

Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-orientador: Dr. Walter Ricardo Brito

MANAUS-AM
2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B327e Bastos, Ivanildes dos Santos
Efetividade de membrana polimérica obtida por eletrofiação e funcionalizada com tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) / Ivanildes dos Santos Bastos. 2023
181 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Orientador: Walter Ricardo Brito
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Tungstato de prata. 2. Eletrofiação. 3. Membranas. 4. Gram-positivas. 5. Bactérias Gram-negativas. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli. II. Universidade Federal do Amazonas.

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus em primeiro lugar e ao meu esposo e meus filhos, Ian Bastos e Yanna Bastos por serem a minha base fortalecedora. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** que me deu forças e me abençoou com saúde e me ajudou a vencer vários desafios e conseguir alcançar o tão sonhado objetivo.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma me apoiaram e torceram por mim e embora seus nomes não sejam citados não são menos importantes. De uma forma especial, agradeço:

A minha família que foi a minha base nessa longa caminhada, em especial ao meu esposo **Edenilson Bastos** pelo apoio, amor e compreensão.

A minha Professora e Orientadora **Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi** e meu Professor e Coorientador **Dr. Walter Ricardo Brito** pela orientação, oportunidade, apoio e suporte técnico. Seus direcionamentos e os diversos conhecimentos compartilhados no decorrer desta pesquisa foram de suma importância para a conclusão do trabalho e minha formação.

Ao colaborador **Dr. Francisco Xavier Nobre** por todo suporte na minha pesquisa, sem a sua ajuda a caminhada se tornaria mais árdua, não tenho palavras para descrever o quanto foi crucial sua colaboração e todo seu suporte nas análises e caracterizações químicas, além das diversas orientações e conhecimentos compartilhados.

Ao Departamento de Química, Laboratório de Bioeletrônicos da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em especial as minhas colegas de trabalho: **Dr. Yonny Romaguera Barcelay, Taisa Sampaio, Jéssica Cunha e Dra. Ariamna Gandarilla** por toda ajuda na parte de eletrofiação e pelos conhecimentos repassados na parte química, assim como também os diversos suportes laboratoriais que foram essenciais para a construção dessa pesquisa.

A todos da equipe do grupo de pesquisa do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia em especial a **Ana Carolina Xavier, Caroline Sousa e Evelin Ribeiro** por todo suporte na parte biológica. Meus agradecimentos a **Dra. Elizangela Farias** pela ajuda nos cultivos de células.

A equipe do Centro Multiusuário para Análise em Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), em especial **Jéssica Araújo** e **Jander Guimarães** por todo o suporte na microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

A Plataforma de Bioensaios de compostos biotecnológicos (RPT11H) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ) e a Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT) pelo espaço cedido para desenvolvimento da pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas cedidas e auxílio financeiro por meio dos projetos aprovados.

RESUMO

O aumento de cepas multirresistentes principalmente associados a *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), vem gerando problemas globais. O presente trabalho teve como objetivo o estudo de atividade antimicrobiana de membrana polimérica obtida por eletrofiação utilizando o polímero policaprolactona (PCL) e funcionalizada com o tungstato de prata (α -Ag₂WO₄). As membranas foram obtidas pelo método de eletrofiação horizontal em cinco proporções de 1:1, 0,75:1, 0,50:1, 0,25:1 e 0,1:1 (m/m), de α -Ag₂WO₄ em relação a massa fixa de PCL. A fase alfa de tungstato de prata foi obtida pelo método hidrotérmico à 120 °C e 140 °C, confirmada por difração de raios X (DRX) com picos característicos da estrutura ortorrômbica no intervalo $2\theta = 30,3^\circ$, $31,6^\circ$, 33° e $45,2^\circ$, correspondentes aos planos cristalográficos de (002), (231), (400) e (402). Os modos vibracionais ativos do PCL e α -Ag₂WO₄ foram confirmados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), onde as bandas identificadas correspondem ao PCL, como também, a estrutura do α -Ag₂WO₄. Neste caso, na faixa de 807 cm⁻¹ e 865 cm⁻¹, foram identificadas vibrações associadas as ligações O-W-O. As membranas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), o qual foi possível visualizar fibras uniformes e aleatoriamente distribuídas, porém a membrana de proporção de 1:1, apresentou pérolas e diâmetro de fibra reduzido ao comparado com as demais amostras. Enquanto nas proporções de 0,25:1 e 0,1:1, resultaram na melhor uniformidade para as fibras eletrofiadas. A presença dos elementos prata (Ag), tungstênio (W) e oxigênio (O) por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), confirmam a presença do α -Ag₂WO₄ nas fibras, corroborando para as demais análises. As curvas termogravimétricas (TGA) revelaram que não houve alterações significativas quanto a estabilidade térmica das membranas contendo o tungstato de prata ao comparado com o PCL puro. Os melhores resultados das atividades antimicrobianas das fibras, foram observados para as cepas de *Pseudomonas* que apresentaram média de halos de $22 \pm 0,55$ cm a $13 \pm 0,57$ cm e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) com média de halo de $16 \pm 0,55$ mm. As fibras apresentaram ação microbicida e microbiostáticos contra *E. coli* enterotoxigênica (ETEC ST) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), com redução a zero no log UFC/mL nas proporções de 1:1 a 0,25:1 nos intervalos de 0 a 48 h. Também contra três cepas de *P. aeruginosa*, com redução a zero na log UFC/mL nas proporções de 1:1 a 0,75:1. As melhores atividades antibiofilmes foram obtidas com as *E. coli* DAEC, EHEC, EIEC, *E. coli* não diarreica e *P. aeruginosa* ATCC 15442 em todas as proporções. As alterações celulares foram avaliadas em contato com a membrana na proporção de 1:1, que exerceu um efeito semelhante nas cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA, e apresentou danos como rupturas na membrana plasmática, estrutura interna em decomposição, desintegração da parede celular e grandes vacúolos. Portanto, a membrana de α -Ag₂WO₄ em conjunto com o PCL por eletrofiação se apresenta como uma alternativa promissora no tratamento e prevenção das infecções microbianas.

Palavra-chave: Tungstato de prata. Eletrofiação. Membranas. Mecanismo de ação. Bactérias Gram-negativas. Gram-positivas.

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are often associated with the increase of multidrug-resistant strains and has been generating global problems. This present research aimed to study the antimicrobial activity of a polymeric membrane obtained by electrospinning and functionalized with silver tungstate (α -Ag₂WO₄). The membranes were obtained by the horizontal electrospinning method in five proportions of 1:1, 0.75/1, 0.50/1, 0.25/1 and 0.1:1 of α -Ag₂WO₄ to polycaprolactone (PCL) (wt/wt). The alpha phase of silver tungstates was obtained by the hydrothermal method at 120 °C and 140 °C, which was confirmed by X-ray diffraction (XRD) with XRD peaks characteristics of α -Ag₂WO₄ in the $2\theta = 30.3^\circ$, 31.6° , 33° and 45.2° , which correspond to the crystallographic planes of (002), (231), (400) and (402). The vibrational active modes of PCL and α -Ag₂WO₄ were confirmed by the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), where active modes associated to the O-W-O bonds were identified in the range of 807 and 865 cm⁻¹ in the pure (standard) and membranes materials. The membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM), which is identified the randomly distributed and less diameter of fibers for membrane in the proportion of 1:1. As also, for samples prepared in the proportion of 0.25/1 and 0.1:1 a high homogeneous fiber diameter and absence of beads is reached. The presence of silver (Ag), tungsten (W) and oxygen (O) elements by energy dispersive spectroscopy (EDS) confirm the presence of α -Ag₂WO₄ in the fibers. Thermogravimetric curves (TGA) revealed that there were no changes in the thermal stability of membranes in comparison of pure PCL (standard). The antimicrobial activities result of membranes against *Pseudomonas* strains with an average halo ranging from 22 ± 0.55 cm to 13 ± 0.57 cm and diffusely adherent *E. coli* (DAEC) with an average halo of 16 ± 0.55 cm. The fibers are shown the microbicidal and microbiostatic action against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC ST) and enteroinvasive *E. coli* (EIEC), with a reduction to zero in the log CFU/ mL in proportions of 1:1 to 0.25/1 in intervals of 0 to 48 hours. Also, against three strains of *P. aeruginosa*, with reduction to zero in log CFU/ mL in proportions ranging from 1:1 to 0.75/1. The best antibiofilm activities were with DAEC, EHEC, and EIEC *E. colis*, non-diarrheal *E. coli* and *P. aeruginosa* ATCC 15442 in all proportions. Cellular changes were evaluated with the membrane contact in a 1:1 ratio, which exerted a similar effect on strains of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and MRSA, and presented damage such as ruptures in the plasma membrane, internal structure decomposing, cell wall disintegration and large vacuoles. Therefore, silver tungstate coupled to PCL as membrane by electrospinning method appears as an alternative material for the treatment and prevention of microbial infections.

Keywords: Silver tungstate. Electrospinning. Membranes. Mechanism of action. Gram-negative and Gram-positive bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da parede de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas	255
Figura 2 - Mortes globais atribuíveis e associadas à resistência bacteriana por patógeno em 2019	344
Figura 3 - Ocorrência mundial de <i>Escherichia coli</i> resistente à cefalosporina de terceira geração por país e território	355
Figura 4 - Ocorrência mundial de <i>Escherichia coli</i> resistente à fluoroquinolonas por país e território	366
Figura 5 - Ocorrência <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina por país e território	377
Figura 6 - Formação de biofilme	433
Figura 7 - Esquema de um sistema de eletrofiação convencional horizontal	455
Figura 8 - Processo de polimerização da Policaprolactona	50
Figura 9 - Estruturas cristalográfica dos três polimorfos de tungstato de prata, fase alfa (α -Ag ₂ WO ₄) Fase beta β -Ag ₂ WO ₄ e fase gama γ -Ag ₂ WO ₄	533
Figura 10 - Padrão de difração (a) e representação esquemática da célula unitária do (b) α -Ag ₂ WO ₄ sintetizado	79
Figura 11 - Cinética de crescimento dos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i> após a exposição às concentrações inibitórias mínimas (MICs) de tungstato de prata (α -Ag ₂ WO ₄)	822
Figura 12 - Ação microbicida e microbiostático de tungstato de prata, frente as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	844
Figura 13 - A capacidade dos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i> de produzir biofilme após as exposições às concentrações inibitórias mínimas (MICs) de tungstato de prata	866
Figura 14 - A capacidade das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de produzir biofilme após as exposições nas concentrações inibitórias mínimas	888

Figura 15 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra <i>Escherichia coli</i>	900
Figura 16 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra <i>Escherichia coli</i>	911
Figura 17 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas, contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	933
Figura 18 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata (α -Ag ₂ WO ₄) exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas, contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	944
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito de tungstato de prata na concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra os oito de <i>Escherichia coli</i>	966
Figura 20 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito de tungstato de prata exposto à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	977
Figura 21 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas, contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	988
Figura 22 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata, frente a célula de fibroblasto de pulmão humanos (MRC5) nos tempos de 24, 48 e 72 horas	101
Figura 23 - Inibição da toxicidade e viabilidade de tungstato de prata, frente a célula epitelial renal derivada de rins de macaco verde africano (VERO) nos tempos de 24, 48 e 72 horas.....	1033
Figura 24 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata (α -Ag ₂ WO ₄), contra a célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) nos tempos de 48 e 72	1076

Figura 25 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata (α - Ag_2WO_4), frente a célula de monócito de sangue periférico humano (THP-1) nos tempos de 48 e 72 horas.....	106
Figura 26 - Imagem da membrana de policaprolactona com Tungstato de prata	1200
Figura 27 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das membranas de policaprolactona com tungstato de prata na proporção 1:1	1222
Figura 28 - Micrografias das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção 1:1	1222
Figura 29 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,75:1	1233
Figura 30 - Micrografias das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,75:1	1244
Figura 31 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,50:1	1255
Figura 32 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção 0,50:1	1255
Figura 33 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,25:1	1266
Figura 34 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,25:1	1277
Figura 35 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,1:1	1277
Figura 36 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,1:1	1288
Figura 37 - Micrografias dos controles de policaprolactona com Imipeném + cilastatina sódica, Ceftriaxona, Oxacilina, na proporção de 1:1.....	1300

Figura 38 - Imagens de MEV e mapas elementares EDS correspondentes as microfibras do controle de PCL e PCL + α -Ag ₂ WO ₄ nas proporções de 1:1 a 0,25:1	1322
Figura 39 - Imagens de MEV e mapas elementares EDS correspondentes as microfibras do controle de PCL e PCL + α -Ag ₂ WO ₄ nas proporções de 0,50:1 a 0,1:1	1333
Figura 40 - Padrão de difração das cinco membranas de policaprolactona com Tungstato e prata	1355
Figura 41 - Espectroscopia das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata	1377
Figura 42 - Valores de ângulo de contato das microfibras de Policaprolactona + tungstato de prata	13939
Figura 43 - Curvas de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) das	1411
Figura 44 - Perfil de liberação da membrana de PCL e as membranas de PCL + α -Ag ₂ WO ₄	1444
Figura 45 - Fotografia dos halos de inibição das microfibras de policaprolactona com tungstato de prata, frente aos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina.....	1488
Figura 46- Ação microbicida e microbiostático das membranas de policaprolactona com tungstato de prata, frente aos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i>	1511
Figura 47 - Ação microbicida e microbiostático das membranas de policaprolactona com tungstato de prata, frente às <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina....	1522
Figura 48 - A capacidade dos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i> de produzir biofilme após a exposição as microfibras de policaprolactona com tungstato de prata	1544
Figura 49 - A capacidade das cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina de produzir biofilmes após à exposição às microfibras de policaprolactona com tungstato de prata	156

Figura 50 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito bacteriano da membrana na proporção de 1:1 exposta por 3 horas contra os oito patótipos de <i>Escherichia coli</i>	159
Figura 51 - Alterações celulares por microscopia eletrônicas de transmissão do efeito antibacteriano a microfibras de policaprolactona com tungstato de prata na proporção de 1:1 por 3 horas, frente às cepas de <i>P. aeruginosa</i>	160
Figura 52 - Alterações celulares por microscopia eletrônicas de transmissão do efeito antibacteriano à microfibras de policaprolactona com tungstato de prata na proporção de 1:1 por 3 horas, contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	161

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Os Parâmetros do processo de eletrofiação	477
Tabela 2 - A utilização de diversos polímeros eletrofiados com diversas aplicabilidades.....	49
Tabela 3 - As diversas aplicabilidades de tungstato de prata (α -Ag ₂ WO ₄)	543
Tabela 4 - Média de halo de inibição $\pm$ desvio padrão e a concentração inibitória mínima (CIM).....	800
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ de tungstato de prata(α -Ag ₂ WO ₄), frente a célula de fibroblastos de pulmão humanos (MRC-5) e a célula epitelial renal derivada de rins de macaco verde africano (VERO)	1044
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ de tungstato de prata(α -Ag ₂ WO ₄), frente célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) e a célula de monócito de sangue periférico humano (THP-1)	1088
Tabela 7 - Descrição das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	1155
Tabela 8 - Os parâmetros observados na obtenção das microfibras de policaprolactona (PCL) com as diferentes concentrações de tungstato de prata (α -Ag ₂ WO ₄)	11919
Tabela 9 - Valores de ângulo de contato das microfibras de Policaprolactona + tungstato de prata	13939
Tabela 10- Características das membranas utilizadas para fazer as medidas	14242
Tabela 11 - Medidas obtidas dos módulos de elasticidade, tensão e alongamento de ruptura das membranas	1433
Tabela 12 - Média de halo de inibição das microfibras de policaprolactona + tungstato de prata, frente aos oito patótipos de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metecilina.....	1477

LISTAS SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

BHI	Caldo Infusão de Cérebro e Coração (<i>Brain Heart Infusion Broth</i>)
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DCDIA	Diagnóstico e Controle e Doenças Infecciosas da Amazônia
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DMEM	Dulbecco's modified EAgle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios-x
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
ESBL	Enzima β -lactamase espectro ampliado
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	Estirpe Extraintestinal de <i>Escherichia coli</i>
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
HO	Radicais hidroxilas
ITUs	Infecções do trato urinário
MDROs	Microrganismos resistentes a múltiplas drogas
<i>resistant organisms</i>	(<i>Multidrug-</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MHA	Müller Hinton ágar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
NFs	Nanofibras
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	Tampão Fosfato Salino
PCL	poli (caprolactona)
PDR	<i>Pan-drug-resistance</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	poli (ácido láctico)
PVA	poli (álcool vinílico)
PVDF	Poli (fluoreto de polivinilideno)
RAMAN	Espectroscopia Vibracional
RPM	Rotação por minuto
TGA	Termogravimetria
UTIN	Unidades de terapia intensiva neonatal
UTIP	Unidades de terapia intensiva pediátrica
UTIS	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
XDR	Extensivamente resistentes a drogas (<i>Extensively drug-resistant</i>)
α	Fase alfa de tungstato de prata
α , β e γ	Ângulos internos da célula unitária
β	Fase beta de tungstato de prata
γ	Fase gama de tungstato de prata
Θ	Ângulo de difração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Agentes etiológicos	23
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	26
2.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.2. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE.....	30
2.3. EPIDEMIOLOGIA E RESISTÊNCIA BACTERIANA	32
2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	39
2.4.1. Bomba de efluxo.....	39
2.4.2. A modificação do sítio de ação do antimicrobiano	40
2.4.3. Modificação na permeabilidade das membranas	41
2.4.4. Inativação enzimática dos antibióticos	42
2.4.5. Formação de biofilme	42
2.5. ELETROFIAÇÃO (<i>ELECTROSPINNING</i>).....	44
2.5.1. Poli (ϵ -caprolactona)	50
2.6. TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag ₂ WO ₄).....	52
2.7. Objetivo geral.....	55
2.8. Objetivos Específicos	55
3. CAPÍTULO 1.....	56
4. CAPÍTULO 2.....	66
4.1. INTRODUÇÃO.....	68
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	72
5.1.1. Síntese de α -Ag ₂ WO ₄	72
5.1.2. Difração de raios X de α -Ag ₂ WO ₄	72
5.1.3. Caracterização morfológica de α -Ag ₂ WO ₄ por microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS).....	73
5.2. ENSAIOS BACTERIANOS.....	73
5.2.1. Microrganismos e padronização de inóculo bacteriano	73
5.2.2. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em poço de ágar....	74
5.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	74
5.2.4. Teste de ação Microbicida e Microbiostático.....	74
5.2.5. Atividade antibiofilme	75

5.2.6. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	75
5.2.7. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	76
5.2.8. Cultivos das células não cancerígenas e cancerígenas	76
5.2.9. Ensaio de Viabilidade e citotoxicidade	77
5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1. Difração de raios X e refinamento estrutural de α -Ag ₂ WO ₄	78
7. ENSAIOS BIOLÓGICOS	79
7.1. Suscetibilidade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)	79
7.2. Teste de ação microbicida e microbiostático	81
7.3. Atividade antibiofilme	85
7.4. Análises de alterações celulares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	89
7.5. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	95
7.6. Viabilidade e citotoxicidade células não cancerígenas	99
7.7. Viabilidade e citotoxicidade células cancerígenas	105
CAPÍTULO 3	109
8. MEMBRANAS POLIMÉRICAS OBTIDA PARTIR DA ELETROFIAÇÃO DO PCL E FUNCIONALIZADA COM TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag ₂ WO ₄)	109
8.1. ELETROFIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	109
8.1.1. Preparo e parâmetros de solução de policaprolactona (PCL)	109
8.1.2. Proporção de α -Ag ₂ WO ₄ na solução polimérica de PCL	109
8.1.3. Os parâmetros de processo para obtenção das membranas	110
8.1.4. Caracterização morfológica das microfibras por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	110
8.1.5. Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)	111
8.1.6. Difração de raio X (DRX)	111
8.1.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	112
8.1.8. Estudo de molhabilidade através do ângulo de contato	112
8.1.9. Ensaio mecânicos de tração uniaxial	113
8.1.10. Análise térmica por meio de termogravimétrica (TGA)	113
8.1.11. Ensaio de Liberação por Espectrofotométrica (UV-Vis)	113
8.1.12. Esterilização por ozônio (O ₃)	114
8.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS MEMBRANAS	114

8.2.1.	Cepas bacterianas utilizadas.....	114
8.2.2.	Teste de esterilidade	115
8.2.3.	Crescimento e padronização dos inóculos bacterianos.....	116
8.2.4.	Ensaio de Susceptibilidade (Kirby-Bauer)	116
8.2.5.	Teste de ação Microbicida e Microbiostático.....	117
8.2.6.	Atividade antibiofilme	117
8.2.7.	Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	118
9.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
9.1.1.	Preparo, parâmetros e proporção de α -Ag ₂ WO ₄ na solução polimérica de PCL.....	119
9.1.2.	Análise morfológica das microfibras de PCL com α -Ag ₂ WO ₄	120
9.1.3.	Caracterização morfológica das microfibras por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	121
9.1.4.	Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)	131
9.1.5.	Difração de raio X (DRX)	134
9.1.6.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	136
9.1.7.	Estudo de molhabilidade das membranas através do ângulo de contato	137
	Policaprolactona (PCL)	139
9.1.8.	Análise térmica por meio de Termogravimetria (TGA).....	140
9.1.9.	Ensaio mecânicos de tração uniaxial	142
9.1.10.	Ensaio de liberação por espectrofotométrica (UV-Vis).....	143
9.1.11.	Teste de esterilidade por ozônio (O ₃)	145
9.2.	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	146
9.2.1.	Ensaio de Susceptibilidade (Kirby-Bauer)	146
9.2.2.	Teste de ação Microbicida e Microbiostático.....	148
9.2.3.	Atividade antibiofilme	153
9.2.4.	Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	157
10.	CONCLUSÃO.....	162
11.	REFERÊNCIAS	164

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas têm sido uma das principais causas de morbidade e mortalidade ao longo da história (WHO, 2021b). Porém, com a introdução dos antibióticos, no século 20, este problema foi parcialmente solucionado, mas o surgimento de cepas multirresistentes com o passar dos anos contrariou os avanços alcançados (WHO 2017; Ayobami et al., 2022; WHO, 2021a). As infecções associadas às bactérias MDROs (microrganismos resistentes a múltiplas drogas) vêm aumentando nos últimos anos, gerando preocupação mundial pois a sua ocorrência é frequente tanto em hospitais de países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento (WHO, 2021a; WHO, 2021b). Os maiores agravos, ocorrem quando acomete pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), representando um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos, além de comprometer o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados (Furtado et al., 2019; Silva et al., 2020b; WHO, 2021a).

Problemas semelhantes foram vivenciados com o rápido surgimento do vírus (SARS-CoV-2) desde 2019, onde afetou severamente a sociedade e o desenvolvimento econômico em todo o mundo (Kraemer et al., 2020; Yu et al., 2020). Sobretudo, expondo diversos problemas de saúde a nível global como: indisponibilidade de medicamentos, vacinas ineficazes, diagnósticos inacessíveis de rápida detecção, equipamentos de proteção individual insuficientes, além da escassez de materiais eficazes em resposta às ameaças a biossegurança como um todo (Kraemer et al., 2020; Pereira et al., 2022; WHO, 2020). Em resposta aos desafios sem precedentes da pandemia de COVID-19, houve um enorme esforço de pesquisa em ciências de materiais em todo o mundo, com objetivo de obter uma ampla variedade de biomateriais com propriedades peculiares para lidar com os problemas de natureza infecciosa atuais e futuras (Pereira et al., 2022; Yu et al., 2020; WHO, 2020). Tendo em vista o atual cenário, a busca por novos materiais e processos, ferramentas eficazes para a prevenção e tratamento, são necessários, levando em consideração a biossegurança e o bem-estar da população (Pereira et al., 2022; WHO, 2020). Principalmente no que tange a biossegurança em decorrência do risco representado pelos microrganismos patogênicos multirresistentes (Yu et al., 2020; WHO, 2021a; WHO, 2021b). Portanto, o controle e prevenção eficazes nestas unidades, costuma ser indispensável para a estabilidade dos pacientes hospitalizados

e os profissionais de saúde, tornando assim o ambiente menos propenso à disseminação de isolados multirresistentes (Ayobami et al., 2022).

Neste contexto, o tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) torna-se um candidato promissor, no combate à resistência e proliferação de microrganismos patogênicos, que têm despertado interesse científico e industrial, por exibir características que os direcionam às novas possibilidades de aplicações, principalmente em dimensões nanométricas e micrométricas, além de apresentar diversas estruturas para o mesmo composto químico, essas estruturas permitem que sejam ampliadas as aplicações para diversas áreas de interesses (Macedo et al., 2018), assim como a facilidade na obtenção dessa substância por diversos métodos de sínteses (Nobre et al., 2019). Esses métodos analíticos permitem obter um melhor controle do material, além de ser de menor custo relacionados a outros materiais (Longo et al., 2013). As propriedades encontradas nesse material vêm favorecendo a atividade antifúngica (Pimentel et al., 2022), antiviral (Pereira et al., 2022) e atividades antibacterianas, contra diversas bactérias de interesse clínico (Alvarez-Roca et al., 2021).

Trabalhos recentes abrem caminho que possibilitam tanto inovar em design como nas aplicações de tecnologias adequadas para a proteção de superfície utilizando materiais eletrofiados (Khanzada et al., 2020; Liu, Z; Ramakrishna; Liu, X 2020). Principalmente materiais estáveis e protetores que vise impedir a propagação de doenças altamente infecciosas entre os profissionais de saúde, pacientes hospitalizados e público em geral (Khanzada et al., 2020; Liu, Z; Ramakrishna; Liu, X 2020). Portanto, existe grande variedade de técnicas que podem ser utilizadas para produzir microfibras poliméricas, dentre as quais se destaca a eletrofiação (*electrospinning*, que é uma técnica de fabricação de fibras nanométricas contínuas que podem capturar micropartículas ou gotículas contendo bactérias e outros agentes patogênicos (Khanzada et al., 2020; Liu, Z; Ramakrishna; Liu, X, 2020). É uma técnica que traz grande facilidade e versatilidade na produção de nanofibras quando comparadas com outras técnicas, principalmente quando associadas a diferentes tipos de matrizes, como na forma de compósitos e membranas, tornando possível o desenvolvimento de fibras funcionalizadas com aplicação têxtil.

Os materiais poliméricos estão em foco em diversas pesquisas, principalmente por serem materiais totalmente versáteis, sendo utilizados para várias aplicações, como, em nanofibras para embalagens têxteis (Ferreira et al., 2022), produção de cápsula de revestimento para fármaco (Yang et al., 2019), regeneração de cartilagem

(Bas et al., 2017), fabricação de sensores de pressão e estímulo mecânico (Ghosh et al., 2017), produção de membranas de reparação tecidual guiada (Gong et al., 2018) dentre outros (Ibrahim et al., 2019; Segundo et al., 2021). As membranas eletrofiadas com o polímero poli (ϵ -Caprolactona) – PCL é um dos mais empregados para o desenvolvimento de engenharia de tecidos humanos (Bas et al., 2017), entrega controlada de drogas (Ramachandran et al., 2017), como também vem sendo utilizado mais recentemente em engenharia de tecido têxtil para embalagem de alimentos (Ferreira et al., 2022).

Devido ao grande apelo pela busca de alternativas e ferramentas eficazes para tratar ou prevenir infecções decorrentes de bactérias MDROS, o presente trabalho teve como objetivo geral estudar atividade antimicrobiana de membrana polimérica obtida por eletrofiação e funcionalizada com tungstato de prata (α -Ag₂WO₄).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agentes etiológicos

As bactérias são microrganismos unicelulares, procariotos que apresentam uma variedade de espécies, resultantes de suas diferentes formas, metabolismo, habitats e além de apresentarem diversos fatores de virulência e resistência (Murray et al., 2022). As bactérias são divididas em dois grupos principais sendo bactérias Gram-positivas (BGP) e bactérias Gram-negativas (BGN), esses dois grupos se diferenciam principalmente em relação a sua estrutura de parede (Trabulsi; Alterthum, 2004).

As bactérias Gram-positivas (BGP), possuem uma parede celular espessa, constituída por um polímero complexo de açúcares e aminoácidos, conhecido como peptidoglicano ou mureína (Trabulsi; Alterthum, 2004). Essas camadas de peptidoglicano formam uma estrutura rígida que correspondem a 70% da parede, e desempenham um papel de suma importância para a proteção da membrana celular das BGP (Trabulsi; Alterthum, 2004). A grande importância dessa rígida camada de mureína para a proteção da estrutura da membrana celular, é devido aos açúcares e aminoácidos que as compõem, desempenhando um papel que impede a passagem de substâncias hidrofóbicas, isso porque os açúcares e aminoácidos possuem cargas que faz dela um composto altamente polarizado.

Vale ressaltar que a estrutura de peptidoglicano, pode ser encontrada tanto em bactérias Gram-positivas como em Gram-negativas, no entanto no grupo da BGN encontra-se em menor concentração (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Essa macromolécula é formada por um arcabouço composto de uma alternância de N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM), sendo que o NAM, encontra-se ligado às cadeias laterais dos tetrapeptídeos (CLTs), sendo os mais conhecidos L-alanina (L-ala), D-glutamato (D-glu), meso-diaminopimelato (meso-DAP) e D-alanina (D-ala) (Murray et al., 2014; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Esse arcabouço é o mesmo para a maioria das espécies bacterianas, porém a composição dos tetrapeptídeos pode variar de acordo com as espécies. No entanto, os tetrapeptídeos das BGP são superiores aos encontrados em BGN (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

Os outros componentes que compõem a parede celular das Gram-positivas, são os polímeros singulares como os ácidos teicóicos, que são cadeias de glicerol

ligadas por pontes fosfodiéster (Trabulsi; Alterthum, 2004). O ácido teicoíco, tem sido dividido em dois tipos: ácido teicoíco de parede ligado ao peptidoglicano e ácido lipoteicoíco que podem ser encontrados ao longo da parede e ligado a fração lipídica da membrana. Dentre outros componentes que também compõem essa estrutura estão as proteínas e polissacarídeos (FIGURA 1) (Murray et al., 2014).

Já as bactérias Gram-negativas, apresentam uma estrutura celular compostas por três partes: membrana citoplasmática semelhante a parede das BGP, um espaço periplásmico contendo enzimas, proteínas e uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa de aproximadamente 8 nm (FIGURA 1). A membrana externa consiste em proteínas, porina como também lipopolissacarídeos (LPS), que atuam como antígenos bacterianos, que é uma característica marcante das células bacterianas das BGN (FIGURA 1) (Trabulsi; Alterthum, 2004; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

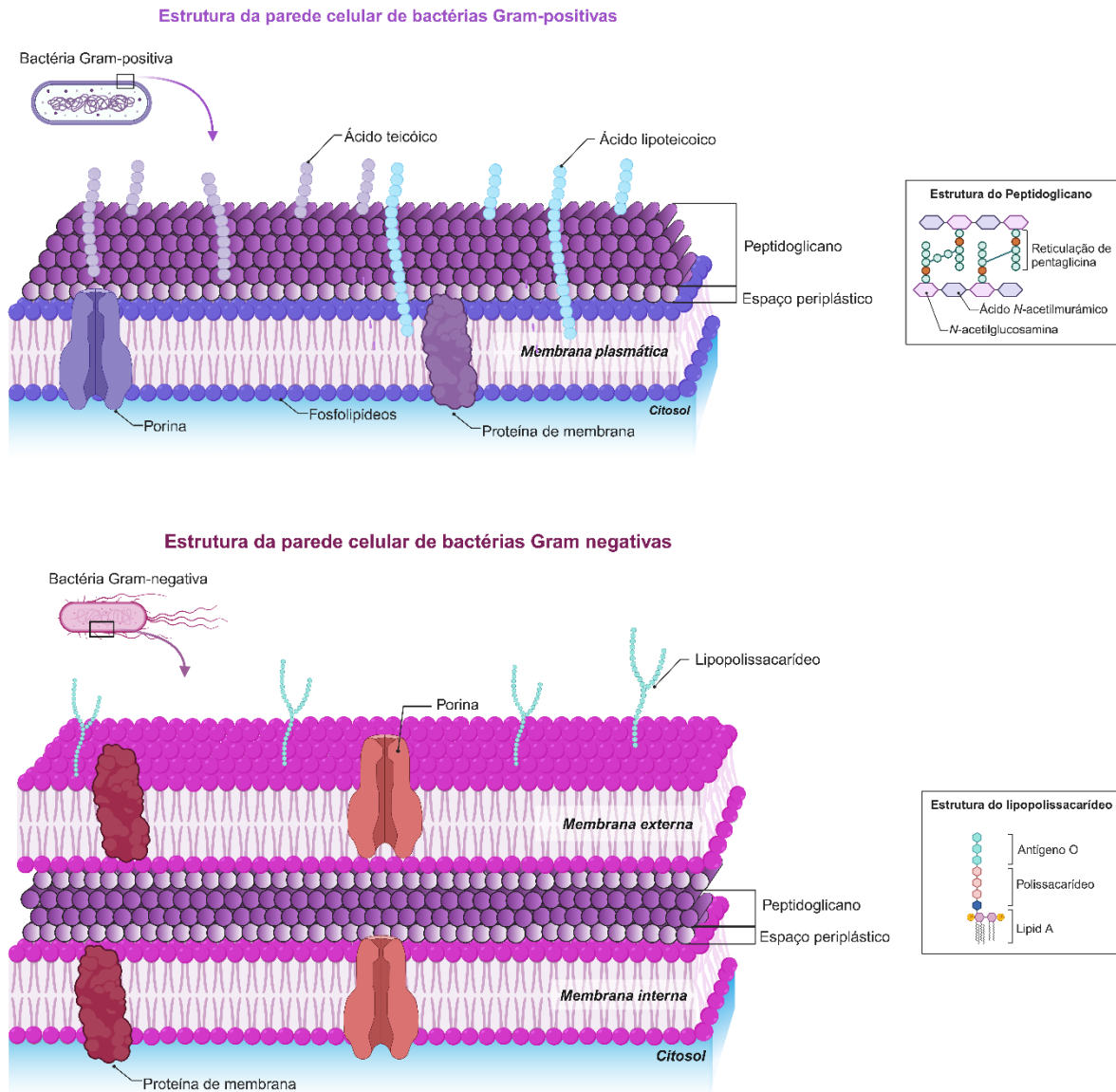
O lipopolissacarídeo ou endotoxina como também é conhecido é uma molécula complexa encontrada abundantemente na camada externa das bactérias Gram negativas, sua estrutura é composta por lipídeo A, lipopolissacarídeo do cerne e o antígeno O (Gorman; Golovanov, 2022; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Sendo que o lipídeo A está ligado aos ácidos graxos hidrofóbicos, que estão incorporados à parede externa da membrana (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Já o antígeno O está ligado ao núcleo, que são cadeias longas repetidas de polissacarídeos hidrofílicos (Gorman; Golovanov, 2022; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

Um dos problemas que podem ser acarretado pelo lipídeo A é a resposta pró-inflamatória e toxicidade, no entanto o LPS não é capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória até ser liberado na membrana bacteriana, isso só ocorre se houve a liberação por divisão celular, lise ou morte (Gorman; Golovanov, 2022; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Uma vez liberado o lipídeo A, pode interagir com os receptores de reconhecimento do hospedeiro e consequentemente induz a respostas pró-inflamatórias e ocasiona a toxicidade (Gorman; Golovanov, 2022; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

Considerando a ampla diversidade de bactérias inócua ou patogênica tanto do grupo das BGP e BGN, pode-se ser destacado algumas bactérias comumente associadas a doenças humanas, dentre elas encontra-se a *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) (Desvaux et al., 2020; Layer et al., 2018).

Figura 1 - Estrutura da parede de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas



Fonte: "O autor" (2023).

Nota: Criado no programa Biorender.com

2.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) pertencente à família das Enterobacteriaceae, é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, podendo ser móvel ou imóvel e pode causar infecções tanto na comunidade através de alimento e água contaminada, como também podem desencadear infecções hospitalares (Liu, 2019; Desvaux et al., 2020).

A *E. coli* é uma espécie bacteriana totalmente versátil que possui uma extensa subestrutura filogenética que compreende oito filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F e G), esses filogrupos estão agrupados em três grupos principais, sendo: cepas comensais probióticas (A), cepas patogênicas intestinais e cepas patogênicas extraintestinais (ExPEC) (B1 a G) (Desvaux et al., 2020). Ambos os grupos podem ser encontrados tanto no trato gastrointestinal de humanos, como de animais de sangue quente, porém as cepas comensais raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis, pois não possuem fatores de virulência, no entanto as cepas patogênicas intestinais e extraintestinais podem causar doenças devido os fatores de virulência que lhes conferem a capacidade de se adaptar a novos nichos e causar doenças como no caso dos oito patótipos: *E. coli* diarreiogênica (DEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* extraintestinais (ExPEC) (Desvaux et al., 2020; LIU et al., 2020; Torres-Puig et al., 2022).

As infecções causadas pelas cepas patogênicas estão associadas a diferentes fatores de virulência dentre os quais encontra-se produção de toxinas termoestáveis (ST), toxinas termolábeis (LT) e Shiga-like, adesão (fímbrias ou pili), cápsulas polissacarídicas, formação de biofilmes entre outras (Pakbin et al., 2021; Desvaux et al., 2020). Sendo que a toxina ST é codificada por genes encontrados tanto nos plasmídeos como nos cromossomos, ela aumenta a concentração de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) causando fosforilação no regulador da transmembrana da fibrose cística (CFTR) que quando ativada inibe a reabsorção de (Pakbin et al., 2021). A toxina LT que são codificadas por genes dos plasmídeos, aumenta a concentração de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e ativa a CFTR e consequentemente causa a liberação de água e eletrólitos (Pakbin et al., 2021). Já a toxina Shiga (STX do inglês *Shiga-like toxin*) como é denominada, são codificadas pelo gene STX, que se liga ao globotriaosilceramina (GB3) realizando o tráfego

intracelular da toxina para o Golgi e retículo endoplasmático (RE), causando inibição da síntese de proteínas, morte celular e estresse do RE, além disso a toxina causa efeito citotóxicos nas células renais e células endoteliais através de microvesículas com STX (Lee et al., 2021).

Outro fator de virulência muito importante para a *E. coli* é a adesão que ajuda o microrganismo a aderir às células dos hospedeiros para assim colonizar tecidos específicos (Habouria et al., 2022). A *E. coli* possui várias fímbrias podendo ser codificadas por diferentes genes, sendo as fímbrias do tipo 1 e fímbrias P as mais estudadas, além disso, o mecanismo de adesão também está associado a formação de biofilmes (Habouria et al., 2022).

2.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Taxonomicamente a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) se apresenta como bacilo Gram-negativo da família da Pseudomonadaceae, microscopicamente a bactéria é definida como bacilos retos ou curvos, não esporulados, móvel, com aproximadamente 0,5 a 0,8 µm de espessura e 1,5 a 3,0 µm comprimento, apresentando flagelos polares, estritamente aeróbios, ubiqüitários e hidrofílicos (Trabulsi; Alterthum, 2004; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Macroscopicamente a *P. aeruginosa* apresenta diversas formações de colônias com vários aspectos morfológicos, sendo capaz de produzir um ou mais pigmentos, dentre os quais podem ser destacados o pigmento na cor verde (pioverdina), que são encontrados na maioria dos isolados clínicos, seguido de piocianina (azul), sendo com menor frequência a piomelanina (marrom) e piorrubina (vermelho) (Trabulsi; Alterthum, 2004).

Dentre as espécies de *Pseudomonas*, a espécie que vem sendo reportada nas últimas décadas é a *Pseudomonas aeruginosa* por ser responsável por inúmeras infecções, incluindo as cutâneas, oculares, auditivas, urogenitais, pulmonares e bacteremia (Behzadi; Baráth; Gajdács, 2021). Essa bactéria é amplamente distribuída no ambiente, tendo como reservatório natural solo, animal, planta, água e alimentos, além da capacidade de se adaptar a várias superfícies abióticas e bióticas (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

Como as infecções causadas por *P. aeruginosa* são diversificadas e envolvem diferentes tecidos, órgãos e ambientes, logo esse microrganismo apresenta diferentes

fatores de virulência, alguns fazem parte da estrutura celular outros são regulados por fatores extracelulares (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Dentre os diversos fatores de virulência estruturais, pode-se destacar os flagelos, fímbrias e LPS (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Já os fatores de virulência extracelulares destacam-se as proteínas conhecida como (exoenzima S e U), a toxina (exotoxina A), as proteínas (Elastase B e A), os pigmentos (Fenotiazínicos) e o biofilme (Moradali; Ghods; Rehm, 2017; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). A produção dessas proteínas, enzimas e pigmentos presente na *P. aeruginosa*, conferem a capacidade desta bactéria desencadear infecções agudas, devido a produção de toxinas, como infecções crônicas, que podem ser atribuídas aos vários fatores de virulência associados a ação do seu biofilme (Tummler, 2019).

A virulência quando associado ao flagelo quando presente na *P. aeruginosa* implica em uma notável aderência dessa bactéria às células epiteliais respiratórias, assim como é de fundamental importância na sobrevivência do patógeno, quando este se encontra no hospedeiro (Tummler, 2019; Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). As fímbrias do tipo IV encontrada em *P. aeruginosa* podem ser responsáveis por 90% da adesão às células, sendo um importante fator de virulência nos primeiros estágios da infecção crônica.

2.1.3. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família da Staphylococcaceae do grupo das gram-positivas, é definida como cocos, não-formadora de esporos, apresentam diâmetro de 0,5 µm a 1µm, são imóveis, capsuladas e são aeróbios ou anaeróbios facultativos (Layer et al., 2018). O *Staphylococcus aureus* vive de forma assintomática na flora natural da pele, glândulas, mucosas, incluindo nariz e intestinos, torna-se patogênica em condições peculiares, como a quebra da barreira cutânea ou em casos em que o sistema imune do hospedeiro está comprometido (Giulieri, Tong, Williamson, 2020). O *S. aureus* é uma das bactérias mais importantes do seu gênero, sendo responsável por inúmeras infecções cutâneas e subcutâneas, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia (Algammal et al., 2020). Esse microrganismo em determinadas circunstâncias, pode desencadear infecções cutâneas crônicas, relativamente benignas, até infecções

sistêmicas potencialmente fatais em diferentes sítios de colonização (Holmes et al., 2018; Turner et al., 2019).

No entanto, o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) pode desencadear infecções tão invasivas quanto às causadas por outras cepas de *S. aureus*, principalmente por estar bem adaptado aos humanos e ambientes de saúde (Andrade et al., 2020; Giulieri, Tong; Williamson, 2020; Turner et al., 2019). O termo MRSA cuja sigla em inglês é referente a *Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina*, é uma cepa de *Staphylococcus aureus* com modificações genéticas (Algammal et al., 2020; Andrade et al., 2020). As ocorrências de infecções causadas por MRSA são freqüentes em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) e unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP), gerando uma grande preocupação, já que cepas que emergem em hospitais tornam-se difíceis de ser erradicadas, devido ao surgimento de clones de *S. aureus* resistente a meticilina (Weiner-Lastinger et al., 2020; Giulieri, Tong, Williamson, 2020).

A versatilidade e gravidade das infecções causadas por *S. aureus* dependem dos seus fatores de virulência que estão relacionados aos componentes da superfície estrutural e toxinas (Kakoullis et al., 2021). Podendo ser destacado as estruturas, tais como a cápsula polissacarídica que impedem a fagocitose e permite a adesão às células do hospedeiro (Kakoullis et al., 2021). O peptidoglicano capaz de ativar o sistema complemento e estimular a produção de citocinas, assim como também as proteínas de superfície, como a proteína A (SpA) e proteínas ligantes de fibronectina (FnBP) e a proteína ligante de fibrinogênio (FbBP) (Lakhundi, Zhang, 2018).

A proteína A (conhecida como SpA: *staphylococcal protein A*) está associado a processos inflamatórios do epitélio das vias aéreas que ocasionam dano tecidual grave, isto porque a bactéria possui a capacidade de se ligar ao receptor de citocina - Fator de Necrose Tumoral 1 (TNF1 do inglês *Tumor Necrosis Factor*), presentes em células epiteliais pulmonares, este, por sua vez, desencadeia a expressão de quimiocinas, como a interleucina 8 (IL-8) e o recrutamento de neutrófilos (Dias, Zuccoli, 2012; Kakoullis et al., 2021). Já a proteína ligante de fibronectina (FnBP) possui um mecanismo facilitador de aderência e invasão do patógeno as células do hospedeiro através de uma ponte de ligação entre FnBP e uma molécula do tipo integrina da superfície da célula hospedeira, estas são freqüentemente encontradas em cepas de pacientes com infecção na corrente sanguínea e endocardites infecciosas (Dias, Zuccoli, 2012; Kakoullis et al., 2021).

Dentre os fatores de virulência associado as toxinas, podem-se destacar a enterotoxina F responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST-1) que é referida pela língua inglesa como *toxic shock syndrome*, que se caracteriza como a de maior risco a vida do paciente, pois trata-se de uma infecção altamente inflamatória que pode causar erupção cutânea e disfunção de vários sistemas essenciais (Dias, Zuccoli, 2012). A toxina da síndrome da pele escaldada estafilocócica (SPEE), que é uma doença potencialmente fatal que afeta principalmente crianças e causa descamação da pele devido a produção da toxina esfoliativa A e B.

Durante o processo infeccioso a *S. aureus* produz inúmeros mecanismos de virulência como, citolisinas, superantígenos, proteases, lipases, hialuronidases, catalases e coagulases, isto torna estes microrganismos capazes de se adaptarem a diversas condições do hospedeiro e aos diferentes cenários, principalmente em ambientes hospitalares onde sua propagação pode ser pouco controlada devido a existência de isolados MRSA (Rossato, 2021).

2.2. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

As infecções hospitalares são definidas pelo centro de controle e prevenção de doenças (CDC), como infecções em serviços de saúde (ISS) ou Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), causadas por bactérias, fungos e vírus durante os cuidados hospitalares. As infecções hospitalares dificultam e agravam a situação dos pacientes enfermos, podendo levar à sepse ou morte, além de afetar a qualidade dos serviços de saúde (WHO, 2021b). Desde 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem realizando campanhas nacionais e internacionais com objetivo de minimizar as infecções hospitalares, principalmente visando a segurança dos pacientes, profissionais e circulantes, intitulado “Uma Assistência Limpa é uma Assistência mais Segura” (ANVISA; OPAS; OMS, 2009).

Já em 2015, os países adotaram um plano de ação global para combater a resistência aos antimicrobianos (RAM), que tinha como o principal objetivo melhorar a conscientização e compreensão da RAM por meio de comunicação, educação e treinamento eficaz dos profissionais de saúde. A cada ano, novas campanhas vêm sendo criadas pelas organizações com intuito de conscientizar sobre a RAM e a importância do uso racional dos antimicrobianos por meio de procedimentos prudentes e responsáveis, como a campanha “Semana Mundial de Conscientização

sobre o Uso de Antimicrobianos” (*World Antimicrobial Awareness Week-WAAW*), criada em 2021.

Em 2023 as organizações quadripartites que são compostas pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), reforçaram que RAM é um problema mundial, que devem envolver todos os setores, seja ele humano, animal, vegetal e ambiental. Também foi reforçado que o problema da RAM deve ter uma abordagem de “saúde única”, tendo em vista que a resistência é um problema que tem se propagado em todos os setores e põem em risco todas as espécies.

Do mesmo modo, no Brasil foi elaborado o “Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da saúde única entre os anos de 2018 a 2022” (PAN-BR) com os objetivos estratégicos bem definidos pela aliança tripartite, visando estabelecer rede nacional de laboratórios para a vigilância e monitoramento da RAM no âmbito da saúde humana, assim como promover e apoiar capacitação contínua dos profissionais e gestores com atuação nas áreas da saúde humana, animal e ambiental, além de ser proposto objetivos que vise fomentar pesquisas em desenvolvimento e inovação em prevenção de infecções associadas a RAM dentre outros.

No Brasil, desde 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelas ações nacionais de prevenção e controle de IRAS, exercendo a atribuição de coordenar e apoiar tecnicamente as Coordenações Distritais/Estaduais e Municipais de Controle de IRAS. Além da ANVISA, existem diversas leis e portarias que objetivam controlar as infecções hospitalares, entre estas pode-se destacar a lei de nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997 que obriga todos os hospitais do país a manter um Programa de Controle de Infecções Hospitalares (PCIH). A Portaria 2.616 de 12/5/1998, foi criada para regulamentar a lei nº 9.431, impondo as diretrizes e normas para prevenir e controlar as infecções hospitalares e regulamentar as ações do Programa de Controle de Infecções Hospitalares (BRASIL, 1998). Como uma forma de endossar a ANVISA em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), criou a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana (RM), como uma forma de reduzir a propagação de resistência microbiana em serviços de saúde (ANVISA; OPAS; OMS, 2009).

As ISS se agravaram ainda mais devido a pandemia de COVID-19 e expôs muitos desafios e lacunas na prevenção e controle de infecções em todos os países, incluindo aqueles que tinham os programas mais avançados, por outro lado proporcionou novas oportunidades visando aumentar a prontidão em resposta aos surtos por meio das práticas de prevenção e controle de infecções, além de possibilitar o melhoramento e fortalecimento dos programas em todo o sistema de saúde (OMS, 2022; WHO, 2020).

Sendo que o aumento do número de infecções e morte associado a ISS causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas no mundo, vem sendo atribuída a doze principais infecções, dentre as quais podem ser destacadas: infecções do trato urinário, infecções da corrente sanguínea; diarreia; infecções bacterianas da pele e sistemas subcutâneos; infecções relacionadas ao tórax; infecções peritoneais e intra-abdominais; meningite, pielonefrite; infecções de ossos, articulações e órgãos relacionados; endocardite e outras infecções cardíacas e infecções bacterianas do sistema nervoso central (SNC) (OMS, 2022).

2.3. EPIDEMIOLOGIA E RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência antimicrobiana (RAM), é definida como a capacidade adquirida por um microrganismo de resistir a um determinado fármaco ao qual este era normalmente sensível, mas ao longo do tempo esses microrganismos patogênicos não respondem mais ao tratamento, como resultado, os antibióticos se tornam ineficazes e as infecções persistem, aumentando o risco de propagação e consequentemente levando a morte do paciente debilitado (WHO, 2021b).

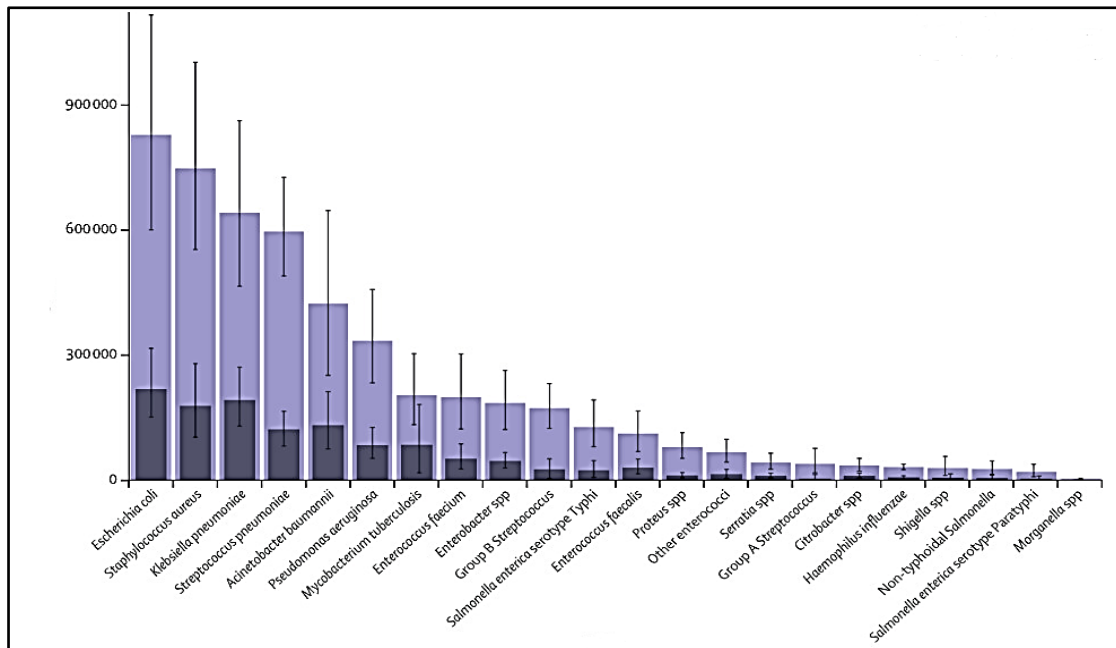
Com as descobertas dos antibióticos houve uma redução no número de mortes causadas por agentes microbianos. Porém ao longo dos anos as bactérias comensais evoluíram e gradualmente foram sendo relatados ao redor do mundo diversas ocorrências de infecções nos ambientes hospitalares, ambulatoriais e infecções de comunidade (Desvaux et al., 2020; Murray et al., 2022). As ocorrências de infecções são frequentemente relatadas, com maior gravidade, nos ambientes hospitalares, onde esses problemas de natureza infecciosas podem estar relacionados a fatores inerentes à patologia ou tratamento destes pacientes, como também associados às internações prolongadas, ou ainda decorrentes do próprio ambiente hospitalar (Murray et al., 2022; WHO, 2021b). A RAM vem crescendo rapidamente como uma pandemia silenciosa e se tornou uma das principais ameaças

à saúde pública a nível mundial tornando um problema complexo, tanto para a saúde humana, como para a saúde animal, vegetal e ambiental (Zohra et al., 2021; WHO, 2020). Por isso, a resistência antimicrobiana (RAM) tem sido priorizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública (WHO, 2020).

Muitas pesquisas a nível mundial vêm reportando a gravidade da RAM, como a pesquisa realizada pelo governo do Reino Unido que prevê que a RAM poderá matar 10 milhões de pessoas por ano até 2050. Apesar das diversas discordâncias em relação a previsão, é possível verificar a magnitude atual da carga de RAM e infecções de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA no ambiente nosocomial e de comunidade. Sendo também listada nos relatórios da OMS de 2017 e 2019, como patógenos de prioridade crítica e alta na busca de novos antimicrobianos e novas alternativas de prevenção, principalmente devido à escolha limitada de antibióticos e o constante aumento nas altas taxas de letalidade (WHO, 2017).

Recentemente Murray e colaboradores (2022) realizaram uma análise sistemática da carga global de resistência antimicrobiana de 204 países e territórios, sendo isolados 23 patógenos. Segundo os levantamentos, houve um total de 4,95 milhões de mortes associadas à RAM em 2019. Porém em nível regional, estima-se que a taxa de mortalidade em todas as idades atribuída à RM, seja mais alta na África subsaariana ocidental, com 27,3 mil de mortes por 100.000 habitantes. Em relação aos 23 patógenos isolados nos diferentes países é possível destacar seis principais microrganismos, que por ordem de morte, foram responsáveis por 250.000 mortes associada à RAM, como: *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, e juntos esses seis patógenos foram responsáveis por 929.000 mortes, porém em algumas regiões do mundo a carga de morte por RAM está associada a duas principais bactérias, sendo 25,1% pelo *S. aureus* e 24,3% pela *E. coli* (FIGURA 2).

Figura 2 - Mortes globais atribuíveis e associadas à resistência bacteriana por patógeno em 2019



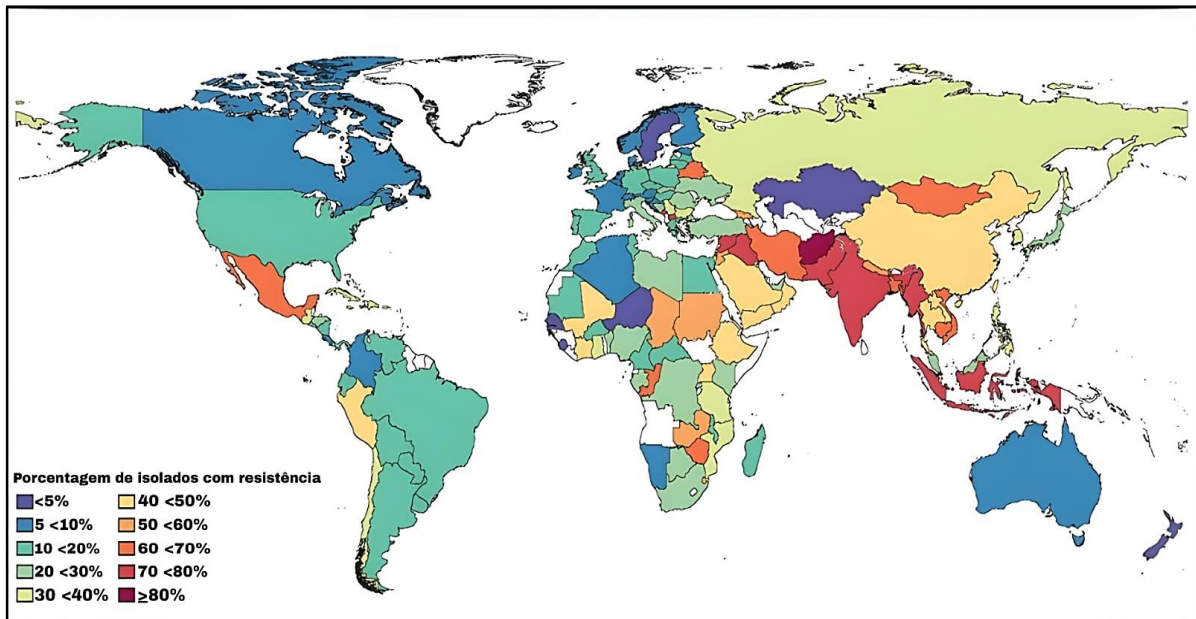
Fonte: Murray et al (2022).

Nota: Associado à resistência (azul claro); atribuível à resistência (azul escuro)

O mesmo estudo realizado por Murray e colaboradores (2022), verificou 88 combinações de patógenos versus medicamentos que estavam associados a morte direta a RAM, e deste, *S. aureus* resistente à meticilina, causou mais de 100.000 mortes atribuíveis à RAM em 2019 (FIGURA 5), enquanto mais seis patógenos causam em torno de 50.000 a 100.000 mortes cada um, incluindo *E. coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração (FIGURA 3) e *E. coli* resistente a fluoroquinolonas (FIGURA 4).

A vigilância da União Europeia vem demonstrando em seus relatórios todos os anos mais de 670.000 infecções associadas RAM e aproximadamente 33.000 pessoas morrem como consequência direta da RAM (WHO, 2022). Nos relatórios anuais vem sendo demonstrado um elevado aumento da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos carbapenêmicos, com taxa de iguais ou superiores a 50% principalmente a imipenem e meropenem, nos países: Bielorrússia, Bósnia e Herzegovina, Montenegro, República da Moldávia, Sérvia e Ucrânia.

Figura 3 - Ocorrência mundial de *Escherichia coli* resistente à cefalosporina de terceira geração por país e território



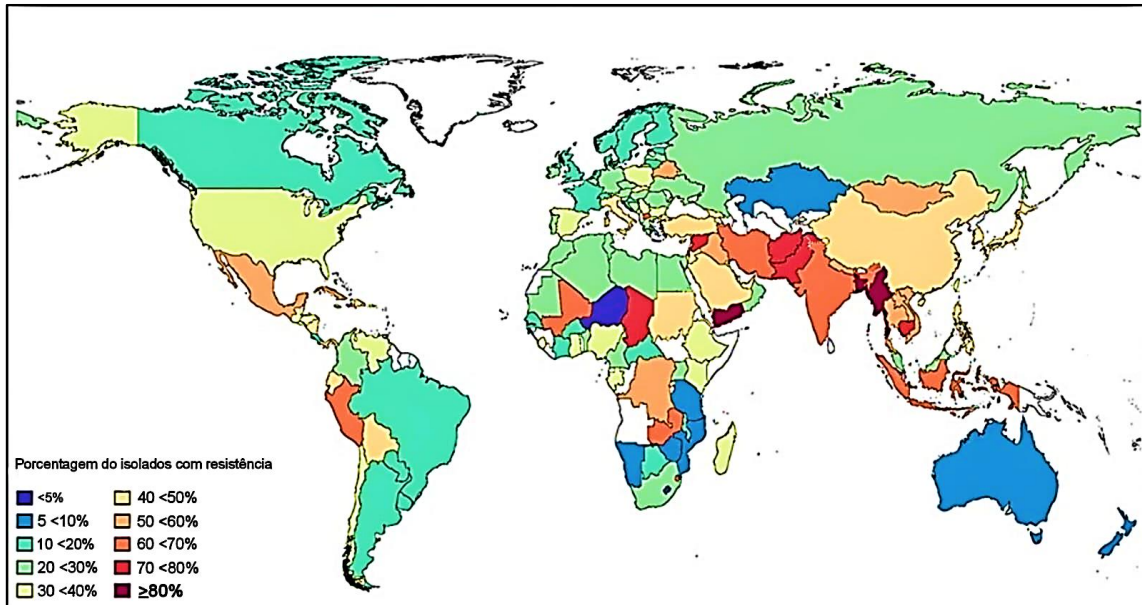
Fonte: Murray et al (2022).

Já a *E. coli* vem apresentando resistência iguais ou superiores a 50% a cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima pertencente ao grupo das cefalosporina de terceira geração em cinco países (Bielorrússia, Macedónia do Norte, Federação Russa, Turquia e Ucrânia), e houve um aumento de 1% dos isolados de *E. coli* resistentes ao imipenem e meropenem pertencentes ao grupo dos carbapenêmicos. Em relação a MRSA a porcentagens foi igual ou superior a 25% nos países Bielorrússia, Croácia, Chipre, Grécia, Itália, Macedónia do Norte, Portugal, Roménia, Sérvia e Turquia (WHO, 2022).

Nos últimos anos houve um aumento de cepas de *E. coli* resistentes à classe de cefalosporinas de terceira/quarta/quinta geração, gerando preocupação para tratamento de infecções invasivas (Murray et al., 2022; WHO, 2021a; WHO, 2022). Devido a esse aumento de resistência a classe de cefalosporinas, são necessários recorrer a uso mais frequentes dos carbapenêmicos, uma classe de antibióticos usado como um último recurso nos tratamentos de infecções mais letais (Mackinnon et al., 2020; WHO, 2021a; WHO, 2021b). Como pode ser observado em um estudo recente realizado por Jiang et al., (2020), que identificou resistência de 13,6% de infecções causadas por *E. coli* produtoras de enzimas β -lactamases espectro ampliado (ESBL) em pacientes com câncer do gastrointestinal. Nos estudos de Chong et al., (2018) foi

reportado uma taxa de 18,3% a 30% de infecções nosocomiais nos Estados Unidos (EUA) e Ásia causada por *E. coli* produtora ESBL.

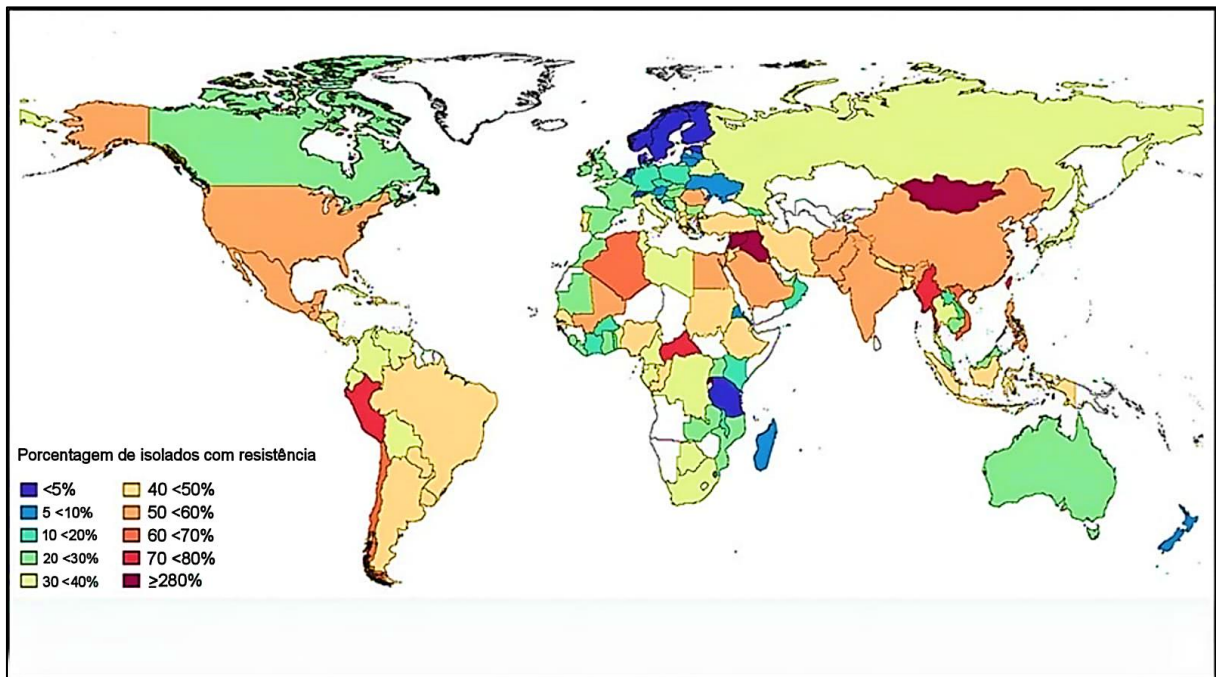
Figura 4 - Ocorrência mundial de *Escherichia coli* resistente à fluoroquinolonas por país e território



Fonte: Murray et al (2022).

Outros estudos vêm reportando a ocorrência de infecções causada por *E. coli* no mundo, como no estudo de coorte realizado por Stoll et al., (2020), que avaliou 217.480 crianças prematuras e identificou a ocorrência de *E. coli* em 36,6% dos casos de sepse neonatal, sendo que 74,1% isolados eram resistentes à ampicilina, e a taxa foi ainda maior em bebês infectados cujas mães receberam a ampicilina intraparto com resistência de 81,8%. Assim como também nos estudos retrospectivos realizados Huang et al., (2022) que analisou amostras de urocultura entre os anos de 2009 a 2020 em um Hospital da China, e desse 34% de infecções do trato urinário eram em criança, 43% em adultos e 44% em idosos. A *E. coli* também vêm apresentando diferentes genes de resistência aos antibióticos das classes dos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Murray et al., 2022; Raeispour, Ranjbar, 2018). A resistência aos aminoglicosídeos é devido a produção de enzimas como acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases, já a resistência às fluoroquinolonas é devido aos polimorfismos de nucleotídeo (Kakoullis et al., 2021).

Figura 5 - Ocorrência *Staphylococcus aureus* resistente a metilina por país e território



Fonte: Murray et al (2022).

Os diversos relatos no aumento de resistência e infecções de *P. aeruginosa* está associado a adaptabilidade desse patógeno aos diversos ambiente, e com isto, vem adquirindo resistência devido múltiplas mutações cromossômicas, tornando-se preocupante para a terapia antimicrobiana de pacientes infectados (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; Yoon, Jeong, 2021). As infecções causadas por esse patógeno são difíceis de ser tratada devido à resistência intrínseca e adquirida a muitos antibióticos, como os antibióticos das classes de β - lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e polimixinas (Moradali, Ghods, Rehm, 2017; WHO, 2021a). Segundo um levantamento realizado por Cassini e colaboradores (2019) a *P. aeruginosa* MDR é responsável por 61.892 casos e 4.155 mortes atribuídos a cepas resistentes ao grupo dos carbapenêmicos, enquanto 1.262 casos e 84 mortes são atribuídos a cepas resistentes à colistina.

Dados da Rede Nacional de Segurança em Saúde dos EUA de 2015 a 2017 analisou a ocorrência de patógenos associado a IRAS em adultos e destes os 3 principais patógenos relatados foi *E. coli* com 18%, seguido de *S. aureus* com 12% e *P. aeruginosa* 8%. O mesmo estudo ao analisar a ocorrência de patógenos de infecção na corrente sanguínea associada ao cateter, o mais frequentemente relatados foi *S. aureus* com 9,1%, *E. coli* com 4,1% e *P. aeruginosa* 3,9 %. Já em

relação a ocorrência associado a pneumonia em UTIS o mais isolado foi *S. aureus* 28,8% e *P. aeruginosa* 12,9%, porém ao analisar a ocorrência nas enfermarias de cuidados intensivos verifica uma maior ocorrência de *P. aeruginosa* com 32,6 % e *S. aureus* com 21,2% e *E. coli* 3,7% (Weiner-Lastinger et al., 2020).

A resistência das cepas de *S. aureus* vem sendo relatado desde o início da década de 1940, quando a resistência à penicilina em *S. aureus* foi descrita, a partir, observou-se a capacidade deste microrganismo desenvolver novos mecanismos de resistência a quase todos os antibióticos utilizados contra ele, permitindo-lhe tornar-se resistente a todos os β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, vancomicina, daptomicina e linezolida (Kakoullis et al., 2021). Em decorrência surgiu a cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), a resistência a meticilina aconteceu devido a aquisição de um elemento genético móvel denominado *cassete cromossômico estafilocócico MEC* (SCCmec vêm do inglês, *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que contém o gene *mecA*, que é responsável pela alteração das proteínas de ligação de penicilinas (PBPs em inglês, *Penicillin Binding Proteins*) (Turner et al., 2019). Os PBPs são enzimas responsáveis pela reticulação dos peptídeoglicanos na parede celular bacteriana (Turner et al., 2019). Assim, a maioria dos MRSA expressam PBP2a, levando a baixa afinidade pelos β -lactâmicos, tornando difícil o seu tratamento (Lakhundi, Zhang, 2018; Turner et al., 2019).

O uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de diversas infecções vem contribuído para o surgimento de microrganismos resistentes a múltiplas drogas (no inglês é conhecido como *Multidrug resistant organisms*) (MDROs) e extensivamente resistente a droga (*Extensively drug resistant*) (XDR) ou pan-resistentes (*Pandrug-resistance*) (PDR). Sendo que os microrganismos que são definidos como MDROs, são aqueles resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes distintas, e aos fenótipos PDR e XDR, são aqueles resistentes a todas as classes de antimicrobianos ou já apresentaram resistência a todas as classes de antibióticos (Horcajada et al., 2019; WHO, 2021a).

2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A resistência aos medicamentos, causados pelos agentes infecciosos pode ser caracterizada inicialmente como intrínseca ou adquirida (Costa, Silva Junior, 2017). A resistência intrínseca é um fenômeno natural que ocorre quando os microrganismos não apresentam alvo apropriado ou possuem barreiras naturais que previnem o agente de alcançar o alvo (Costa, Silva Junior, 2017; WHO, 2021a; WHO, 2021b).

Já a resistência adquirida reflete em uma verdadeira modificação na composição genética dos microrganismos, sendo induzidos por intermédio de agentes mutagênicos e alquilantes, tornando o antimicrobiano ao qual era originalmente eficaz, deixar de agir frente ao patógeno, tornando o mesmo resistente (Costa, Silva Junior, 2017; WHO, 2021a; WHO, 2021b). A resistência adquirida tem origem genética e decorre de diversas modificações na estrutura da célula bacteriana, permitindo o bloqueio da ação dos antibióticos e consequentemente a sua sobrevivência, e essa sobrevivência está associada a quatro principais mecanismos de resistência: Bombas de efluxo; modificação no sítio de ação, modificação da permeabilidade da membrana, inativação enzimática e formação de biofilmes (Costa, Silva Junior, 2017). De uma forma geram novos mecanismos de resistência que vem surgindo e se espalhando pelo mundo, ameaçando nossa capacidade de tratar doenças infecciosas comuns, que resultam em internação mais prolongada, e gerando risco de morte.

2.4.1. Bomba de efluxo

Bomba de efluxo são proteínas membranares que são responsáveis pela produção de proteínas que atravessam toda a parede celular bacteriana, incluindo a membrana citoplasmática, e que, ativamente promove o efluxo dos antibióticos no interior da célula, prevenindo acumulação intracelular necessária para letalidade (Goh et al., 2002; Costa, Silva Junior, 2017). Esse mecanismo é o principal responsável pelo fenômeno de resistência intrínseca aos antibióticos, também podendo contribuir para a resistência adquirida (Wu, Hsieh, Wu, 2011). Cabe salientar que esse mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, podendo ser detectados tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Goh et al., 2002). A grande maioria das bactérias possui diferentes tipos de bombas de efluxo, podendo ser destacados seis famílias de bombas de efluxo em bactérias classificadas com base na estrutura e fonte de energia: Os sistemas de efluxo são classificados em seis grandes famílias: A

pequena família SMR (*small multidrug resistance*), família RND (*resistance nodulation division*), superfamília MFS (*Major facilitator*), superfamília ABC/ATP (binding cassette), família MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) e mais recentemente foi identificada a superfamília PACE (proteobacterial antimicrobial compound efflux), que foi associado a clorexidina em *Acinetobacter* (Acel) (Blanco et al., 2016). Sendo que as famílias SMR, MFS, ABC e MATE já foram relatados tanto em bactérias Gram-positivas como nos grupos das Gram-negativas (Blanco et al., 2016). Já a superfamília RND é específica de bactérias Gram-negativas e a proteína de efluxo MDR é mais estudada em cepas de *S. aureus* que superexpressam o gene Nor A, que também são encontradas em cepas MRSA (Blanco et al., 2016). Uma das cepas que vem sendo reportado na literatura a superexpressão por diversas bombas de efluxos são as cepas de *P. aeruginosas*, como no caso da bomba de efluxos MexAB-OprM que vem sendo bastante explorada devido a mutação no gene que levou a sua superexpressão resultando na resistência a fluoroquinolonas e β -lactâmicos (Simanek, Paczkowski, 2022), outras bombas que também vem sendo bastante explorada são MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (Sionov; Steinberg, 2022). A *E. coli* também usa diferentes sistemas de efluxo como as proteínas transportadoras ABC e complexo de bombas MacAB-TolC e AcrAB-Tolc, que são responsáveis por proteger a bactéria de entrada de substâncias tóxicas, detergentes e antibióticos (Huang, Wu, et al., 2022; Rozwadowski, Gawel, 2022).

2.4.2. A modificação do sítio de ação do antimicrobiano

A modificação do sítio de ação do antimicrobiano é adquirida por mutação cromossômica, sendo pouco frequente a participação de plasmídeos. Essa modificação ocorre por meio da aquisição de genes que codificam novos produtos e acarretam a alteração estrutural no sítio de ação como também a modificação no local de ligação, e consequentemente não afetam a célula bacteriana (Costa, Silva Junior, 2017). Os exemplos desse tipo de resistência incluem mutações na RNA polimerase, DNA girase, transferência de genes de resistência por meio de troca genética como: conjugação, transdução ou transformação (Silva et al., 2020a). Esse tipo de resistência é muito comum na classe das penicilinas e cefalosporinas, devido a mutação nos genes que codificam as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), essa proteína ligante de penicilina tem baixa afinidade aos β -lactâmicos devido atuação por

transpeptidases (Costa, Silva Junior, 2017). Este mecanismo de resistência é bastante reportado em *Staphylococcus aureus* portadores do elemento genético móvel chamado SCCmec que possui o gene *mecA*, que confere resistência a meticilina (Dzidic et al., 2008). Outra forma de resistência é a modificações dos aminoácidos D-alanina na extremidade do peptidoglicano, reduzindo afinidade da droga, este mecanismo comumente encontrado na classe dos glicopeptídeos, além de ser bastante disseminada em diversas bactérias Gram-positivas por meio de replicação de clones bacterianos ou transferência horizontal de genes (Silveira et al., 2006; Costa, Silva Junior, 2017). Em cepas de *P. aeruginosa* a mutação dos genes *gyrA*-*gyrB* e *parC*-*parE* presentes no receptor da droga conferiu resistência a quinolonas (Sousa et al., 2021), enquanto a alteração no ribossomo 30S modificou o alvo dos aminoglicosídeos favorecendo a resistência contra essa classe (Behzadi, Baráth, Gajdács, 2021).

2.4.3. Modificação na permeabilidade das membranas

A modificação na permeabilidade das membranas bacterianas também é outra forma de resistência. Porém a resistência pode ocorrer de três formas distintas: difusão simples através da bicamada fosfolipídica; difusão facilitada mediada por proteínas membranares chamadas porinas e *self promoted uptake* (Costa, Silva Junior, 2017). Quando estas porinas perdem suas funções ou ocorrem mutações nos genes codificadores de porinas que resultam na perda destas, além de ocorrer uma diminuição na permeabilidade de fármacos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em bactérias gram-negativas (Li; Plésiat; Nikaido, 2015). As bactérias Gram-negativas são intrinsecamente mais impermeáveis a muitos antibióticos devido a sua membrana externa (Blair et al., 2015), como no caso da *P. aeruginosa* que possui a permeabilidade restrita e estima-se que a sua membrana seja de 12 a 100 vezes menos permeável do que a *E. coli*. Além da *P. aeruginosa* ter a resistência associada a impermeabilidade devido a troca da porina não específica (OprF) pelas seletivas (OprB, OprD, OprE, OprO e OprP), que impede a entrada de fármacos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e outros (Sousa et al., 2021), como também, a redução da porina OprD que compromete a absorção de antibióticos do grupo dos carbapenêmicos (Behzadi, Baráth, Gajdács, 2021).

2.4.4. Inativação enzimática dos antibióticos

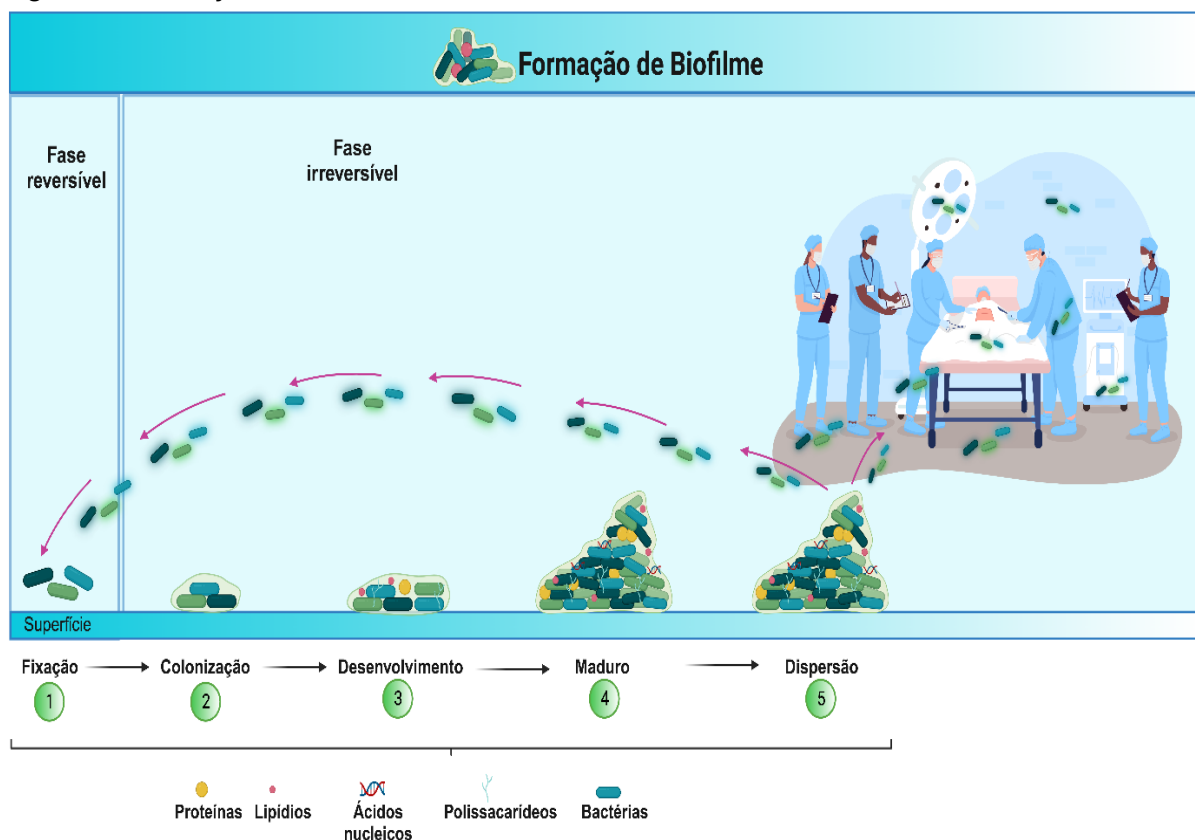
Já os mecanismos de resistência relacionados à inativação enzimática dos antibióticos, vem sendo descrito como um dos principais fatores associados ao aumento de resistência a nível global em unidades de saúde e nas comunidades. Essas enzimas podem modificar ou destruir as estruturas químicas dos antimicrobianos envolvendo três tipos de reações enzimáticas: hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxi-redução (Kumar, Varela 2013; Costa, Silva Junior, 2017). A classe mais importante dessas enzimas é representada pelas β -lactamases (ESBL) que são enzimas específicas responsáveis pela inativação hidrolítica do anel β -lactâmico dos antibióticos penicilínicos e cefalosporínicos (Kumar, Varela 2013). Já as carbapenemases são β -lactamases que medeiam resistência aos carbapenêmicos (Poirel; Jayol; Nordmanna, 2017). Em contrapartida existem várias bactérias gram-positivas e gram-negativas que produzem uma gama de enzimas que podem ser codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos através de plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou ser induzido (Kumar, Varela 2013). Na *P. aeruginosa* esse mecanismo é visualizado através da produção das β -lactamases da classe A de ambler do tipo TEM, onde essa enzima realiza a quebra de cefalosporina e penicilinas impedindo a ação do fármaco (Oliveira et al., 2020).

2.4.5. Formação de biofilme

A formação de biofilme é considerada de acordo com Kumar, Varela (2013) como um novo modo de mecanismo de resistência, capaz de produzir aderência a uma matriz extracelular polimérica que permite a permanência de uma única ou múltiplas bactérias em um substrato, abiótico ou biótico. A formação de biofilme é um processo extremamente complexo e dinâmico, no qual comunidades organizadas de microrganismos são incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que agrupa as células microbianas (Yin et al., 2019). A formação do biofilme é um ciclo sem fim e se baseia em cinco principais etapas: (1) Fixação: as células microbianas aderem à superfície de forma reversível; (2) Colonização: as células microbianas aderem à superfície de forma irreversível via flagelos, pili, dentre outros; (3) Desenvolvimento: multicamadas de células se acumulam e produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS); (4) Maduro: formação estável de uma

comunidade tridimensional; (5) Dispersão: os microrganismos são disseminados do biofilme agregado e retornam ao estado planctônico (FIGURA 6) (Yin et al., 2019). O desenvolvimento de um biofilme maduro pode levar algumas horas ou semanas, dependendo das condições do ambiente, além de se tornar um desafio na área da saúde, pois reduz o potencial das quimioterapias com os antimicrobianos ou anula seu efeito (Kumar, Varela 2013; Yin et al., 2019). A formação de biofilme é um modo de crescimento único escolhido por diversos microrganismo em resposta a vários estresses ambientais, que favorece a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* a crescerem em vários ambientes extremos, como: Radiação (UV); temperatura extrema, pH extremo, alta pressão, assim como aderido a diversos dispositivos médicos e hospitalares (Yin et al., 2019).

Figura 6 - Formação de biofilme



Fonte: "O autor" (2023).

Nota: Criado no programa Biorender.com

2.5. ELETROFIAÇÃO (*ELECTROSPINNING*)

A técnica “*Electrospinning*”, comumente traduzida em língua portuguesa como eletrofiação, é uma técnica altamente versátil, eficiente, barato e reprodutível que vem sendo utilizado para processar soluções ou fundidos, além de ser bastante aplicado na fabricação de nanofibras uniformes e contínuas a partir de vários materiais como polímeros, cerâmicas, compósitos com uma ampla gama de diâmetros e aplicações (Gonzalez et al., 2021; He et al., 2018; Liu, Z; Ramakrishna; Liu, X, 2020).

Neste contexto, uma quantidade expressiva de estudos que vêm reportando a obtenção de fibras em escala micrométrica (10-100 μm) e sub-micron ou nanométrica (0,01-0,1 nm) utilizando a técnica “*Electrospinning*”, principalmente por ser uma técnica bem estabelecida para a fabricação de materiais fibrosos, além de apresentar qualidades atrativas principalmente relacionada a proporção de área/volume, estrutura porosa, resistência, flexibilidade, biocompatibilidade, funcionalidade ajustável e dentre outras (Mori et al., 2018; Mochane et al., 2019).

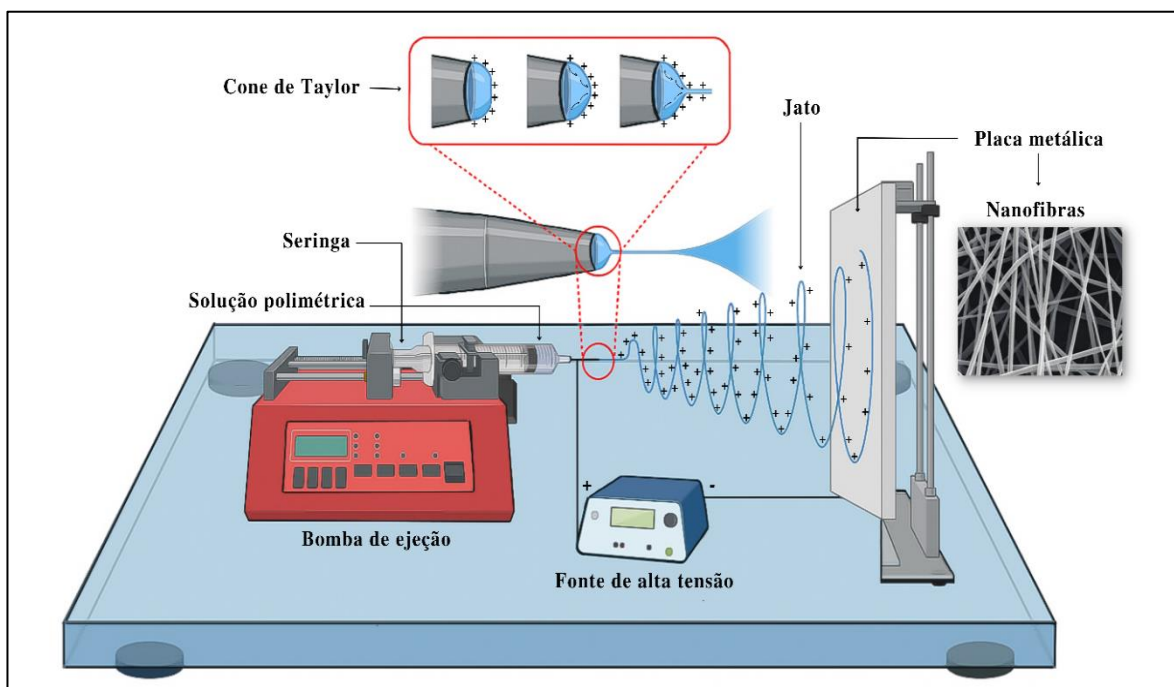
O equipamento de eletrofiação, consiste basicamente em três partes: Primeiro, uma fonte de alta tensão, segundo uma bomba de infusão, contendo uma seringa plástica hipodérmica com agulha metálica (ou capilar como também é conhecido) e o terceiro, um coletor metálico aterrado, que pode ser em forma de uma placa, tela ou mandril rotativo (Mori et al., 2018; He et al., 2018).

Já o processo de eletrofiação, inicialmente, é obtido uma solução composta por polímero disperso em um ou mais solventes, e injetada em uma ou mais seringas plásticas, que ao ser conectada a uma fonte de alta voltagem a solução de polímero é bombeada através de uma bomba de fluxo constante para formar uma gota na ponta da agulha (Mori et al., 2018). Quando a tensão é aplicada, a gota adquire a forma de um cone na direção do coletor, formando uma estrutura conhecida como “cone de Taylor” (Mori et al., 2018; Xue et al., 2019). Esse processo ocorre quando as duas forças opostas são iguais, fazendo com que forças de atração e repulsão superem a tensão superficial da solução polimérica e com isto, a gota se rompe em jatos finos numa trajetória cônica. À medida que o jato percorre da ponta da agulha para o coletor, as moléculas de polímeros são esticadas e o solvente evapora formando as fibras, as quais são recolhidas, sob a forma de uma membrana na superfície do coletor (He et al., 2018; Mercante et al., 2021). Nesse processo de eletrofiação a seringa contendo a solução polimérica pode ser colocada de duas formas, sendo na direção horizontal

(FIGURA 7) e na direção vertical. Sendo que na direção horizontal a taxa de ejeção é controlada por uma bomba de infusão e na vertical a vazão da solução é controlada principalmente pela gravidade (Mercante et al., 2021; Soltani et al., 2020).

A eletrofiação apesar de simples, diversos fatores podem influenciar na obtenção das fibras, com isto, ao longo do procedimento devem ser estudados e controlados os parâmetros que serão aplicados, visto que os parâmetros aplicados de forma não padronizada podem influenciar diretamente nas propriedades das fibras, e consequentemente obter biomateriais defeituosos no que corresponde a densidade, comprimento, espessura, porosidade, cargas superficiais, entre outras (Kadavil et al., 2019; Xue et al., 2019).

Figura 7 - Esquema de um sistema de eletrofiação convencional horizontal



Fonte: "O autor" (2022).

Nota: Criado no programa Biorender.com

Esses parâmetros são divididos em três grupos, sendo os parâmetros de processo, parâmetros de solução e parâmetros ambientais (He et al., 2018). Nos parâmetros de processo podem ser destacados a voltagem aplicada, diâmetro da agulha ou vazão e distância entre a agulha e o coletor (TABELA 1) (Kadavil et al., 2019). Nos parâmetros de solução incluem os solventes, concentração, viscosidade, condutividade da solução ou elétrica e a tensão superficial (TABELA 1) (Kadavil et al.,

2019). Já nos parâmetros ambientais incluem umidade e temperatura, que deve ser controlado, sem o controle nos parâmetros ambientais, todos os anteriores ficam totalmente vulneráveis (TABELA 1) (Mori et al., 2018; Xue et al., 2019).

Outro ponto chave no processo de eletrofiação é a escolha correta do polímero a ser utilizado na produção das nanofibras eletrofiadas (NFs) (Mercante et al., 2021). Na literatura são reportados uma infinidade de polímeros naturais e sintéticos, de origem natural ou sintética, que são utilizados para eletrofiar NFs individuais, quanto na forma de mantas ou membranas de fibras dispostas de forma orientada ou randômica (Çay et al., 2017; Kuntzler et al., 2020). Sendo que tanto os polímeros de origem naturais quanto polímeros de origem sintéticos, ou uma mistura de ambos, podem ser empregados na fabricação de NFs, desde que possam ser dissolvidos em solventes apropriados para obter soluções ou fundidos sem degradação (Ghosh et al., 2017; Hussein et al., 2021; Mishra et al., 2019).

Tabela 1 - Os Parâmetros do processo de eletrofiação

Parâmetros	Subdivisões dos parâmetros	Descrições/importância
Parâmetros de processo	Voltagem aplicada	Geralmente, o aumento da voltagem favorece a formação de fibras com menores diâmetros. No entanto, a partir de certo ponto o aumento da voltagem pode estar relacionado com a formação de fibras mais espessas e com mais defeitos.
	Vazão da solução	O aumento da vazão favorece a formação de fibras com maiores diâmetros e defeitos.
	Distância de trabalho/ agulha e coletor	Deve apresentar valor adequado para garantir o alongamento do jato e evaporação do solvente. Maiores distâncias favorecem a formação de fibras com menores diâmetros.
Parâmetros de solução	Massa molecular	A massa molecular do polímero está diretamente relacionada com o comportamento reológico da solução. O aumento da massa molecular tende a favorecer a formação de fibras mais homogêneas.
	Concentração/Viscosidade	Observa-se uma tendência de formação de fibras mais espessas com o aumento da concentração/viscosidade da solução.
	Condutividade	O aumento da condutividade tende a favorecer a obtenção de fibras com menores diâmetros e sem defeitos.
Parâmetros ambientais	Temperatura	A temperatura afeta a viscosidade da solução e o processo de evaporação do solvente. Temperaturas mais elevadas favorecem a formação de fibras com menores diâmetros.
	Umidade	Afeta o processo de evaporação do solvente. Uma maior umidade relativa tende a induzir a formação de poros na superfície das fibras.

Fonte: Adaptado segundo Mercante et al (2021).

Os polímeros de origem natural podem-se destacar o emprego dos colágenos, gelatina para Sensores de pressão (Ghosh et al., 2017), acetato de celulose (Kim et al., 2015), quitosana para engenharia de tecidos cutâneos (Prasad et al., 2015), assim como a utilização de caseína, proteína de seda, quitina (Mercante et al., 2021). Já nos casos dos polímeros sintéticos existe uma gama de polímeros que vem sendo utilizado na fabricação de NFs, para diversas aplicabilidades, conforme reportado na literatura a utilização de poli (ácido láctico) (PLA) para filtração e adsorção de poluentes (Zhang et al., 2019), poli (álcool vinílico) (PVA) para curativos (Çay et al., 2017), Poli (fluoreto de polivinilideno) (PVDF) em sensores como Indicador colorimétrico de PH (Kuntzler et al., 2020) e dentre outros conforme a Tabela 2.

As nanofibras eletrofiadas podem ser usadas para a criação novos materiais biodegradáveis com ação antimicrobianas, antifúngicos e antivirais, incluindo máscaras faciais, filtros, aventais e luvas (Ferreira et al., 2022; Khanzada et al., 2020). Várias pesquisas recentes de diferentes nanofibras eletrofiadas vêm sendo desenvolvidas e carregadas com diferentes tipos de substâncias como extratos, nanopartículas, medicamentos, peptídeos, óleos etc. (Hussein et al., 2021). Como no caso do estudo conduzido por Alshabanah et al., (2021) que obteve nanofibras eletrofiadas de poliuretano termoplástico (TPU), incorporado ao óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) visando aplicação em camada funcional elástica para aplicações médicas de proteção individual, contra bactéria e vírus. Outro trabalho recente realizado por Khanzada et al., (2020), que desenvolveu nanofibras eletrofiadas do gel da planta Aloe Vera, incorporado ao polímero álcool Polivinílico (PVA), e as nanofibras obtidas apresentaram excelente atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*. Assim como outros trabalhos como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - A utilização de diversos polímeros eletrofiados com diversas aplicabilidades

Aplicações	Polímeros/materiais	Tipo de NF	Aplicações e Atividades	Referência
Engenharia têxtil				
	PVA/AgNPs/BPTA	Superfície lisa	Ação antibacteriana para filtragem do ar/para material de proteção hospitalares/máscara N95	Li et al., 2020
	PVA/AgNPs	Superfície lisa	Ação antibacteriana em Máscaras FFP1 e FFP2 como meios filtrantes	Blosi et al., 2021
	PCL/EO	Superfície lisa	Embalagem e proteção dos têxteis museológicos	Ferreira et al., 2022
Liberação controlada de drogas	PVA/Quitosana/Ouro/ <i>Punica granatum</i>	NFs híbridas	Entrega de drogas carregado com extratos de <i>Punica granatum</i> contra bactérias.	Hussein et al., 2021
	PEO/PEG-PCL	Core-shell	Produção de membranas de reparação tecidual guiada	Gong et al., 2018
	PLGA/PLA/PCL	NFs individuais de wafer	Liberação de drogas antitumorais	Ramachandran et al., 2017
Engenharia de tecidos	PVA/BTCA e PVA/ácido cítrico	Randomicamente	Curativos	Çay et al., 2017
	Col/CHI/P(LLA-CL)	Randomicamente	Produção de materiais para enxerto	Yin et al., 2013
	PCL	Infiltrada com hidrogel	Regeneração de cartilagem	Bas et al., 2017

Fonte: Adaptado segundo Mercante et al (2021).

Nota: BPTA- ácido 3,3',4,4'-benzofenona tetracarboxílico; PVA – Álcool polivinílico; AgNPs– nanopartículas de prata; TPU poliuretano termoplástico; ZnO– Óxido de zinco; PLA – poliláctico; CA – acetato de celulose; PEO– polióxido de etileno; PCL – policaprolactona; BTCA – ácido 1,2,3,4-butanotetracarboxílico; Col – colágeno; CHI – quitosana; P(LLA-CL) – poli (L-ácido láctico-co-ε-caprolactona); TiO₂– Dióxido de titânio; PVP – polivinilpirrolidona; PVDF – fluoreto de polivinilideno; EO-óleo essencial.

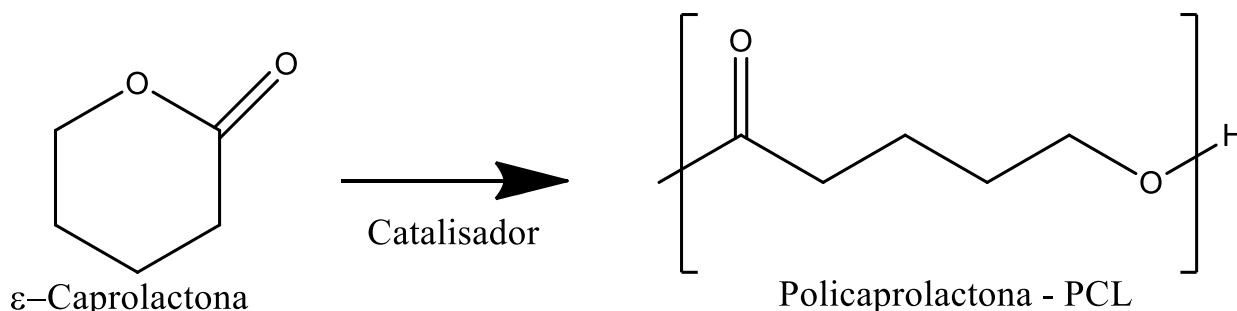
2.5.1. Poli (ϵ -caprolactona)

A poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero de poliéster hidrofóbico, cadeia linear e semicristalino, que possui amplas aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, não tóxica e de baixo custo (Zhang et al., 2021). Outras características deste polímero, é o seu ponto de fusão que é relativamente baixo, podendo variar de ($T_m = 55$ a 60°C) e temperatura de transição vítrea de ($T_g = -60^\circ\text{C}$) (Nair; Laurencin, 2007; Zhang et al., 2021). Além de ter temperatura de cristalização de 39 a 47°C , essa cristalinidade possibilita maior resistência devido às suas fortes interações intermoleculares (Aires, 2012; Zhang et al., 2021).

Conforme mencionada acima, a PCL é uma molécula hidrofóbica, porém a sua ótima processabilidade advém da sua capacidade de solubilização em diversos solventes orgânicos tais como: clorofórmio, acetona, ácido acético, diclorometano, tolueno, metanol, benzeno e tetracloreto de carbono (Santos, 2012; Zhang et al., 2021). Sendo que essa hidrofobicidade está associada à presença de grupos metilênicos não polares em um grupo éter, relativamente polar, em cada unidade onde se repete (Aires, 2012; Segundo et al., 2021; Zhang et al., 2021).

A síntetização do poli (ϵ -caprolactona) ou poli (caprolactona) pode ocorrer de duas formas sendo a primeira realizada por meio de polimerização através da abertura do anel ϵ -caprolactona a partir de catalisadores aniônicos e catiônicos, onde são liberados radicais livres para abrir o 2-metileno-1- 3-dioxepano, a segunda é através da policondensação de um amido hidrocarboxílico, conforme ilustrado na (FIGURA 8) (Aires, 2012; Segundo et al., 2021).

Figura 8 - Processo de polimerização da Policaprolactona



Fonte: Adaptado segundo Aires (2012).

No início de 1930 a PCL foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizados pelo grupo de Carothers, sendo que 46 anos depois esse mesmo polímero começou a ser explorada a sua biodegradação e tem sido até hoje um dos polímeros mais estudados na área de biomateriais biodegradáveis, mais especificamente em materiais reabsorvidos *in vivo*, ou seja, materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram ter degradação resultando da redução de tamanho (Gong et al., 2018; Zhang et al., 2021). A policaprolactona também foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em aplicações em humanos, como liberação controlada de medicamentos (Gong et al., 2018; Woodruff; Hutmacher, 2010). Além de ter sido aprovada pelo regulamento técnico do MERCOSUL/GMC/RES. nº 02/12 como polímeros ou aditivos utilizados para elaboração de embalagens plásticas em contato com alimento.

Ao longo dos anos a utilização do termoplástico PCL vem sendo explorada e aprimorada, principalmente quando se trata da incorporação de outros materiais ou substâncias para formar fibras que direcionam para diversas aplicabilidades na área biomédicas (Mochane et al., 2019; Zhang et al., 2021). Principalmente quando aprimorada utilizando a técnica de eletrofiação, e essa aprimoração possibilita um melhoramento adicional nas propriedades mecânicas finais, como fibras bem dispersas com diâmetro uniformes em toda a matriz da PCL, além de apresentar diversas melhorias nas propriedades mecânicas como: Deformação de flexão, deformação de tração, tensão de tração e resistência termomecânica (Mochane et al., 2019; Moraes et al., 2021).

Além de vários estudos reportam a facilidade da PCL em formar blendas com outros biopolímeros como gelatina (Gong et al., 2018), colágeno (Dulnik et al., 2016) quitosana e dentre outros (Moraes et al., 2021). A utilização da PCL vem sendo empregada de diversas formas, tanto na mistura com biopolímeros (Dulnik et al., 2016; Gong et al., 2018) ou polímeros sintéticos (Ramachandran et al., 2017), como incorporado a diversas substâncias como (Zanetti et al., 2019), óleos essenciais (Ferreira et al., 2022; Zanetti et al., 2019). Também vem sendo reportada o emprego da PCL na liberação de droga antitumoral (Ramachandran et al., 2017), regeneração de cartilagem (Bas et al., 2017) e ação bacteriana em embalagens plásticas para alimentos (Ferreira et al., 2022).

2.6. TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag₂WO₄)

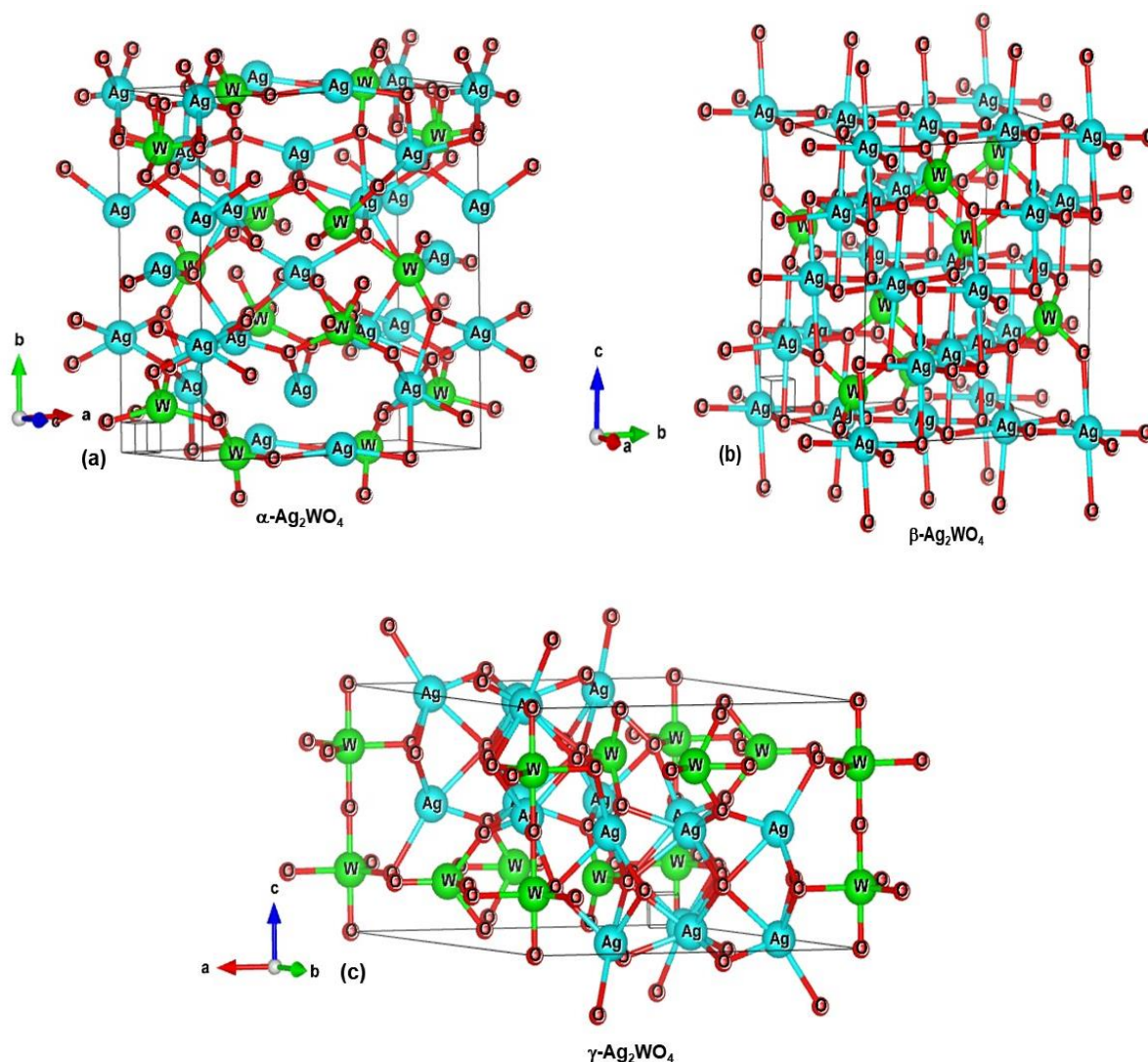
O tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) é um semicondutor inorgânico do tipo-n que apresenta ligações covalentes, iônicas e metálicas (Macedo et al., 2018). Além de ser um material polimorfo, ou seja, apresentam diferentes estruturas cristalográficas, como a fase estável alfa (α -Ag₂WO₄) e as metaestáveis: betas (β -Ag₂WO₄) e gama (γ -Ag₂WO₄) (FIGURA 9) (Lemos et al., 2016; Macedo et al., 2018; Roca et al., 2017). Sendo que esses materiais podem sofrer transição para a fase alfa, mediante efeito de pressão e temperatura.

A fase alfa possui uma estrutura do tipo ortorrômbica com grupo espacial $Pn2n$, tendo os parâmetros de rede $a = 10,820 \text{ \AA}$, $b = 12,018 \text{ \AA}$ e $c = 5,900 \text{ \AA}$, e uma interação de clusters do tipo WO₆ e AgO_y, onde, $y = 2, 4, 6$ ou 7 por cela unitária (Van Berg, Jufferman, 1982; Macedo et al., 2018). Esses clusters são blocos de construção básicos, excelentes candidatos para se estudar e explorar a natureza de ligação química, e a influência dos chamados efeitos de tamanho finito nas estruturas físicas e eletrônicas (Andrés et al., 2014; Macedo et al., 2018).

Já a fase beta, exibe estrutura hexagonal e pertence ao grupo espacial $p6_3/m$, com dois tipos de interação de cluster's, WO₄ e WO₅, onde os parâmetros de rede $a = b = 11,0925 \text{ \AA}$ e $c = 7,5424 \text{ \AA}$ (Van berg, Jufferman, 1982; Lemos et al., 2016). Por último, a fase gama (γ -Ag₂WO₄), pertencente ao grupo espacial $Fd3m$ com parâmetros de rede $a = b = 9,352 \text{ \AA}$. Essa última fase tem sido considerada a menos explorada e de difícil obtenção devido à ausência de estabilidade termodinâmica para a referida fase cristalina, quando comparada com as demais fases de tungstato de prata (Roca et al., 2017).

Dentre os três polimorfos de tungstato de prata, a fase alfa tem sido considerada a mais estável, além de apresentar versatilidade e propriedades intrínsecas e únicas, que tem sido considerada como importante material de estudo, devido ao crescimento de filamentos de prata (Ag⁰) na sua superfície de micro e nanocristais, quando exposto à irradiação com elétrons (Macedo et al., 2018). Desta forma, contribuem com as propriedades semicondutoras, eletrônicas e antimicrobianas. Na Figura 9, estão representadas a célula unitária das fases alfa (Figura 9a), beta (Figura 9b) e gama (Figura 9c) para o tungstato de prata.

Figura 9 - Estruturas cristalográficas dos três polimorfos de tungstato de prata, fase alfa (α - Ag_2WO_4) Fase beta β - Ag_2WO_4 e fase gama γ - Ag_2WO_4



Fonte: “Os autores” (2023).

Nota: fase alfa (α - Ag_2WO_4) **(a)**, Fase beta β - Ag_2WO_4 **(b)** e fase gama γ - Ag_2WO_4 **(c)** - Criado no programa New structure - VESTA

Nas últimas décadas, nota-se que o volume de publicações científicas relatando a fase alfa, principalmente quanto as propriedades bactericidas mantiveram-se crescente, o que torna esse material um candidato promissor para o desenvolvimento de novos materiais com potencial biocida (Nobre et al., 2019), antifúngicas (Pimentel et al., 2022), antiviral (Pereira et al., 2022) e antitumoral (Assis et al., 2019).

Na Tabela 3 são detalhadas as diversas atividades do tungstato de prata, fase alfa (α -Ag₂WO₄). No que tange ao desenvolvimento de materiais híbridos com o tungstato de prata, até o momento não foi reportado na literatura a incorporação deste semicondutor com soluções poliméricas, o que favoreceu o interesse no presente estudo, o qual torna-se de importância particular para o campo biomédico, contudo, havendo possibilidades de alcançar outras áreas de desenvolvimento tecnológico.

Tabela 3 - As diversas aplicabilidades de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄)

Aplicações	Atividades	Referências
Atividade bacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA)	Alvarez-Roca et al., 2021 Nobre et al., 2019 Pereira et al., 2022
	<i>Escherichia coli</i>	Nobre et al., 2019 Pereira et al., 2022
	Diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	Bastos et al., 2022
Atividade antifúngica	<i>Cândida albicans</i>	Assis et al., 2019 Foggi et al., 2017 Nobre et al., 2019 Pimentel et al., 2022 Pereira et al., 2022
Atividade antiviral	SARS-CoV-2	Pereira et al., 2022
Atividade antitumoral	Células cancerígenas (MB49)	Assis et al., 2019
	Células saudáveis (BALB/3T3)	

Fonte: "O autor" (2023).

OBJETIVOS

2.7. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é estudar a atividade antimicrobiana de membrana polimérica obtida partir da eletrofiação do PCL e funcionalizada com tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$).

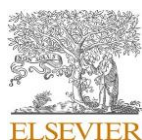
2.8. Objetivos Específicos

- ✚ Obter o tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$) pelo método hidrotérmico convencional;
- ✚ Caracterizar quimicamente o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ por Difração de Raios X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- ✚ Avaliar a atividade antibacteriana determinando a concentração inibitória mínima (CIMs) e sua ação microbicida e microbiostática sobre às células susceptíveis;
- ✚ Avaliar atividade antibiofilme *in vitro* de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro;
- ✚ Determinar a viabilidade e citotoxicidade *in vitro* de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, em células cancerígenas e células não cancerígenas;
- ✚ Investigar os mecanismos de ação de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ sobre as células bacterianas susceptíveis por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (MET/MEV);
- ✚ Preparar membrana de PCL incorporado com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ pela técnica de eletrofiação;
- ✚ Caracterizar morfologicamente as membranas modificadas pelas técnicas analíticas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS);
- ✚ Avaliar as propriedades térmicas, mecânicas e funcionalidade das fibras;
- ✚ Verificar o perfil de liberação das membranas em H₂O;
- ✚ Avaliar a ação microbicida, microbiostática e antibiofilme das microfibras;
- ✚ Investigar os mecanismos de ação sobre as células bacterianas susceptíveis por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3. CAPÍTULO 1

ARTIGO ORIGINAL –No primeiro capítulo da tese publicamos um artigo original com os resultados preliminares de padronização, que foi publicado na revista Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects; Fator de impacto: 5,2.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 647 (2022) 129132



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa



Silver tungstate microcrystals and their performance over several clinical multidrug resistant microorganisms

Ivanildes S. Bastos^{a,b}, Francisco X. Nobre^{c,*}, Elton R. da Silva^d, Patrícia P. Orlandi^e, Diene C. Lima^a, Otoniel da Cunha Mendes^f, Lizandro Manzato^g, Maria Luiza Rocco Duarte Pereira^h, Y. Leyet^{d,*}, Paulo Rogério C. Couceiroⁱ, Walter R. Britoⁱ

^a Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, Manaus, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^c Departamento de Química, Alimentos e Meio Ambiente - DQA, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Centro - CMC, Manaus, Amazonas, Brazil

^d Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^e Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brazil

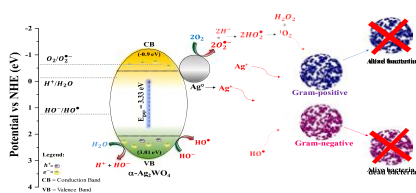
^f Universidade do Estado do Amazonas, UEA, Manaus, Amazonas, Brazil

^g Laboratório de Síntese e Caracterização de Nanomateriais - LSCN, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Distrito Industrial - CMDI, Manaus, Amazonas, Brazil

^h Instituto de Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ⁱ Departamento de Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Manaus, Amazonas, Brazil

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

α -Ag₂WO₄

Screening

Antimicrobial

Synthesis

ABSTRACT

In this paper, we report the screening antimicrobial properties against several pathogenic microorganisms of silver tungstate microcrystals synthesized by the hydrothermal method at 120 °C for 12 h. These microcrystals were structurally characterized using the X-ray diffraction (XRD) and Rietveld refinement, where the orthorhombic structure (α -Ag₂WO₄) with space group and point group of *Pn2n* and *C_{2v}¹⁰*, respectively. In according, the Raman spectrum and infrared spectrum are characteristic of pure alpha phase of silver tungstate exhibiting the main characteristic bands of orthorhombic structure. Thorough UV-vis by diffuse reflectance employing the Tauc's method the obtained optical band gap (*E_{gap}*) was 3.02(3) eV. While, the survey spectrum and high resolution Ag3d, O1s and W4f by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) are shown all binding energy peaks of characteristic elements of silver tungstate as well as, confirming the presence of Ag⁰ for silver nanoparticles. Several rod-like microcrystals were archived by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), all these,

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129132>

Received 31 March 2022; Received in revised form 28 April 2022; Accepted 28 April 2022

Available online 4 May 2022

0927-7757/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved

exhibiting high definition and grown of silver nanoparticles with the increase of exposure time by electrons gun. Finally, the screening antimicrobial properties of α - Ag_2WO_4 confirm the high antimicrobial activity for main gram-positive and gram-negative bacteria with minimum inhibitory concentration (MIC) less than positive control (TIENAM). Therefore, the α - Ag_2WO_4 microcrystals synthesized have been exhibited promissory properties in biomedical applications, particularly, in the multi-drugs gram-positive and gram-negative stains control

Introduction

Although there are several factors that contribute negatively with the help of patients infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) officially named as "coronavirus disease 2019" (COVID19), are the opportunistic diseases caused by pathogenic bacteria and fungi that have been frequently associated with the causes of death worldwide [24, 57]. In this context, multidrug-resistant microorganisms such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli* (*E. coli*) can be at high risk due to the easy dissemination and contamination in the hospital environment, causing serious health problems for patients in the postoperative stage or with complications diverse [37].

The use of antibiotics to control pathogenic bacteria in humans, although it has revolutionized the concepts of modern medicine, has been induced to several problems over the last decades [53]. Therefore, due to the expressive resistance that different classes of bacteria have represented to antibiotics, billionaire investments are currently financed in order to obtain new compounds that are effective in controlling these microorganisms [26]. It is in this context, the use of metallic nanoparticles and semiconductor oxides has been a promising alternative in the control of multi-resistant bacteria [6]. In addition, they do not exhibit relative toxicity, are low-cost, easy to obtain, and low contribution with resistance of pathogenic microorganisms [6].

Recently, several studies report the excellent antimicrobial properties of noble metallic nanoparticles (CuNPs, AgNPs, AuNPs) in the control of gram-positive and gram-negative bacteria, as well, tumor cells and fungi [16,51]. On the other hand, silver compounds such as silver molybdate - Ag_2MoO_4 [28], silver vanadate - Ag_3VO_4 [13], silver phosphate - Ag_3PO_4 [48] and silver tungstate - Ag_2WO_4 [29] are mentioned in a significant volume of publications with antimicrobial, antifungal and antitumor applications. However, the expressive number of publications reporting the possible technological and biomedical applications of silver tungstate polymorphs leads these materials for several purposes [1, 20, 22, 29, 39, 4, 43, 47].

Silver tungstate is a semiconductor that exhibits three well-known polymorphs that are generally obtained under specific experimental conditions [50]. Due to the thermodynamic instability under the effect of temperature and pressure the phases, beta (β - Ag_2WO_4) of monoclinic structure and gamma (γ - Ag_2WO_4) of cubic structure, some applications are limited [38]. Therefore, the alpha phase (α - Ag_2WO_4) with orthorhombic structure presents high stability and ease of obtaining compared to the gamma and beta phases, giving this polymorph a wide range of applications, as well as the possibility to explore different routes and conditions of synthesis [2,22,32,50].

In the study by Cavalcante et al., [10], α - Ag_2WO_4 microcrystals were efficiently obtained using the conventional hydrothermal (CH), sonochemistry (SC) and hydrothermal microwave (MH) methods using silver nitrate (AgNO_3) with dihydrated sodium tungstate - $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in aqueous medium. Using the both reagents, Foggi et al., (2017) report the synthesis of α - Ag_2WO_4 microcrystals using different solvents, where the increase in fungicidal properties when using acetone as a solvent in the synthesis was related. On the other hand, Roca et al., [39] presents the study of temperature dependence on morphology, and

photocatalytic and bactericidal properties of silver tungstate microcrystals using the MH method. Therefore, the diversity of experimental conditions employed in obtaining silver tungstate has often been correlated with the properties exhibited by these materials.

For structural level, the orthorhombic structure for silver tungstate is based on the organization of silver atoms coordinated with two $[\text{AgO}_2]$, four $[\text{AgO}_4]$, six $[\text{AgO}_6]$ and seven $[\text{AgO}_7]$ oxygen atoms, resulting in angular, tetrahedral, octahedral and deltahedral symmetry clusters, respectively. On the other hand, tungsten atoms are coordinated with oxygen atoms resulting in clusters $[\text{WO}_6]$ of octahedra symmetry [17]. The set of these clusters in the crystalline network easily allows the presence of crystalline defects, distortions of the Ag-O and W-O bonds, oxygen vacancies ($V_{\text{O}} = V_{\text{O}0}$, V_{O} and V_{O}) and structural order/disorder [2]. Therefore, providing a high performance in the formation of oxidizing species due to the polarization effect of the network, and consequently, the formation of electron/hole pairs (e^-/h^+), essential in applications such as photocatalysts, sensors, diodes, capacitors and antimicrobials [2,22,29,47,52].

Longo et al., [21] showed the experimental formation of silver nanostructures by exposing α - Ag_2WO_4 microcrystals to the electron gun of the scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscope under different exposure times. While, Andrés et al., [4], carried out the theoretical study on the effect of electron insertion in the different silver clusters in the structure in silver tungstate, resulting in the greatest reduction potential for silver atoms present in the clusters $[\text{AgO}_2]$ of angular symmetry. This phenomenon, also observed for the other polymorphs of silver tungstate and other silver compounds, makes it possible to increase bactericidal, fungicidal and anti-tumor properties due to the plasmon resonant effect that implies inactivation of the basic functions of cells leading to cell death.

Based on the information presented, in this study we report silver tungstates microcrystals synthesis with high purity using the hydrothermal method. In addition, structural characterization using X-ray diffraction (XRD) techniques, Raman and infrared vibrational spectroscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), while the band gap and morphology were investigated by UV-vis using the diffuse reflectance module (DRS) and scanning electron microscopy (SEM). Finally, bactericidal, and fungicidal performance was investigated using different pathogenic gram-positive, gram-negative bacteria and fungi stains.

Materials and method

Synthesis of α - Ag_2WO_4 microcrystals

The silver tungstate microcrystals were typically synthesized using the hydrothermal method. Initially, 2 mmol of silver nitrate - AgNO_3 , (Sigma-Aldrich, purity > 99%) and 1 mmol of sodium tungstate dihydrate - $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, purity > 99%) were solubilized with 50 mL of distilled water in Falcon tubes (50 mL of capacity), separately. Then, the solution contains the tungstic ions (WO_4^{2-}) was placed on Teflon cup reactor and under magnetic stirring, while the solution contains the silver ions was slowly added which a color change brown light precipitate was collected by centrifugation, washed several times using the distilled water and dried at 80 °C for 24 h.

Characterization

X-ray diffraction pattern of silver tungstate was collected operating a Bruker diffractometer, D2phaser model, using the copper anode as source of radiation ($\text{CuK}\alpha$ 1.54056 nm) in the interval 2θ from 10° to

80°, with step size, scan speed, current and voltage of 0.02°, 1 s⁻¹, 15 mA and 30 kV, respectively. The vibrational Raman spectrum was recorded using the Bruker confocal Raman, SENTERRA model, cooled with CCD (Charge-coupled-device) system using the green laser ($\lambda = 532$ nm) to excitation of samples. The vibrational data was collected in the range from 50 to 4000 cm⁻¹ with resolution and output.

Laser power of 4 cm⁻¹ and 0.25 mW, respectively.

The complementary vibrational analysis by infrared spectroscopy was done using the agilent spectrometer, coupled with Attenuated total reflectance (ATR) module collecting the vibrational data in the interval from 650 to 4000 cm⁻¹. Optical band gap was estimated by UV-vis with diffuse reflectance collecting the optical data in the 200–800 nm at scan speed of 10 nm s⁻¹. The morphology was determined by Field Emission Scanning Electron Microscopy operating a FEI Company microscope, Quanta FEG 250 model. 10 mg of sample was dispersed in 2 mL of ketone under sonication, then 1 mL of suspension was placed on the stub aluminum substrate and analyzed at room temperature. The X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectrum was recorded operating a Thermo Scientific spectrometer, ESCALAB 250Xi model with AlK α line ($h\nu = 1486.6$ eV) for sample excitation. Therefore, C1s signal of aliphatic C atoms at binding energy of 285.00 eV was used as energy reference. The XPS spectrum was collected using X-ray beam spot size of 650 μ m with emission angle of 0° with respect to the sample surface.

Antimicrobial activity

Antimicrobial assay

The bacterial stains used belong to the library of the Biotechnological Bioassay Platform (RPT11H), of the Leônidas and Maria Deane Institute (ILMD) - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Manaus-AM, Brazil. In order to evaluate the minimum inhibitory activity of the gram-negative bacteria stains *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606-143), *Citrobacter freundii* (ATCC 43864-576), DAEC diffuse adhesion *Escherichia coli* (BUTANT $\tilde{A}$ F1845), *Escherichia coli* enteroaggregativa EAEC (CDC EDL- O42) *Enterohemorrhagic Escherichia coli* EHEC (CDC EDL- 933-171), *Enterotoxigenic Escherichia coli* ETEC (ST8), *Enterotoxigenic Escherichia coli* ETEC (BUTANTAN LT 2871), *Enterotoxigenic Escherichia coli* EPEC (ECC23) (ATCC 1381), *Escherichia coli* non-diarrhogenic (ATCC 10536), *Hafnia alvei* (ATCC 11601-120), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352-083), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290-095), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29336), *Pseudomonas putida* (oralis) (ATCC 15175-113), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Serratia marcescens* (ATCC 14756-131), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Vibrio cholerae* (ATCC 9458) and *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610). While the Gram-positive stains tested were: *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083), *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 15313) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591) and *Staphylococcus simulans* (ATCC 27851).

Antibacterial activity by the agar diffusion method

The determination of antibacterial activity was performed using the agar diffusion method, according to Grove and Randall (1955), with modifications. For the assay, the culture medium agar Müller Hinton (AMH) (HIMEDIA) was used. The microbial cultures were then diluted in Brain Heart Infusion (BHI) broth (HIMEDIA) according to the McFarland 0.5 scale (1.5×10^8 UFC mL). As a positive control, the drugs TIENAM (imipenem cilastatin sodium) at a concentration of

500 μ g/mL and 1 mg/mL of silver tungstate microcrystals. The plates were incubated at 37 °C for 24 h, then 0.01% triphenyl tetrazolium chloride (CTT) was added to the plates and 0.1% bacteriological agar.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution in broth

The MIC values of the samples active in the agar diffusion test were determined using the 96-well microdilution plate method, according to CLSI (2012), with modifications. Each orifice received the standardized bacterial inoculum at 0.5 from MacFarland and were evaluated in concentrations ranging from 1000 to 0.48 μ g/mL; 20 μ L of 0.01% resazurin solution (Sigma-Aldrich, Brazil) (INLAB) was added, totaling a final volume of 100 μ L. As a drug control, TIENAM was tested in the same concentrations as the substances. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The plates were then incubated at 37 °C for 24 h. MIC was defined as the lowest concentration of samples capable of inhibiting bacterial growth, indicated by the persistence of the blue color of Alamar blue, without conversion to pink color, demonstrating non-cellular viability and consequent lack of conversion of the dye to resazurin.

Results and discussion

X-ray diffraction and Structural Refinement of α -Ag₂WO₄

Fig. 1 shows the X-ray diffraction pattern (XRD) of silver tungstate synthesized by hydrothermal method at 140 °C for 12 h.

The indexation of all diffraction peaks contained in the XRD pattern of as-synthesized silver tungstate confirm the obtaining pure alpha phase for silver tungstate (α -Ag₂WO₄) in well-agreement with the orthorhombic structure with space group and a point-group symmetry of *Pn2n* and *C*_{2v}¹⁰, respectively [29]. These XRD peaks exhibit similarity with the crystallographic information contained in the Inorganic Crystal Structure Database card n°. 4165 [46] for Ag₄W₈O₁₆ and literature [32]. The intensity and broad line for all XRD peaks suggest a high order/disorder at short and long range as well as crystallinity degree. The details of structural Rietveld refinement were available in [Supplementary electronic material](#).

In Fig. 2 shows the structural Rietveld refinement carried out for α -Ag₂WO₄. The similarity in the intensity, broad line and peak position for all diffraction peaks contained in the range 2 θ from 10° to 80° (Fig. 2) confirm the obtaining of pure α -Ag₂WO₄ phase without peaks of silver nanoparticles, silver oxide, sodium tungstate or other polymorph of silver tungstate [29]. Moreover, the small difference between the experimental and theoretical data displayed in the residual line as also, the χ^2 value less than 2, are indicating the consistent and good quality for Rietveld refinement analysis, checked for all refined parameters [33].

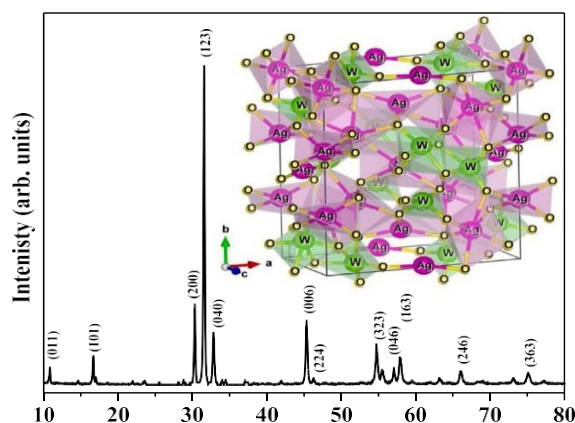
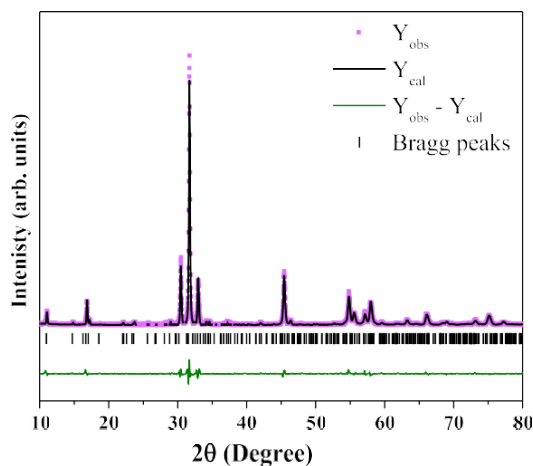


Fig. 1. XRD pattern of silver tungstate microcrystals.



The complementary Rietveld refinement results as lattice parameters, unit cell volume and crystallite size [40] for α - Ag_2WO_4 are summarized in Table 1. The lattice parameters values of as-synthesized α - Ag_2WO_4 obtained by structural Rietveld refinement are $a = 10.89(6)$ Å, $b = 12.01(7)$ Å and $c = 5.88(7)$ Å, while the unit cell volume is $770.80(27)$ Å³ [30]. Based on the summarized results in Table 1 and Table S1 (available in the electronic supplementary material), these obtained values are in well-agreement with reported values by literature, although these all are less than the values contained in the ICSD card n°. 4165. Moreover, the crystallite size by Scherer equation was $23.99(3)$ nm.

Vibrational Raman Spectroscopy

The vibrational modes of synthesized α - Ag_2WO_4 was studied by Raman and infrared spectroscopies as shown the vibrational spectrum in parts of Fig. 2(a,b). Through Raman spectrum, seventeen of twenty-one [49] active modes of alpha phase of silver tungstate were detected in the spectral range from 85 to 1100 cm^{-1} , which the main peaks is relative wide, indicating a considerable disorder at short and long range [22]. In the range between 100 and 500 are found Raman active modes associated with motion of $[\text{WO}_6]$ clusters. While in the interval from 500 to 60, is assigned to vibrations of heavy Ag^+ clusters such as $[\text{AgO}_2]$, $[\text{AgO}_4]$, $[\text{AgO}_6]$ and $[\text{AgO}_7]$ clusters [20]. The well-intensity band at 881 cm^{-1} (A_1g) is the signature of tungstate compounds (ZnWO_4 , SrWO_4 , BaWO_4 , CaWO_4), in particular, Ag_2WO_4 , is due to the symmetric stretching of O-W-O from $[\text{WO}_6]$ clusters [35]. Moreover, the bands located at 805

Tabela 1: Structural Rietveld refinement results for lattice parameters (a , b and c), unit cell volume (V) and crystallite size (D_{hkl}) obtained for α - Ag_2WO_4 in this study and reported by consulted literature (Ref).

D_{hkl} (nm)	Lattice parameters (Å)			V (Å ³)		Ref
	a	b	c	a	b	
23.99 (3)	10.89(6)	12.01(7)	5.88(7)	770.80(27)		This work
-	10.89(2)	12.03(2)	5.92(2)	775.56 (325)		ICSD card4165
-	10.88(7)	12.015(4)	5.890(3)	770.525(3)		[44]
-	10.8834 (5)	12.0377 (6)	5.9071 (6)	773.91(4)		[35]

(A2 g), 779 (A1 g), 753 (B2 g), 734, 668 (B1 g), 589 (A1 g), 516 (B2 g) and 508 cm^{-1} (B2 g) are in well-agreement with reported by Pinatti et al., [35]. Finally, modes attributed to the motion of Ag^+ ions were found at 363 (A2 g), 337 (B2 g), 307 (A2 g), 248 (B1 g), 210 (A1 g), 179, 151(A2 g), and 119 cm^{-1} (A2 g) [4,35].

The main active modes in infrared spectroscopy for alpha phase of silver tungstate are detected in the FTIR spectrum for as-prepared silver tungstate, as can be seen in Fig. 3b. Therefore, the anti-symmetric stretching of O-W-O from octahedral $[\text{WO}_6]$ clusters are wellidentified at 811 and 865 cm^{-1} both assigned to A_1u modes [43]. In addition, the bands at 787, 735, 672, 632, 584 and 564 cm^{-1} are very close with reported by Silva et al., [43] and Sreedevi et al., [47] for silver tungstates.

Optical bandgap by UV-vis using the diffuse reflectance spectroscopy (DRS)

Fig. 4 is shown the UV-vis by diffuse reflectance (DRS) spectrum of as-synthesized α - Ag_2WO_4 using the hydrothermal method at 120°C for 12 h. According to the literature the absorption of photon, excitation and recombination of electrons in orthorhombic structure for silver tungstate is naturally occurred by direct allowed transitions ($n = 0.5$) in the band structure [10]. Therefore, in the valence band (VB) there is the main contribution of hybridized O 2p and Ag 4d orbitals, while the conduction band (CB) have major contribution of W 5d ($5d^2 z$) orbitals

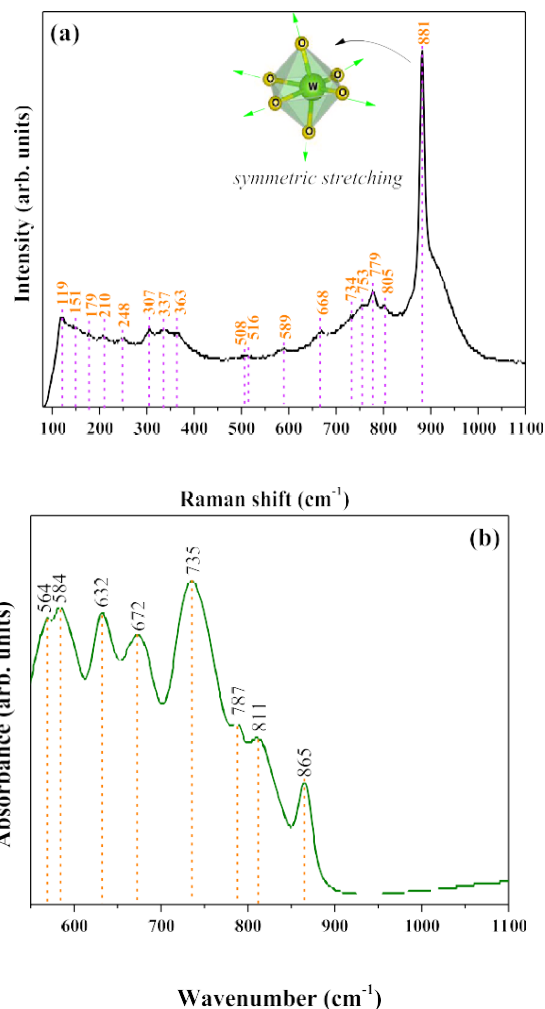


Fig. 3. (a) vibrational Raman and (b) Infrared spectroscopy of α - Ag_2WO_4 microcrystals.

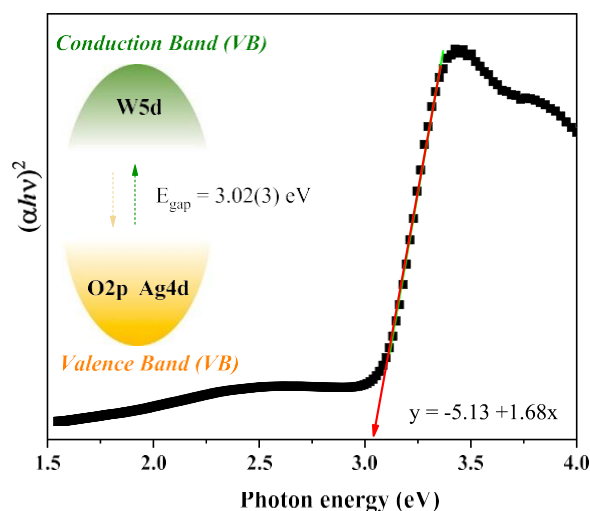


Fig. 4. Optical band gap by Tauc's plot of α -Ag₂WO₄.

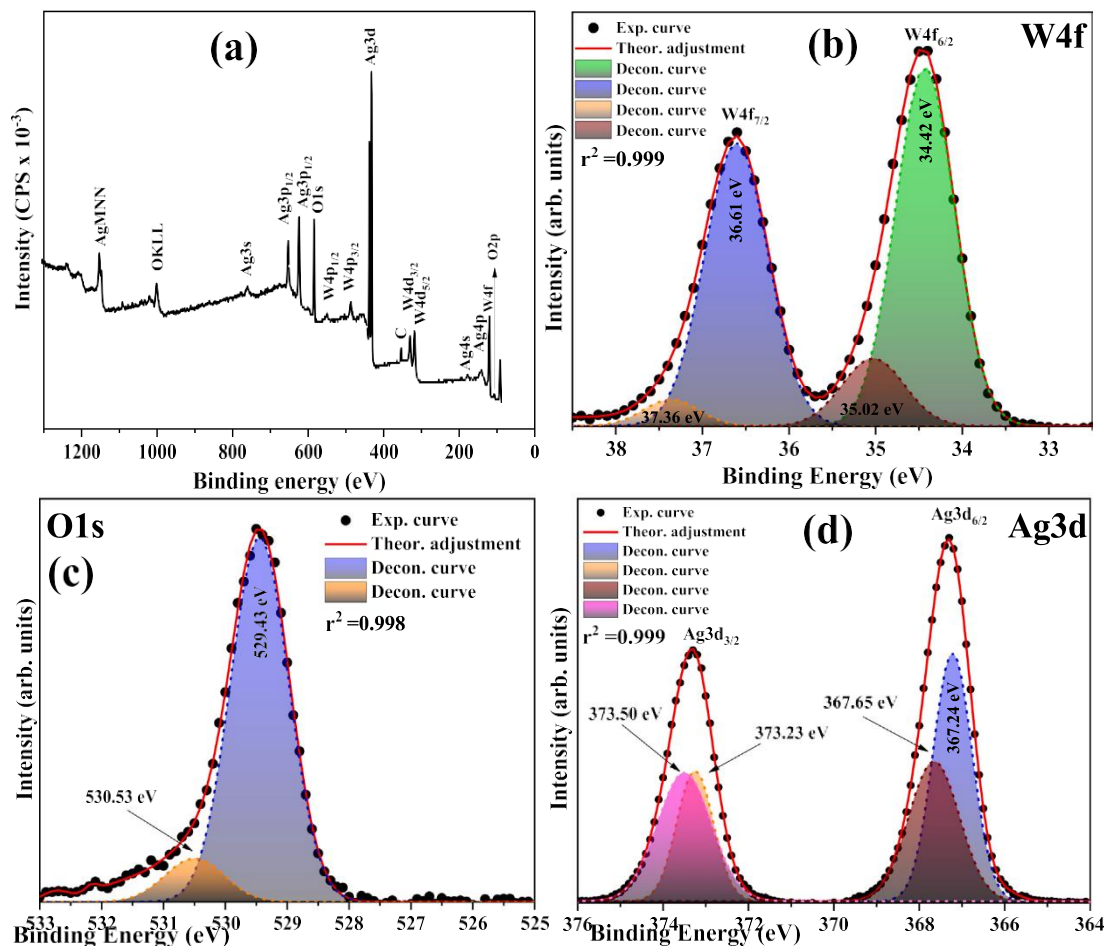
photon energy, proportionality constant and optical band gap, respectively [9]. While n is the type of natural electronic transition for electrons from valence band to conduction band, in this study, direct allowed transitions ($n = \frac{1}{2}$) has been used [29].

Plotting $(\alpha h\nu)^2$ against photon energy and fitting the strain on section by curve the optical band gap (E_{gap} 3.02(3) eV) for α -Ag₂WO₄ was determined by equation $y = -5.13 + 1.68x$. The obtained E_{gap} is characteristic of semiconductors, mainly silver tungstate's, [10,19,38] according with literature for alpha phase of silver tungstate exhibit optical band gap in the interval between 2.7 and 3.23 eV [10,12,20,29,39]. The reported optical band gap was discussed in detail in the [Supplementary electronic material](#).

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

The XPS analysis is a powerful tool for analysis of surface purity, degree of oxidation of species and semi-quantitative surface analysis [4]. Fig. 5 (a-d) shows the survey spectra and deconvolution of W4f, O1s and Ag3d binding energy peaks.

From Fig. 5 it can be seen all characteristic XPS peaks characteristic of silver tungstate assigned to electronic transitions involving the O2p, W4f, Ag4p, Ag4s, W4d, Ag3d, Wp4, O1s, Ag3p, and Ag3s orbitals in the binding energy (BE) interval from 0 to 1300 eV [4,52]. Where these all are in well accordance with the BE reported by literature [20,4,52]. In addition, the detected XPS peaks at 283.5 eV is assigned as C1s is due to the adventitious hydrocarbon derived from XPS equipment [4]. High resolution W4f, O1s and Ag3d are shown in parts of Fig.5a-c.



5. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) of α -Ag₂WO₄ microcrystals, where (a) is the survey, (b) W4f, (c) O1s and (d) Ag3d.

The deconvolution of XPS peaks for W4f (Fig. 5b) show clear evidences of different oxidant states. Four Gaussian curves were found, which BEs peak at 34.42 eV and 36.61 eV are attributed to the W^{6+} state from $[WO_6]$ octahedral clusters of Ag_2WO_4 , while at 35.02 eV and 37.36 eV confirm the amount of Ag_2WO_{4-x} with W^{5+} state in the composition [17]. The asymmetric XPS for O1s in Fig. 5c is a strong evidence of different oxygen specie on α - Ag_2WO_4 surface. Thus, two peaks are detected by deconvolution of O1s peak as can be seen in Fig. 5d, first the well-defined XPS peak at 529.43 eV is associated with Ag-O or W-O species, while at 530.53 eV can be attributed to terminal O-H species [52].

Finally, Fig. 5d is showed the deconvolution of Ag3d peak, resulting in four XPS peaks with BEs at 367.24 eV and 373.23 eV characteristic of Ag^+ species of $[AgO_x]$, $x = 2, 4, 6$ and 7, as well as, BEs at 367.65 eV and 373.50 eV of resonant effect of metallic silver nanoparticles [17]. These results confirm definitely, the presence of structural disorder as also, metallic silver nanoparticles on microcrystals surface Agreeing with lower E_{gap} found by UV-vis by diffuse reflectance and asymmetric profile peaks in Raman spectroscopy. From complementary analysis from XPS spectroscopy are summarized in Table S1 available in elec-tronic supplementary information is showed that the elementary per-centAge for tungsten, oxygen and silver is 11.60%, 57.75%, and 31.65%, respectively.

Morphological study by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)

Field emission electron microscopy (FE-SEM) imAges collected for as- prepared α - Ag_2WO_4 are shown in parts of Fig. 6a-c.

Based on these FE-SEM imAges, it can be seen several rod-like microcrystals with well-defined crystallographic planes 001, 001, 101, 101, 101, 00 $\bar{1}$, 010, 010 characteristic of silver tungstate microcrystals synthesized using the hydrothermal or microwave hydrothermal methods in aqueous medium [10,21,39]. Moreover, there was a predominantly occurrence of rod-like hexagonal microcrystals with size length in the range from 0.1 to 17 μ m.

Although all FE-SEM imAges shows the occurrence of nanoparticles on microcrystals surface, it is clearly showed in Fig. 6b several Ag^0 nanoparticles on α - Ag_2WO_4 surface that were grown at long exposure time under electrons gun. This behavior has been experimentally and theoretically reported for silver tungstate [4] and silver molybdates [3].

However, the orthorhombic unit cell of silver tungstate is more

susceptible to silver reduction due to the existence of several type of silver cluster, such as angular $[AgO_2]$, tetrahedral $[AgO_4]$, octahedral $[AgO_6]$ and deltahedral $[AgO_7]$ symmetry. In addition, the available silver nanoparticles on silver tungstate surface lead to a high photocatalytic, semiconductor, optical, antimicrobial and fungicide properties [14,22,29,39,44,52].

Screening antimicrobial properties of α - Ag_2WO_4 microcrystals Against pathogenic microorganisms

Gram-positive bacteria are well-known microorganisms due to the numerous cases of human infections over the world and its multidrug resistant characteristics. Based on above mentioned, the oxides and metallic nanoparticles are the focus of several studies about the synthesis and fungicide as well, antimicrobial properties.

In Tables 2 and 3 are summarized the screening antimicrobial performance of α - Ag_2WO_4 microcrystals Against gram-negative *Acinote- bacter baumannii* (*A. baumannii*), *Escherichia coli* (*E. Coli*), *DiarrheAgenic Escherichia coli* (*E. Coli diarrheAgenic*), *Hafia alvei* (*H. alvei*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. typhi*), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*), *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) stains and TIENAN (imipenem/cilastatin) as positive control.

Through the Agar disc-diffusion test values showed in Table 2 it can be seen a strong antimicrobial performance in the inactivation of gram-negative bacteria stain in comparison with TIENAM drug as positive control. The Enteroggregative *Escherichia coli* (EAEC) e Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) were more susceptible gram-negative microorganism than all gram-negative bacteria investigated in this study. Therefore, the zone of inhibition was 19.66 ± 0.57 mm (Table 2) and MIC de 15.62 μ g/mL and 7.81 μ g/mL (Table 3).

For other investigated gram-negative bacteria (*A. baumannii*, Diffuse Adesion *Escherichia coli* (DAEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC- LT), *DiarrheAgenic E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Yer- sinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*), are averAge halo ranging from 10.66 ± 1.00 - 18.66 ± 0.57 mm (Table 2) and MIC 250 μ g/mL to 31,25 μ g/mL as can be seen in Table 3.

Among all stains, three microorganisms have been resulted in the halos inhibitions of 18.66 ± 0.57 mm (Table 2) and MIC of 7.81 μ g/mL, 15.62 μ g/mL, 62,5 μ g/mL (Table 3), which are diffuse adhesion *Escherichia coli* (DAEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC-ST),

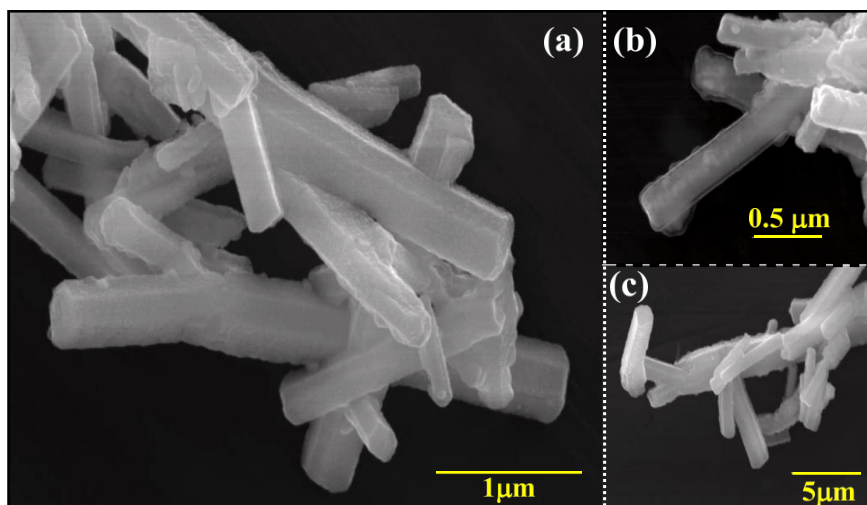


Fig. 6. Scanning electron microscopy at different magnification of α - Ag_2WO_4 microcrystals

Table 2

Antibacterial activity with the Agar well diffusion method (average halo $\pm$ standard deviation - SD) of silver tungstate microcrystals and TIENAM as positive control.

Gram stain	Bacteria	Average halo + SD (mm)	TIENAM* + SD (mm)
Gram-negative	<i>A. baumannii</i>	10.66 $\pm$ 0.57	19.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (DAEC)	18.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (ETEC-LT)	18.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (ETEC-ST)	18.66 $\pm$ 0.57	18.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EPEC)	19.66 $\pm$ 0.57	30.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EAEC)	19.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EHEC)	17.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative			
Gram-negative	Diarrheogenic <i>E. coli</i>	17.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
Gram-negative			
Gram-negative	<i>H. alvei</i>	–	30.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>K. pneumoniae</i>	12.66 $\pm$ 0.57	25.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>P. mirabilis</i>	14.66 $\pm$ 0.57	29.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>P. aeruginosa</i>	16.66 $\pm$ 0.57	29.33 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>S. typhimurium</i>	11.66 $\pm$ 0.57	34.33 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>S. typhi</i>	–	34.33 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>S. marcescens</i>	–	34.33 $\pm$ 0.57
eGram-negative	<i>Y. enterocolitica</i>	10.66 $\pm$ 0.57	25.66 $\pm$ 0.57
eGram-negative			

Positive control.

enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC LT), respectively. Already the bacteria *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), non-diarrheogenic *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* inhibited halos 17.66 $\pm$ 0.57 mm and 16.66 $\pm$ 0.57 mm (Table 2) and MIC of 62.5 μ g/mL, 62.5 μ g/mL, 62.5 μ g/mL (Table 3) respectively. Moreover, the stains *P. mirabilis* and *K. pneumoniae* exhibits halo of 12.66 $\pm$ 0.57 mm and 14.66 $\pm$ 0.57 mm (Table 2), and MIC of 250 μ g/mL and 125 μ g/mL (Table 3) respectively. Differently, the *H. alvei*, *S. typhi* and *S. marcescens* are not susceptible by antimicrobial performance of α -Ag₂WO₄ microcrystals.

The biocide properties of noble metallic-based nanoparticles and oxides have been by literature, however, not yet well-known its mechanism. In principle, the gram-negative bacteria have a complex membrane layer composed of peptidoglycan, lipopolysaccharides and phospholipid that lead to the increase in the negative surface charge of their wall. Due to the negative charge surface of bacterial wall the adhesion of metallic-base nanoparticles on surface them is strongly favorable by electrostatic interaction [42]. Since in bacteria surface, the metallic-based nanoparticles can be oxidized by enzymatic activity of bacteria to ions conducting to the disruption of bacterial membrane by coordination of metallic ions with nitrogen (N), oxygen (O) and sulfur (S) atoms, which are particularly available in different proportions in diverse biomolecules and organic compounds. In addition, inside the cell, an appreciable amount of reaction can be induced by metallic ions, mainly, the oxidative process by reactive oxygen species (ROS) [45]. Among these, superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals ($HO^{\cdot}$), hydroperoxide radicals ($HO_2^{\cdot}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2) [22,29,39, 54]. That lead to the attach of carbon chain of DNA, RNA, from organ-elles inducing to the inhibition of basic functions, like protein damage, RNA damage, enzyme disruption, interruption of electron

Table 3

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for α -Ag₂WO₄ microcrystals samples by the broth microdilution method and TIENAM as positive control.

Gram stain	Bacteria	MIC + SD (μ g/mL)	TIENAM* MIC + SD (μ g/mL)
Gram-negative	<i>A. baumannii</i>	31.25	15.62
eGram-negative	<i>E. coli</i> (DAEC)	62.5	3.90
eGram-negative	<i>E. coli</i> (ETEC-LT)	62.5	3.90
eGram-negative	<i>E. coli</i> (ETEC-ST)	125	0.48
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EPEC)	15.62	3.90
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EAEC)	7.81	3.90
eGram-negative	<i>E. coli</i> (EHEC)	62.5	0.97
Gram-negative	Diarrheogenic <i>E. coli</i>	62.5	0.97
Gram-negative			
Gram-negative	<i>H. alvei</i>	–	15.62
eGram-negative	<i>K. pneumoniae</i>	125	15.62
eGram-negative	<i>P. mirabilis</i>	250	15.62
eGram-negative	<i>P. aeruginosa</i>	62.5	15.62
eGram-negative	<i>S. typhimurium</i>	250	15.62
eGram-negative	<i>S. typhi</i>	–	15.62
eGram-negative	<i>S. marcescens</i>	–	15.62
eGram-negative	<i>Y. enterocolitica</i>	250	15.6
eGram-negative			

transport essential for cell viability and

MIC = minimum inhibitory concentration, * = positive control.

consequently, apoptosis [36].

Gram-negative diarrheogenic *E. Coli* (DEC) stains are generally divided based on specific factors such as virulence and phenotypic traits, which include enteropathogenic *E. Coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC), Vero toxin-producing/Shiga toxin-producing *E. Coli* (VTEC/STEC), as well as, the subgroup enterohaemorrhagic *E. Coli* (EHEC), enteroinvasive *E. Coli* (EIEC), enteroAggregative *E. Coli* (EAEC) and diffusely adherent *E. Coli* (DAEC) [7]. Although different MIC values are obtained for α -Ag₂WO₄ microcrystals Against gram-negative *E. Coli* bacteria stains, is suggested, supported by literature [25,31,54], that these results are predominantly associated with specific characteristics of each bacteria, which the adherence, surface change, genetic bases, presence of flagella or similar structures, composition of bacterial wall and type of produced enzyme are the main factors. The similarity between *E. Coli* and *K. pneumoniae* regarding the presence polysaccharides (PS) and of lipopolysaccharides (LPS) in the capsule synthesis, consequently, bacterial wall, has been mentioned by Wu and Li, [56] where the gene for both bacteria can be classified into three main groups: (i) for sugar nucleotide synthesis; (ii) capsule repeat-unit synthesis; and (iii) for capsular repeat-unit assembly and export. All these characteristics mentioned above are very similar with *A. baumannii* bacteria which exhibit the antigenic O-polysaccharide in the LPS. Together, pili structures, lead to adhesion to host cell, in this way, promote the well-interaction on α -Ag₂WO₄ microcrystals surface.[27] Surface change ability and biofilm types of *P. mirabilis* has been reported by Kwiecinska-Piróg et al., [18] are the main characteristics that can be correlate with the less susceptible effect (average halo = 14.66 $\pm$ 0.57 mm and MIC 250 μ g/mL) Against antimicrobial activity by α -Ag₂WO₄ microcrystals. Notably, it was expected that the *Y. enterocolitica* has any similarity with above discussed bacteria, in accordance with literature [5,34], the external cell membrane of *Y. enterocolitica* is composed by complex structures with proteins and phospholipids, such specific polysaccharide is definitely similar

with proteins and phospholipids also available in others susceptible bacteria reported in the paragraphs above.

Regarding the *Salmonella* genus, the α -Ag₂WO₄ microcrystals demonstrate an expressive antimicrobial activity Against *S. typhimurium* with halo of 11.66 ± 0.57 mm and MIC of 250 μ g/mL as can be checked in Table 2. On the other hand, the absence of antimicrobial activity for silver tungstate microcrystals was reached for *S. typhi* for all concentrations tested in the interval from 1 g/mL to 7.81 μ g/mL on in this study. The genetic diversity of *S. typhimurium* and *S. typhi* is briefly reported by Sabbagh et al., [41], based on them, it is can be appointed genetically similar of *S. typhimurium* and *E. coli* as well as, the presence of fimbriae or pili structures can mediate an effective interaction between microorganism and microcrystals.

For many years was believed that the alginate is the main constituent of *P. aeruginosa* biofilm, however, recently was confirmed the presence of two distinct carbohydrate in the extracellular polysaccharides [8]. Where, glucose-rich polymer is produced by *pelA*-G gene and mannose rich-polymer is from *pslA*-O gene. The variety of *P. aeruginosa* lead to the complex composition of these carbohydrates in biofilm formation, consequently, major resistance to oxidative process by silver tungstate microcrystals.

Differently, the gram-positive bacteria have particularities when compared with gram-negative bacteria, among these, the cytoplasmic membrane is surrounded by bacteria wall, also is thicker, mainly formed by numerous peptidoglycan (PGN) layers with 40–80 nm [23]. The occurrence of teichoic acid in the bacterial wall, predominantly in gram-positive bacteria, allow the interaction between the wall and plasm membrane. In Tables 3 and 4, are shown the gram stain, bacteria, MIC of silver tungstate and MIC of TIENAM as positive control results. Regarding these results, in comparison with reported averAge halo of inhibitions and MIC values in Tables 3 and 4, it is clearly showed that the gram-positive bacteria are less susceptible than gram-negative bacteria Against TIENAM. However, those are more susceptible to α -Ag₂WO₄ microcrystals as biocide material, where the averAge halos inhibition for *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* CT), *Listeria in'ocula* (*L. in'ocula*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), and *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) were 11.66 ± 0.57 mm, 12.66 ± 0.57 mm, 10.66 ± 0.57 mm, 10.66 ± 0.57 mm, and 15.66 ± 0.57 mm, respectively. In addition, MIC value of 250 μ g/ mL for *B. subtilis*, *L. in'ocula*, *L. monocytogenes* *S. mutans* and 15.62μ g/mL MRSA as summarized in Table 5. Although the *Streptococcus parasanguinis* (*S. parasanguinis*) and *Staphylococcus sumulans* (*S. sumulans*) exhibited high resistance to silver tungstate.

Often several studies are focused in specific components pertain the

Table 4: Antibacterial activity with the Agar well diffusion method (averAge halo $\pm$ standard deviation - SD) of silver tungstate microcrystals and TIENAM as positive control.

Gram stain	Bacteria	AverAge halo + SD (mm)	TIENAM* + SD (mm)
Gram-positive	<i>B. subtilis</i> CT	11.66 $\pm$ 0.57	40.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	<i>L. in'ocula</i>	12.66 $\pm$ 0.57	25.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	<i>L. monocytogenes</i>	10.66 $\pm$ 0.57	25.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	<i>S. mutans</i>	10.66 $\pm$ 0.57	39.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	<i>S. parasanguinis</i>	-	39.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	<i>S. simulans</i>	-	41.66 $\pm$ 0.57
Gram-positive	MRSA	15 $\pm$ 0.57	40.66 $\pm$ 0.57

Legend: positive control.

Table 5: Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for α -Ag₂WO₄ microcrystals samples by the broth microdilution method and TIENAM as positive control.

Gram stain	Bacteria	MIC + SD ($\square$ g/mL)	TIENAM* MIC + SD ($\square$ g/mL)
Gram-positive	<i>B. subtilis</i> CT	250	15.62
Gram-positive	<i>L. in'ocula</i>	250	31.25
Gram-positive	<i>L. monocytogenes</i>	250	31.25
Gram-positive	<i>S. mutans</i>	250	15.62
Gram-positive	<i>S. parasanguinis</i>	-	15.62
Gram-positive	<i>S. simulans</i>	-	15.62
Gram-positive	MRSA	15.62	3.90

bacterial biofilm such as polysaccharide and exopolysaccharides correlating its properties towards the protection, adhesion and surface modification. For instance, the staphylococcal polysaccharide intercellular adhesion (PIA) as also, poly-N-acetyl glucosamine (PNAG) most produced by gram-negative bacteria, but recently reported for staphylococcus genus, might easily lead to the oxidation of silver nanoparticles by surface interaction each other. Thought those biofilm components, but perhaps not limited to only these, is suggested, based on close MIC results of α -Ag₂WO₄ microcrystals Against gram-negative bacteria with MRSA stain that the similarity of polysaccharide and exopolysaccharides of those bacteria as main factor associated with the obtained results.

Although, until now, there is not found any relate about the antimicrobial properties of inorganic or metallic compounds Against *S. parasanguinis*, the absence of antimicrobial activity by silver tungstate Against them is probably due to the occurrence of similar characteristic with *P. aeruginosa*. Once both bacteria have fibronectin/fibrinogen binding gene, as also, collAgen-binding surface protein-encoding gene, we believe that these genes provide specific surface characteristic that difficult the ROS process [11].

Hsueh et al., [15] report the antimicrobial properties of silver nanoparticles Against *B. subtilis* stain, where a good performance was reached for 25 mg/L of AgNPs, correlating the antimicrobial properties with AgNPs adherence, as well, formation of Ag⁺ ions. On the other hand, tungsten trioxide (WO₃ x) nanodots show an expressive antimicrobial activity Against *E. coli* and *E. aureus* at dark and photo-irradiated at different times, showing that the oxidative species from ROS process lead to the increase in the antimicrobial activity [8]. While, the structural disorder and oxidant species by ROS process are mainly reported by Longo et al., [22] for silver tungstate microcrystals Against MRSA.

Conclusion

In summary, silver tungstate rod-like microcrystals were successfully obtained by hydrothermal method at 120 °C for 12 h. These microcrystals have been exhibited high crystallinity degree and high order/ disorder at short and long range confirmed by XRD and Raman spectroscopy. Moreover, the elementary composition by XPS analysis confirm the presence of two oxidation valence for silver, suggesting the occurrence of metallic silver nanoparticles (Ag⁰) onto microcrystals surface and Ag⁺ ions coordinated to two, four, six and seven oxygen atoms. The small optical band gap (3.02 eV) obtained confirm the semiconductor material in accordance for silver tungstate, where was correlated with oxygen vacancies as also, distortion of [AgOx] clusters. The rod-like morphology is clearly showed by FE-SEM images with homogeneous occurrence for these microcrystals. The screening antimicrobial performance for as-synthesized silver tungstate microcrystal

Against several gram-positive and gram-negative bacteria shows high antimicrobial potential, which the MIC value for *L. monocytogenes* (gram-positive) and *K. pneumonia* (gram-negative) using the silver tungstate rod-like microcrystals were 10.66 ± 0.57 and 10.66 ± 0.57 ($\mu\text{g/mL}$), respectively. While the positive control (TIENAM) was 25.66 ± 0.57 for both stains. Therefore, confirming the promissory antimicrobial properties of these silver tungstate microcrystals Against several pathogenic bacteria stains.

CRediT authorship contribution statement

Ivanildes S. Basto: Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing – original draft. **Francisco X. Nobre:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Elton R. da Silva:** Methodology. **Patrícia P. Orlandi:** Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Diene C. Lima:** Methodology. **Otoniel da Cunha Mendes:** Formal analysis. **Lizandro Manzato:** Validation, Resources. **Maria Luiza Rocco Duarte Pereira:** Validation, Investigation, Writing – review & editing. **Y. Leyet:** Software, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Paulo Rogério C. Couceiro:** Software, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Walter R. Brito:** Software, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES and CNPq for financial support. As also, the Laboratório de Síntese e Caracterização de Nano- materiais (LSCN), Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia (SisNANO) Processo CNPq 442601/2019-0, Central Analítica do IFAM, Campus Manaus Centro, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. This article is the result of the RD&I Lively IoT Catheter project, carried out by the University of the State of Amazonas (UEA), in partnership with Samsung Eletrônica da Amazônia Ltda., using resources from Federal Law nº 8.387/1991, being its dissemination and publicity in accordance with the provisions of article 39 of Decree No. 10.521/2020.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.colsurfa.2022.129132](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129132).

References

- [1] R. Alvarez Roca, P.S. Lemos, J. Andrés, E. Longo, Formation of Ag nanoparticles on metastable $\beta\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ microcrystals induced by electron irradiation, *Chem. Phys. Lett.* 644 (2016) 68–72, <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.11.048>.
- [2] N.F. Andrade Neto, A.B. Lima, M.R.D. Bomio, F.V. Motta, Microwave-assisted hydrothermal synthesis of $\text{Ag}_2\text{MoO}_4 \cdot x\text{W}_2\text{O}_4$ ($x = 0, 0.25, 0.50, 0.75$ and $1 \text{ mol\%}$) heterostructures for enhanced photocatalytic degradation of organic dyes, *J. Alloys Compd.* 844 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.156077>.
- [3] J. Andrés, M.M. Ferrer, L. Gracia, A. Beltran, V.M. Longo, G.H. Cruvinel, R. Tranquilin, E. Longo, A combined experimental and theoretical study on the formation of Ag filaments on $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ induced by electron irradiation, *Part. Part. Syst. Charact.* 32 (2015) 646–651, <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400162>.
- [4] J. Andrés, L. Gracia, P. Gonzalez-Navarrete, V.M. Longo, W. Avansi, D.P. Volanti, M.M. Ferrer, P.S. Lemos, F.A. La Porta, A.C. Hernandez, E. Longo, Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ induced by electron irradiation, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–7, <https://doi.org/10.1038/srep05391>.
- [5] Bancarz-kisiel, A., 2018. The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes9050235>.
- [6] C. Bankier, R.K. Matharu, Y.K. Cheong, G.G. Ren, E. Cloutman-Green, L. Ciric, Synergistic antibacterial effects of metallic nanoparticle combinations, *Sci. Rep.* 9(2019) 3–10, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52473-2>.
- [7] S. Bouzari, A. Jafari, M.M. Aslani, *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran, *Iran. J. Microbiol.* 4 (2012) 102–117.
- [8] S.S. Branda, A. Vik, L. Friedman, R. Kolter, Biofilms: the matrix revisited, *Trends Microbiol.* 13 (2005) 20–26, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>.
- [9] W.E.O. Campos, A.S.C. Lopes, W.R. Monteiro, G.N.R. Filho, F.X. Nobre, P.T.S. Luz, L.A.S. Nascimento, C.E.F. Costa, W.F. Monteiro, M.O. Vieira, J.R. Zambian, Layered double hydroxides as heterostructure LDH/ Bi_2WO_6 oriented toward visible-light-driven applications: synthesis, characterization, and its photocatalytic properties, *React. Kinet. Mech. Catal.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s11144-020-01830-8>.
- [10] L.S. Cavalcante, M.A.P. Almeida, W.J. Avansi, R.L. Tranquilin, E. Longo, N. Batista, V.R. Mastelaro, M.S. Li, Cluster coordination and photoluminescence properties of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ microcrystals, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 10675–10687, <https://doi.org/10.1021/ic300948n>.
- [11] K.G. Chan, K.T. Ng, Y.K. Pang, T.M. Chong, A. Kamarulzaman, W.F. Yin, K.K. Tee, Genome anatomy of *Streptococcus parasanguis* strain C1A, isolated from a patient with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, reveals unusual genomic features, *Genome Announc.* 3 (2015) 14–15, <https://doi.org/10.1128/genomeA.00541-15>.
- [12] C.C. de Foggia, R.C. de Oliveira, M.T. Fabbro, C.E. Vergani, J. Andres, E. Longo, A. Machado, Tuning the morphological, optical, and antimicrobial properties of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ microcrystals using different solvents, *Cryst. Growth Des.* 17 (2017) 6239–6246, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00786>.
- [13] R.C. De Oliveira, C.C. De Foggia, M.M. Teixeira, M.D.P. Da Silva, M. Assis, E. M. Francisco, B.N.A.D.S. Pimentel, P.F.D.S. Pereira, C.E. Vergani, A.L. Machado, J. Andres, L. Gracia, E. Longo, Mechanism of antibacterial activity via morphology change of $\alpha\text{-AgVO}_3$: theoretical and experimental insights, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 11472–11481, <https://doi.org/10.1021/acsami.7b00920>.
- [14] Y.V.B.B. de Santana, J.E.C. Gomes, L. Matos, G.H. Cruvinel, A. Perrin, C. Perrin, J. Andrés, J.A. Varela, E. Longo, Silver molybdate and silver tungstate nanocomposites with enhanced photoluminescence, *Nanomater. Nanotechnol.* 4(2014) 22, <https://doi.org/10.5772/58923>.
- [15] Y.H. Hsueh, K.S. Lin, W.J. Ke, C. Hsieh, Te, C.L. Chiang, D.Y. Tzou, S.T. Liu, The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag^+ ions, *PLoS One* 10 (2015) 1–17, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144306>.
- [16] L. Huo, P. Li, Noble Metal Nanoparticles and Their Antimicrobial Properties, in: *Metal Nanoparticles*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2017, pp. 191–201, <https://doi.org/10.1002/9783527807093.ch8>.
- [17] N. Jacomaci, E. Silva, F.M.B. De Oliveira, E. Longo, M.A. Zaghete, Dielectric behavior of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and its huge dielectric loss tangent, *Mater. Res.* 22 (2019) 2–11, <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2019-0058>.
- [18] J. Kwiecinska-Piróg, T. Bogiel, K. Skowron, E. Wieckowska, E. Gospodarek, *Proteus mirabilis* biofilm – qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation, *Brazilian J. Microbiol.* 45 (2014) 1415–1421, <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400037>.
- [19] P.S. Lemos, A. Altomare, A.F. Gouveia, I.C. Nogueira, L. Gracia, R. Ilusar, J. Andrés, E. Longo, L.S. Cavalcante, Synthesis and characterization of metastable $\beta\text{-Ag}_2\text{WO}_4$: an experimental and theoretical approach, *Dalt. Trans.* 45 (2016) 1185–1191, <https://doi.org/10.1039/c5dt03754a>.
- [20] Z. Lin, J. Li, Z. Zheng, J. Yan, P. Liu, C. Wang, G. Yang, Electronic reconstruction of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nanorods for visible-light photocatalysis, *ACS Nano* 9 (2015) 7256–7265, <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b02077>.
- [21] E. Longo, D.P. Volanti, V.M. Longo, L. Gracia, I.C. Nogueira, M.A.P. Almeida, N. Pinheiro, M.M. Ferrer, L.S. Cavalcante, J. Andrés, Toward an understanding of the growth of Ag filaments on $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and their photoluminescent properties: a combined experimental and theoretical

- study, *J. Phys. Chem. C* 118 (2013) 1229-1239, <https://doi.org/10.1021/jp408167v>.
- [22] Longo, M., Foggi, C.C. De, Ferrer, M.M., Gouveia, A.F., Andre, R.S., Avansi, W., Vergani, C.E., Machado, A.L., Andre, J., Hernandez, A.C., Longo, E., Box, P.O., 2014. Potentiated Electron Transference in α -Ag₂WO₄ Microcrystals with Ag Nano filaments as Microbial Agent Vale r 5769-5778. <https://doi.org/10.1021/jp410564p>.
- [23] N. Malanovic, K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr* 1858 (2016) 936-946, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2015.11.004>.
- [24] R.R. Martins-Chaves, C.C. Gomes, R.S. Gomez, Immunocompromised patients and coronavirus disease 2019: a review and recommendations for dental health care, *Braz. Oral Res.* 34 (2020) 1-7, <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0048>.
- [25] D.N. Medearis, B.M. Camitta, E.C. Heath, Cell wall composition and virulence in *Escherichia coli*, *J. Exp. Med.* 128 (1968) 399-414, <https://doi.org/10.1084/jem.128.3.399>.
- [26] C.M. Morel, O. Lindahl, S. Harbarth, M.E.A. de Kraker, S. Edwards, A. Hollis, Industry incentives and antibiotic resistance: an introduction to the antibiotic susceptibility bonus, *J. Antibiot.* (2020), <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0300-y>.
- [27] C.A. Moubareck, D.H. Halat, Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen, *Antibiotics* 9 (2020), <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>.
- [28] J.V.B. Moura, T.S. Freitas, R.P. Cruz, R.L.S. Pereira, A.R.P. Silva, A.T.L. Santos, J. H. Silva, C. Luz-Lima, P.T.C. Freire, H.D.M. Coutinho, J.H. da Silva, C. Luz-Lima, P. T.C. Freire, H.D.M. Coutinho, α -Ag₂MoO₄ microcrystals: characterization, antibacterial properties and modulation analysis of antibiotic activity, *Biomed. Pharmacother.* 86 (2017) 242-247, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.016>.
- [29] F.X. Nobre, I.S. Bastos, R.O. dos Santos Fontenelle, E.A.A. Júnior, M.L. Takeno, L. Manzano, J.M.E. de Matos, P.P. Orlandi, J. de Fátima Souza Mendes, W.R. Brito, P.R. da Costa Couceiro, P.P.O. Nogueira, J. de Fátima Souza Mendes, W.R. Brito, P. R. da Costa Couceiro, Antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ rod-like microcrystals synthesized by sonochemistry and sonochemistry followed by hydrothermal conventional method, *Ultrason. Sonochem.* 58 (2019), 104620, <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2019.104620>.
- [30] A.L. Patterson, The scherrer formula for X-ray particle size determination, *Phys. Rev.* 56 (1939) 978-982, <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>.
- [31] S.L. Percival, D.W. Williams, *Escherichia coli*, Second Ed. ed, Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks, Second ed., Elsevier, 2013, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>.
- [32] P.F.S. Pereira, C.C. Santos, A.F. Gouveia, M.M. Ferrer, I.M. Pigatti, G. Botelho, J. R. Sambrano, I.L.V. Rosa, J. Andrés, E. Longo, α -Ag_{2-2x}Zn_xWO₄ (0 ≤ x ≤ 0.25) solid solutions: structure, morphology, and optical properties, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 7360-7372, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00201>.
- [33] W.D.S. Pereira, M.M. Ferrer, G. Botelho, L. Gracia, I.C. Nogueira, I.M. Pinatti, I.L. V. Rosa, F.D.A. La Porta, J. Andrés, E. Longo, Effects of chemical substitution on the structural and optical properties of α -Ag_{2-2x}Ni_xWO₄ (0 ≤ x ≤ 0.08) solid solutions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 21966-21975, <https://doi.org/10.1039/c6cp00575f>.
- [34] PhAges, Y., Safety, F., 2019. Yersinia PhAges and Food Safety 1-20. <https://doi.org/10.3390/v112112105>.
- [35] I.M. Pinatti, I.C. Nogueira, W.S. Pereira, P.F.S. Pereira, R.F. Gonçalves, J.A. Varela, E. Longo, I.L.V. Rosa, Structural and photoluminescence properties of Eu(3+) doped α -Ag₂WO₄ synthesized by the green coprecipitation methodology, *Dalt. Trans.* 44 (2015) 17673-17685, <https://doi.org/10.1039/c5dt01997d>.
- [36] M. Rai, R. Shegokar, Metal nanoparticles in pharma, *Met. Nanoparticles Pharma* (2017) 1-493, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63790-7>.
- [37] T.M. Rawson, L.S.P. Moore, N. Zhu, N. Ranganathan, K. Skolimowska, M. Gilchrist, G. Satta, G. Cooke, A. Holmes, Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing, *Clin. Infect. Dis* (2020), <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>.
- [38] R.A. Roca, P.S. Lemos, L. Gracia, J. Andrés, E. Longo, Uncovering the metastable γ -Ag₂WO₄ phase: a joint experimental and theoretical study, *RSC Adv.* 7 (2017) 5610-5620, <https://doi.org/10.1039/c6ra24692c>.
- [39] R.A. Roca, J.C. Sczancoski, I.C. Nogueira, M.T. Fabbro, H.C. Alves, L. Gracia, L.P.S. Santos, C.P. de Sousa, J. Andrés, G.E.L. Jr, E. Longob, L.S. Cavalcante*, L.P. Serejo Santos, de Sousa, Paiva Cristina, G.E. da L. Junior, J. Andres, E. Longo, L. S. Cavalcante, Facet-dependent photocatalytic and antibacterial properties in α -Ag₂WO₄ crystals: combining experimental data and theoretical insights, *Catal. Sci. Technol.* 5 (2015) 4091-4107, <https://doi.org/10.1039/C5CY00331H>.
- [40] J. Rodríguez-Carvajal, L.L.B. Cea-cnrs, C.E.A. Saclay, Y. Cedex, *Magnetic structures from powder and single crystal data*, *Inst. Laue-Langevin* (2014) 1-7.
- [41] S.C. Sabbagh, C.G. Forest, C. LepAge, J.-M.M. Leclerc, F. Daigle, So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi, *FEMS Microbiol. Lett.* 305 (2010) 1-13, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>.
- [42] E. Sánchez-López, D. Gomes, G. Esteruelas, L. Bonilla, A.L. Lopez-Machado, R. Galindo, A. Cano, M. Espina, M. Ettcheto, A. Camins, A.M. Silva, A. Durazzo, A. Santini, M.L. Garcia, E.B. Souto, Metal-based nanoparticles as antimicrobial Agents: an overview, *Nanomaterials* 10 (2020) 1-39, <https://doi.org/10.3390/nano10020292>.
- [43] F.C.M. Silva, L.K.R. Silva, A.G.D. Santos, V.P.S. Caldeira, J.F. Cruz-Filho, L. S. Cavalcante, E. Longo, G.E. Luz, Structural refinement, morphological features, optical properties, and adsorption capacity of α -Ag₂WO₄ nanocrystals/SBA-15 mesoporous on rhodamine B dye, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 30 (2020) 3626-3645, <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01560-3>.
- [44] M.D.P. Silva, R.F. Gonçalves, I.C. Nogueira, V.M. Longo, L. Mondoni, M.G. Moron, Y.V. Santana, E. Longo, Microwave-assisted hydrothermal synthesis of Ag₂(W_{1-x}Mo_x)O₄ heterostructures: nucleation of Ag, morphology, and photoluminescence properties, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 153 (2016) 428-435, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.08.047>.
- [45] A. Singh, P.K. Gautam, A. Verma, V. Singh, P.M. Shivapriya, S. Shivalkar, A. K. Sahoo, S.K. Samanta, Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: a review, *Biotechnol. Rep.* 25 (2020), e00427, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00427>.
- [46] Skarstad, P.M., Geller, S., 1975. (W4016)8- POLYION IN THE HIGH TEMPERATURE MODIFICATION OF SILVER TUNGSTATE* I, 791-799. [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(75\)90193-2](https://doi.org/10.1016/0025-5408(75)90193-2).
- [47] A. Sreedevi, K.P.P. Priyanka, K.K.K. Babitha, N. Aloysius Sabu, T.S.S. Anu, T. Varghese, Chemical synthesis, structural characterization and optical properties of nanophase α -Ag₂WO₄, *Indian J. Phys.* 89 (2015) 889-897, <https://doi.org/10.1007/s12648-015-0664-1>.
- [48] S. Thiagarajan, S. Singh, D. Bahadur, Reusable sunlight activated photocatalyst Ag₃PO₄ and its significant antibacterial activity, *Mater. Chem. Phys.* 173 (2016) 385-394, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.02.027>.
- [49] A. Turkovic, D.L. Fox, J.F. Scott, S. Geller, G.F. Ruse, High temperature Raman spectroscopy of silver tungstate, Ag₂WO₄, *Mater. Res. Bull.* 12 (1977) 189-195, [https://doi.org/10.1016/0025-5408\(77\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0025-5408(77)90163-5).
- [50] A.J. van den Berg, C.A.H. Juffermans, The polymorphism of silver tungstate Ag₂WO₄, *J. Appl. Crystallogr.* 15 (1982) 114-116, <https://doi.org/10.1107/S0021889882011510>.
- [51] M. Vukomanovic, Advanced nanocomposites with noble metal antimicrobial nanoparticles: how to design a balance among antimicrobial activity, bioactivity, and safe delivery to the place of infection, *Nanostruct. Antimicrob. Ther. Nanostruct. Ther. Med. Ser* (2017) 623-651, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00028-7>.
- [52] B.-Y.Y. Wang, G.-Y.Y. Zhang, G.-W.W. Cui, Y.-Y.Y. Xu, Y. Liu, C.-Y.Y. Xing, Controllable fabrication of α -Ag₂WO₄ nanorod-clusters with superior simulated sunlight photocatalytic performance, *Inorg. Chem. Front.* 6 (2019) 209-219, <https://doi.org/10.1039/C8QI01025K>.
- [53] W. Wang, M.I. Arshad, M. Khurshid, M.H. Rasool, M.A. Nisar, M.A. Aslam, M.U. Qamar, Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis, *Infect. Drug Resist.* (2018) 1645-1658.
- [54] K.J. Woo, C.K. Hye, W.K. Ki, S. Shin, H.K. So, H.P. Yong, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2171-2178, <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>.
- [55] D.L. Wood, J. Tauc, Weak absorption tails in amorphous semiconductors, *Phys. Rev. B* 5 (1972) 3144-3151.
- [56] M. Wu, X. Li, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular Medical Microbiology*, Second ed., Elsevier Ltd, 2014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00087-1>.
- [57] P. Zhou, Z. Liu, Y. Chen, Y. Xiao, X. Huang, X.G. Fan, Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: a matter of concern, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* (2020) 2019-2020, <https://doi.org/10.1017/ice.2020.156>.

4. CAPÍTULO 2

Manuscripto que será submetido a Antimicrobial Agents and Chemotherapy, fator de impacto de 5.938, quali A1 em ciências biológicas, Biotecnologia e medicina.

Estudo de Tungstato de Prata como Alternativa Promissora para Combater as Infecções por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Abordagem Antimicrobiana, Antibiofilme e Citotóxica.

Ivanildes Santos BASTOS^{1,2,3}, Francisco Xavier Nobre⁴, Ana Carolina Moura Xavier^{1,3}, Caroline Sousa Martins de Almeida^{1,3}, Jéssica Araújo Marques⁵, Jander Matos Guimarães⁵, Elizangela Farias da Silva^{1,3}, Yonny Romaguera Barcelay^{6,7}, Ana Liz Beth Toletto Rojas¹, Taisa Lorene Sampaio⁵, Walter Ricardo Brito⁵, Patrícia Puccinelli Orlandi^{8*}.

¹ Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, CEP 69057-070, Manaus, Amazonas, Brasil;

² Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

³Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brasil;

⁴Departamento de Química, Alimentos e Meio Ambiente - DQA, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Centro – CMC, Manaus, Amazonas, Brasil;

⁵Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Amazonas, Brasil

⁶Departamento de química, instituto de ciências exatas, universidade federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil;

⁷Faculdade de Ciências e Tecnologia-Faculdade de Coimbra, Portugal;

⁸ Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz PE, Fiocruz Recife, Pernambuco, Brasil.

* autora correspondente: Patrícia Puccinelli Orlandi

E-mail: patricia.orlandi@fiocruz.br

RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* (MRSA), que são consideradas bactérias difíceis de erradicar, principalmente pela capacidade de formar biofilme. O tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$) se apresenta como alternativa no combate à resistência e proliferação de microrganismos patogênicos, devido exibirem características que os direcionam às novas possibilidades de aplicações. O $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi sintetizado pelo método hidrotérmico a 140 °C, a confirmação da fase alfa de tungstato de prata foi confirmada por difração de raios X (DRX) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier (FTIR). As propriedades antimicrobianas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram confirmadas pelo método de difusão em ágar, concentração inibitória mínima, atividade antibiofilme, ação microbicida e microbiostática e as alterações celulares foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As melhores inibições foram observadas nos patótipos de *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *P. aeruginosa* (INCQS 0386) e *S. aureus* com médias de halos de inibição de $22 \pm 0,55$ e MIC de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. As melhores atividades microbicidas foram com a EIEC, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC ST8) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) reduzindo a zero a log (UFC/mL) na concentração sub-letal de 1000 $\mu\text{g/mL}$ nos intervalos de 0 a 48 horas. Já contra a *S. aureus* e MRSA, ocorre uma redução significativa na log (UFC/mL) em todos os intervalos de tempo. Houve uma diminuição a zero na formação de biofilmes nas *E. coli* (EHEC, EIEC, *E. coli* não diarréica e *P. aeruginosa*) e contra a *S. aureus* houve uma redução a zero na formação de biofilme nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Não foram visualizadas células bacterianas por MEV das cepas de EHEC, EPEC e *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Foram vistas várias alterações celulares idênticas por MET nas células dos oito patótipos de *E. coli*, como estrutura interna em decomposição, ruptura na membrana plasmática, desintegração da parede celular e vacúolos. As células de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA são totalmente destruídas em contato direto com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Os resultados obtidos pelo método alamar Blue frente às linhagens epiteliais renais derivadas de rins de macaco verde africano (VERO) e célula de fibroblastos de pulmão humanos (MRC-5), foram consideradas tóxicas nas primeiras concentrações de 1000 a 31 $\mu\text{g/mL}$, e IC_{50} de (5,27 $\mu\text{g/mL}$ a 16,6 $\mu\text{g/mL}$) para a célula MRC5 e (4,94 a 17,8 $\mu\text{g/mL}$) para VERO. O $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na linhagem cancerígena monocítica de sangue periférico humano (THP-1) inibiu um efeito citotóxico nas concentrações 1000 a 125 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de 48 e 72 horas. Os menores efeitos citotóxicos foram a partir de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 48 horas e 1,95 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 horas. A célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) teve um perfil tóxico entre as concentrações de 250 a 125 $\mu\text{g/mL}$ e perfil com menos toxicidade entre 62,50 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Nossos estudos demonstram que $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ é altamente eficiente para combater a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA.

Palavra-chave: Tungstato de prata. Antibiofilmes. Mecanismo de ação. Bactérias Gram-negativas. Gram-positivas. Citotoxicidade. Viabilidade.

4.1. INTRODUÇÃO

Bactérias multirresistentes tornaram-se um problema de saúde pública em todo o mundo, reduzindo as opções de tratamento (MURRAY et al., 2022). Se não agirmos contra esse problema, estima-se que até 2050 as superbactérias vão matar mais pessoas do que a atual pandemia de COVID-19. Apesar das diversas discordâncias em relação a previsão, é possível, verificar a magnitude atual da carga de resistência antimicrobiana (RAM) em infecções por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) no ambiente nosocomial e de comunidade (MURRAY et al., 2022). A organização mundial (OMS) de saúde em seu relatório de 2017 e 2019 listou a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA como patógenos de prioridade na busca de novos antimicrobianos e novas alternativas de prevenção, principalmente devido à escolha limitada de antibióticos e altas taxas de letalidade nos ambientes hospitalares.

Pertencendo ao grupo das gram-negativas a *Escherichia coli* compõem a família da Enterobacteriaceae, é definida como bacilo, anaeróbio facultativo, não formadora de esporos e flagelada (Liu, 2019; Pakbin et al., 2021). Esse microrganismo possui oito grupos filogenéticos divididos em cepas comensais (A) e cepas patogênicas (B1, B2, C, D, E, F e G), além disso, a *E. coli* patogênica possui oito patótipos: *E. coli* diarreiogênica (DEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroAgregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* extraintestinal (ExPEC)) (Desvaux et al., 2020; Pakbin et al., 2021). Por causa dos diferentes fatores de virulência a *E. coli* pode causar infecções intestinais e extraintestinais, como diarreia causada pela EPEC (Lee et al., 2022), diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítico-urêmica causadas pela EHEC (Pakbin et al., 2021), diarreia por toxina, causada por ETEC, mas conhecida como diarreia do viajante (Zhang et al., 2022), diarreia aguda por EAEC (Pakbin et al., 2021), diarreia sanguinolenta causada por EIEC (Lagerqvist et al., 2020), semelhante a *Shigella* e a DAEC causadora da diarreia infantil de repetição e infecção do trato urinário em adultos (Pakbin et al., 2021). A *E. coli* também podem causar diferentes infecções nosocomiais como infecção

do trato urinário (Torres-Puig et al., 2022), meningite neonatal (Y. Liu et al., 2021) e sepse (Stoll et al., 2020).

As infecções causadas pelas cepas patogênicas estão associadas a diferentes fatores de virulência que a *E. coli* apresenta dentre os quais encontra-se produção de toxinas termoestáveis (ST) que é codificada por genes encontrados tanto nos plasmídeos como nos cromossomos e as toxinas termolábeis (LT) codificada por genes plasmidiais (Pakbin et al., 2021). Já a toxina Shiga-like codificada pelo gene STX, se liga ao globotriaosilceramina (GB3) realizando o tráfego intracelular da toxina para o Golgi e retículo endoplasmático (RE) (Pakbin et al., 2021; Desvaux et al., 2020), provocando a Síndrome Hemolítica Urêmica. A *E. coli* possui outros fatores de virulência como a capacidade de aderir às células dos hospedeiros para assim colonizar tecidos específicos (Habouria et al., 2022), produzindo a diarreia de repetição, levando a baixa estatura, problemas nutricionais e déficits neurológicos. Possui várias fímbrias podendo ser codificadas por diferentes genes, sendo as mais reportadas na literatura as fímbrias do tipo 1 e P, além disso, o mecanismo de adesão está associado a formação de biofilmes (Abdelhalim et al., 2020; Habouria et al., 2022).

A *Pseudomonas aeruginosa* possui uma morfologia em forma de bacilos, podendo medir 0,5 a 1,0 μm dispondo de um flagelo para a sua movimentação (Nolan, Behrends, 2021; Sousa et al., 2021). A grande habilidade de habituação tornou-lhe um patógeno nosocomial altamente virulento e fatal, além de possuir adaptabilidade principalmente quando acomete pacientes imunocomprometidos, principalmente com fibrose cística (FC) e doenças pulmonares subjacentes (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). Quando coloniza o organismo a *Pseudomonas* começa a produzir a piocianina, uma toxina, que interfere na produção de ATP e clivagem redox do hospedeiro, aumentando ainda mais a velocidade da infecção. Tornando o tratamento ainda mais difícil devido a capacidade desta bactéria em formar biofilmes que as protegem do estresse ambiental circundante, impedindo a fagocitose e facilitando a colonização e persistência a longo prazo nos ambientes hospitalares (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021). A patogenicidade de *P. aeruginosa* está relacionado a diversos fatores de virulência, relacionado a estrutura bacteriana, mas de uma forma geral está associada ao sistema quorum sensing (QS) onde através de

quatro sistemas denominados Las, Rhl, *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) e *Integrated Quorum-Sensing Signal* (IQS) secretam e detectam moléculas autoindutoras responsáveis pela virulência, adaptação e sobrevivência (Thi, Wibowo, Rehm, 2020, Nolan, Behrends, 2021; Sousa et al., 2021).

Apesar de complexo, a literatura divide esse sistema em Interação bacteriana célula a célula que através do (QS) regula os fatores de virulência, assim como o sistema de secreção tipo I, II, III, IV, V, VI responsáveis pela secreção de enzimas, entrega de toxinas entre outros (Nolan, Behrends, 2021; Sousa et al., 2021; Liao et al., 2022). Já os fatores que são secretados como o exopolissacarídeo, sideróforos, protease, toxina e os componentes da estrutura externa como: flagelo, pili tipo IV, lipossacarídeos, adesinas e lectinas, são responsáveis por fornecer fixação, estimulação da resposta inflamatória no hospedeiro, assim como a motilidade através da exameação, natação e movimentação contraída, que confere facilidade para adaptação no organismo do hospedeiro no momento da infecção (Jurado-Martins, Sainz-Mejías, Mcclean, 2021).

O MRSA cuja sigla inglesa é referente a *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina, é uma cepa de *Staphylococcus aureus* com modificações genéticas, também ficou conhecida devido algumas cepas de *S. aureus* serem resistentes à metilina (Algammal et al., 2020), um dos últimos antibióticos capazes de tratar infecções por este patógeno. Caracteriza-se como um patógeno Gram-positivo, esférico de aproximadamente 1µm de diâmetro (Kakoullis et al., 2021; Algammal et al., 2020). As cepas de MRSA adquiridas em ambientes hospitalares são denominadas (MRSA-HA), que são caracterizadas pela presença de um elemento genético móvel, designado por cassette cromossômica estafilocócica (*SCCmec*), que transporta o gene *mecA*, estes carregam os tipos I, II ou III característicos de cepas multirresistentes a mais de três classes de antimicrobianos (Giulieri, Tong, Williamson et al., 2020). O aparecimento e disseminação desta em ambientes hospitalares é devido a vários fatores de riscos e virulência que a bactéria pode utilizar para facilitar seu crescimento e a invasão tecidual (Giulieri, Tong, Williamson et al., 2020). A grande versatilidade e gravidade das infecções causadas por *S. aureus* dependem dos seus fatores de virulência, sendo divididos entre dois grandes grupos: (i) proteínas de superfície, como a Proteína A (SpA), proteína ligante de

fibronectina (FnBP) e a proteína ligante de fibrinogênio (FbBP), que são responsáveis por processos inflamatórios do epitélio das vias aéreas que ocasionam dano tecidual grave, e também são responsáveis pela aderência e invasão do patógeno nas células do hospedeiro e (ii) exoproteínas, como Leucocidina de Panton Valentine (PVL) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) entre outras (Algammal et al., 2020; Andrade et al., 2020). Os fatores de virulência TSST-1 caracterizam-se como de maior risco a vida do paciente, pois trata-se de uma infecção altamente inflamatória devido a ativação de uma quantidade abundante de células T, que ao multiplicarem-se, liberam quantidades exorbitantes de citocinas pró-inflamatórias, esta síndrome é uma doença sistêmica aguda que atinge diferentes órgãos como: gastrointestinal, muscular, renal, hepático, hematológico ou sistema nervoso central (Dias, Zuccoli, 2012).

O tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) surge como uma proposta inovadora de material biotecnológico que pode ser altamente protetor para evitar a propagação de doenças infecciosas (Pereira et al., 2022; Bastos et al., 2022). Estudos recentes comprovam a atividade deste composto contra fungos, vírus e diversas bactérias de interesse clínico (Bastos et al., 2022; Pereira et al., 2022). O Ag₂WO₄ tem chamado atenção nos últimos anos devido às suas características atraentes, aplicáveis a uma ampla gama de cenários, além de ser um material semicondutor multifuncional que apresenta polimorfismo estrutural, propriedades ópticas, eletrônicas e morfológicas permitindo sua aplicação em tecnologias e criação de design, para fins de proteção de superfícies susceptíveis a propagação de infecções, como também de materiais de proteção individual (EPIs) (Pereira et al., 2022; Ribeiro et al., 2022). Esse material apresenta três formas polimórficas denominadas: fase alfa ortorrômbica (α -Ag₂WO₄), fase beta hexagonal (β -Ag₂WO₄) e fase gama cúbica (γ -Ag₂WO₄), onde ambas dispõem de atividade antimicrobiana, porém a alfa possui maior estabilidade (Alvarez-Roca et al., 2021). Essa substância abre caminho para a aplicabilidade contra a bactéria *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, visto que em trabalho recente realizado pelo nosso grupo, verificou excelente atividade contra essas bactérias. Em consequência de diversos fatores de fracassos relacionados a diminuição de infecções bacterianas em ambientes hospitalares, que vem prejudicando a eficácia dos métodos terapêuticos, se torna necessário

a busca por novas alternativas e métodos que possibilitem a diminuição da incidência global e torne os ambientes clínicos mais seguros contra as bactérias MDROS, com isto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos de ação do tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) contra cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e MRSA e os efeitos citotóxicos em linhagens não cancerígenas e cancerígenas, visando contribuir na construção de uma proposta científica de conhecimento bibliográfico e de aplicação na sociedade.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.1.1. Síntese de α -Ag₂WO₄

A síntese de tungstato de prata foi realizada utilizando o método hidrotérmico convencional que consiste em 1, 480560g de nitrato de prata (PA) (AgNO₃) e 1, 43746g de Tungstato de sodium dihidratado (Na₂WO₄), que foi adicionado separadamente a massa em 35 mL de água ultrapura em dois tubos Falcon, a solução de Na₂WO₄ ficou em agitação no reator, em seguida adicionou-se lentamente gota a gota a solução de AgNO₃, ocorrendo a mudança de cor transparente para amarelo claro. A solução foi adicionada no copo de teflon após 5 minutos de agitação e inserida em um cilindro de aço e lacrado com tampa rosqueada e mantido fechado em estufa a 140 °C por 24 horas. O precipitado amarelo claro foi recolhido por centrifugação, lavado 3 vezes com água destilada e acetona, em seguida foi secada em estufa a 80 °C durante 8 h.

5.1.2. Difração de raios X de α -Ag₂WO₄

Os microcristais α -Ag₂WO₄ foram caracterizados estruturalmente por padrões de XRD usando um difratômetro (SHIMADZU- 7000) com radiação Cu Ka (λ = 1,5406 Å) na faixa 2 θ de 10° a 110° na rotina normal com uma velocidade de varredura de 2°/min.

5.1.3. Caracterização morfológica de α -Ag₂WO₄ por microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)

O imageamento foi realizado utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (Marca JEOL - Modelo MEV - JSM-IT500HR) do Centro Multiusuário para Análise em Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). O α -Ag₂WO₄ foi posicionado sobre stubs com o uso de uma fita dupla face de carbono, em seguida foram metalizadas com ouro por 4 minutos em um metalizador (marca JEOL Smart Coater), com aceleração de voltagem à 10 kV sob alto vácuo e as imagens foram obtidas em diferentes magnificações (x1000, x6000, x15000, x25000, x43000 e x50000). As análises de EDS foram realizadas no MEV (Marca VEGA3 TESCAN - Modelo EDS Oxford), do laboratório Temática de Microscopia Óptica e Eletrônica (LTMOE) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), que foi operado na aceleração de voltagem de 30 kv sob alto vácuo.

5.2. ENSAIOS BACTERIANOS

5.2.1. Microrganismos e padronização de inóculo bacteriano

Para os ensaios bacterianos foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (BUTANTÃ F1845), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (CDC EDL O42), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (CDC EDL 933171), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (INCQS ST8), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (INCQS LT 2871), *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) (ATCC E234869), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) (ATCC 1381), *Escherichia coli* não diarreio gênica (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 00386), *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 00313), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA). Inicialmente, para todos os ensaios, as culturas microbianas foram então diluídas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA) de acordo com a escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC mL). O α -Ag₂WO₄ foi solubilizado em H₂O que ficou em agitação por 16 horas, este mesmo procedimento foi repetido para todos os experimentos.

5.2.2. Atividade antibacteriana pelo método de difusão em poço de ágar

Os ensaios foram realizados, segundo Grove e Randall (1955) com modificações segundo Bastos et al. (2022), este método consiste em uma placa de dupla camada de Ágar. Os meios de cultura foram esterilizados por autoclave e vertidos em placas de Petri (90x15mm) dentro do fluxo laminar. Na superfície do ágar, as culturas bacterianas foram inoculadas com um swab estéril, seguindo o formato de poços de 6mm na camada superior do ágar. Foi adicionado em cada poço 50 µL na concentração de 1000 µg/mL. Foram utilizados os controles positivos, ceftriaxona para (*E. coli*), imipeném + cilastatina sódica (TIENAM) para (*P. aeruginosa*) e oxacilina para (*S. aureus* e MRSA), na concentração inicial de 500µg/mL.

5.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, conforme CLSI (2012), com modificações conforme Bastos et al., (2022). O α -Ag₂WO₄ foi avaliado em valores decrescentes variando de 1000 a 0,48µg mL⁻¹. Cada poço recebeu 100µL de α -Ag₂WO₄, 20µL de inóculo bacteriano padronizado, 20µL de resazurina 0,01% (INLAB, São Paulo, Brasil) e 60µL de meio BHI, totalizando 200µL por volume de poço. O inóculo bacteriano foi adicionado como controle de crescimento bacteriano. Foram utilizados como controles positivos foi utilizado a ceftriaxona para (*E. coli*), imipeném + cilastatina sódica (TIENAM) para (*P. aeruginosa*) e oxacilina para (*S. aureus* e MRSA). Os valores de MICs foram definidas como a menor concentração α -Ag₂WO₄, capaz de inibir o crescimento bacteriano, indicado pela permanência da coloração azul da resazurina (Bastos et al., 2022)

5.2.4. Teste de ação Microbicida e Microbiostático

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Swolana et al., (2022), com modificações. As bactérias testadas foram cultivadas por 24 horas no meio BHI, após foi ajustada a uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL nos tubos, contendo α -Ag₂WO₄ na maior e menor MICs ativa correspondente a cada cepa, que foram incubadas a 37 °C, sob Agitação de (100

rpm), nos intervalos de (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h). A cada intervalo, a absorbância da cultura foi monitorada e submetida à diluição seriada de (1:10) e desta diluição 100 µL foram semeados em placa de Petri com meio AMH. As placas semeadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, posteriormente foram realizadas as contagens de colônias. A partir das contagens de colônias foi possível construir uma curva logarítmica, onde o eixo das ordenadas corresponde ao número de UFC/mL em escala logarítmica.

5.2.5. Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme foi determinada segundo Swolana et al., (2022), com modificações. Após 24 horas de incubação a cultura foi diluída a 0.1 densidade óptica (DO) para medição da absorbância (570nm) em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu), em seguida foi adicionada em placa de 48 poços e tratada com α -Ag₂WO₄ nas concentrações correspondente as MCs ativas para cada cepa. As placas foram incubadas por 48 horas (100 rpm, 37 °C), após a incubação os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS, PH = 7,2), secos e corados com 200 µL cristal violeta 0.1% (INLAB). Após 15 minutos de incubação, os poços foram novamente lavados com água Miliq (4X) e foram retirados o excesso. Para a diluição do biofilme foi adicionado 200 µL de etanol a 96%, e por fim, a absorbância foi monitorada no leitor de microplaca (GloMax® Explorer), em um comprimento de ondas de (λ = 570 nm).

5.2.6. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas após o tratamento com os α -Ag₂WO₄ numa concentração sub-letal de (1mg/mL) durante 3 horas a 37 °C, conforme SANTOS et al., (2008). As bactérias foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e o tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2) por 24 horas, após fixação em 1% de tetróxido de Ósmio (OsO₄) e 0,8% de ferrocianeto de potássio, seguidas de desidratação em etanol com uma série graduada de (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 2x em 100%), tendo um intervalo de 15 minutos para cada série. Posterior à secagem em ponto crítico, utilizando o equipamento (Leica PCD 300) foram alocadas sobre os stubs utilizando uma fita dupla face de carbono para a metalização com

ouro (JEOL Smart Coater). O imageamento foi realizado em um microscópio eletrônico de varredura modelo (JEOL, MEV - JSM-IT500HR), operando a 10 kV sob alto vácuo.

5.2.7. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A metodologia adotada foi de acordo com SANTOS et al., (2008). As suspensões bacterianas foram coletadas da fase exponencial de 6 horas, que foram tratadas com o α -Ag₂WO₄ em uma concentração sub-letal de 1mg/mL durante 3h por 37 °C. As células bacterianas foram fixadas por meio da submersão das amostras em solução Karnovsky (1% paraformaldeído + 3% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2) por 24 horas, em temperatura ambiente, seguida de três lavagens sucessivas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 10 minutos cada. A pós-fixação foi realizada por 1 hora em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, e desidratadas com soluções de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 15 minutos. As bactérias foram submetidas à infiltração em resina epon seguindo o gradiente de trocas de acetona para epon na proporção de 2:1, 1:1 e 1:2 com intervalos de 10 horas, até as amostras estarem totalmente submersas na resina. Posteriormente estas foram alocadas nos moldes de silicone e permaneceram na estufa à 70 °C por 48 horas para a formação dos blocos, que foram submetidos a cortes ultrafinos de 70 a 100 nm e depositados sobre grades de cobres cobertas com formvar. As células foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (Modelo JEOL JEM - 1400Flash), em alto vácuo sob voltagem de 80kV, e as imagens obtidas com uma câmera integrada ultra sensitiva (Câmera AMT 43 Megapixel Bottom Mount).

5.2.8. Cultivos das células não cancerígenas e cancerígenas

As linhagens aderentes normais de fibroblasto de pulmão humanos (MRC5), epitelial renal derivada de rins de macaco verde africano (VERO) e a célula cancerígena do epitelioma de laringe humano (HEp-2), foram cultivadas no meio de cultura DMEM (Modified Eagle Medium da Dulbecco). Já a célula monocítica de sangue periférico humano (THP-1) foi cultivada no meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute). Todas as células foram suplementadas com

10% de Soro Fetal Bovino (Gibco) e gentamicina (50 mg/L), foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Após atingir a confluência desejada, às células foram plaqueadas na concentração de $1,0 \times 10^4$ células por poço em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37°C.

5.2.9. Ensaios de Viabilidade e citotoxicidade

Os ensaios foram determinados pelo método Alamar Blue baseada no trabalho de Assis et al., (2019) com adaptações realizadas pelo laboratório da plataforma de Bioensaios de compostos Biotecnológicos (RPT11H) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD). Após 24 horas de incubação e aderência, as células foram tratadas com α -Ag₂WO₄ nas concentrações de 1000 µg/mL a 0,48 µg/mL e mantidas em 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas a 37 °C. Já as células HEP-2 e THP-1, foram mantidas apenas em 48 e 72 horas. Após esse período adicionou-se 10 µL de Alamar blue® (Sigma-Aldrich, Brasil) 0,4% (diluída 1:20) em cada poço. Após as placas foram incubadas e esperou-se o tempo de metabolização de 2 horas do Alamar e a leitura foi realizada em três períodos (1, 2 e 3 horas). A fluorescência foi monitorada em um leitor de microplaca (GloMax® Explorer) comprimento de onda de emissão 580-640 nm e excitação 520. Como controle positivo foi utilizado o crescimento celular e como controle de droga foi utilizado a doxorrubicina (DOX) (Sigma-Aldrich), que foi testada nas mesmas concentrações α -Ag₂WO₄.

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão para o ensaio de difusão em poço de ágar. A normalização dos dados foi avaliada pelo ensaio de Shapiro Walk. Para a viabilidade das células MRC-5 e VERO, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparar o efeito das diferentes concentrações e intervalos. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism® versão 9.3.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

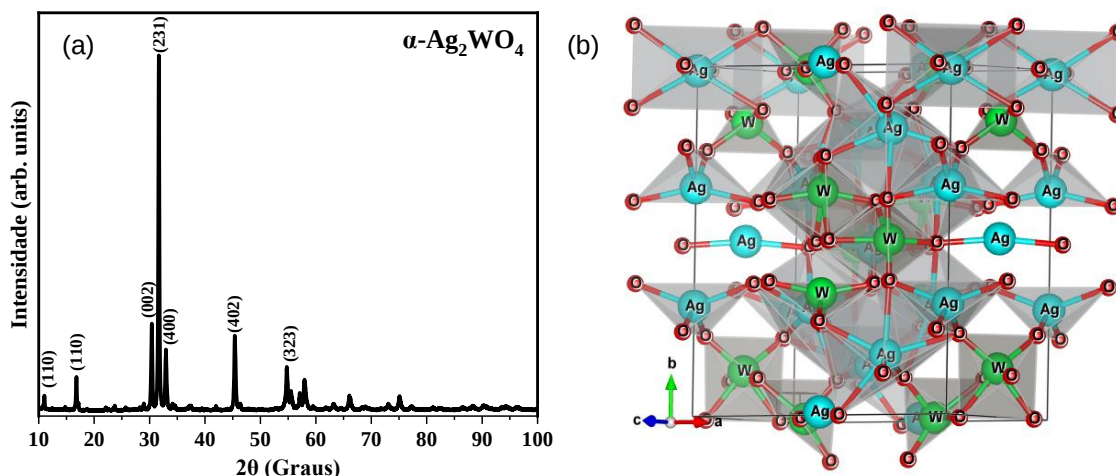
6.1. Difração de raios X e refinamento estrutural de α -Ag₂WO₄

A caracterização por difração de raios X possibilita o estudo detalhado das informações cristalográficas, dentre as quais, o tamanho de cristalito, posições atômicas, parâmetros de rede, comprimento de ligações e volume de célula unitária. O padrão de difração coletado para o tungstato de prata sintetizado neste estudo está apresentado na Figura 10.

A indexação do padrão de difração do tungstato de prata puro revelou o elevado grau de similaridade dos planos cristalográficos, tanto em perfil como posição, com a fase alfa do tungstato de prata (α -Ag₂WO₄), que possui sistema ortorrômbico com grupo espacial $Pn2n$ e quatro fórmulas por célula unitária. Além disso, a intensidade dos picos de difração indica a obtenção de um material com elevado grau de cristalinidade e grau de ordem/desordem a longo e curto alcance para cristais formados. No padrão coletado não foram identificados planos cristalográficos que possam indicar a presença de resquício de materiais de partida ou fases secundárias, desta forma, é possível afirmar do elevado grau de pureza para composto formado. Dentre os planos cristalográficos da estrutura, é possível destacar os picos nos valores $2\theta^\circ$ em 11,1°, 16,7°, 30,3°, 31,6°, 33°, 45,2° e 54,6°, associados aos planos cristalográficos (110), (011), (002), (231), (400), (402) e (232), respectivamente.

A célula unitária do tungstato de prata, como mostrado na Figura 10b, neste caso, modelada utilizando o software de disponibilidade gratuita Visualization for Electronic Structural Analysis (VESTA), possibilitou identificar a composição dos clusters de prata [AgO_x], onde $x = 2, 4, 6$ e 7 , de simetria angular, tetraédrica, octaédrica e deltaédrica, respectivamente. Enquanto os clusters [WO_y], $y = 6$, possuem simetria octaédrica. Desta forma, nota-se que os resultados obtidos estão em ótima concordância com os reportados no estudo publicado previamente por Bastos et al., (2022), como também, nos trabalhos recentes de (Assis et al., 2019; Ribeiro et al., 2022).

Figura 10 - Padrão de difração (a) e representação esquemática da célula unitária do (b) α -Ag₂WO₄ sintetizado



Nota: A célula unitária foi modelada utilizando as informações cristalográficas provenientes do cartão ICSD nº. 4165.

7. ENSAIOS BIOLÓGICOS

7.1. Suscetibilidade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM)

O potencial antimicrobiano de α -Ag₂WO₄ foi avaliado de forma qualitativa através do método de difusão em ágar. Os halos de inibição foram mensurados em milímetro (mm) possibilitando determinar o potencial de inibição, assim como foi determinada a concentração inibitória mínima. A Tabela 4 mostram que α -Ag₂WO₄ foi capaz de inibir as oito cepas de *E. coli*. Porém as melhores inibições foram observadas nos patótipos de EPEC e EIEC com média de halo de inibição de $(22 \pm 0,55)$ e MIC de $15,6 \mu\text{g/mL}$. Seguido da cepa EAEC que apresentou uma média de halo de $(21 \pm 0,55)$, porém a MIC de $(7,81 \mu\text{g/mL})$, foi melhor que EPEC e EIEC. Já em relação às bactérias DAEC, ETEC-ST e EHEC apresentaram médias de halos de $(20 \pm 0,55)$, $(20 \pm 0,57)$ e $(20 \pm 0,56)$ e MIC de $(31,25 \mu\text{g/mL})$ respectivamente. Já a cepa ETEC-LT apresentou média de halo de $(20 \pm 0,58)$, semelhante às cepas DAEC, ETEC-ST e EHEC, porém a MIC foi menor $(62,5 \mu\text{g/mL})$. Dentre as cepas testadas o menor halo de inibição observado foi contra *E. coli* não diarreica $(19 \pm 0,57)$, porém a MIC de $(31,25 \mu\text{g/mL})$ foi semelhante as cepas DAEC, ETEC-ST e EHEC (TABELA 4).

O α -Ag₂WO₄ foi submetido ao ensaio de susceptibilidade bacteriana frente a três cepas de *P. aeruginosa*, sendo um padrão e duas cepas clínicas e foi avaliada duas cepas de bactérias Gram-positivas *S. aureus* e MRSA. Dentre as três cepas analisadas de *P. aeruginosa*, a cepa *P. aeruginosa* (INCQS 0386) apresentou a maior média de halo de inibição de ($22 \pm 0,57$) em comparação com a *P. aeruginosa* (ATCC 15442) que apresentou média de halos de ($19 \pm 0,55$) (TABELA 4). Assim como também foi determinado a Concentração Inibitória Mínima de α -Ag₂WO₄ em caldo, e observou-se que a cepa clínica *P. aeruginosa* (INCQS 0386) apresentou a menor MIC de 15,6 μ g/mL, semelhante ao controle de droga TIENAM (TABELA 4).

Tabela 4 - Média de halo de inibição $\pm$ desvio padrão e a concentração inibitória mínima (CIM)

Bactérias	Halos de inibição e média (mm)		CIMs (μ g/ mL)	
	α -Ag ₂ WO ₄	C+	α -Ag ₂ WO ₄	C+
<i>E. coli</i> (DAEC)	$20 \pm 0,55$	$30 \pm 0,57$	31,25	0,48
<i>E. coli</i> (ETEC-LT)	$20 \pm 0,57$	$28 \pm 0,58$	31,25	0,48
<i>E. coli</i> (ETEC-ST)	$20 \pm 0,58$	$18 \pm 0,55$	62,5	0,48
<i>E. coli</i> (EPEC)	$22 \pm 0,55$	$29 \pm 0,57$	15,62	0,48
<i>E. coli</i> (EAEC)	$21 \pm 0,55$	$29 \pm 0,55$	7,81	3,90
<i>E. coli</i> (EHEC)	$20 \pm 0,56$	$29 \pm 0,57$	31,25	0,48
<i>E. coli</i> (EIEC)	$22 \pm 0,55$	$29 \pm 0,57$	15,62	0,48
Diarrheagenic <i>E. coli</i>	$19 \pm 0,57$	$29 \pm 0,57$	31,25	0,48
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$19 \pm 0,55$	$22 \pm 0,57$	62,5	31,25
<i>P. aeruginosa</i> INCQS 0386	$22 \pm 0,57$	$25 \pm 0,57$	15,62	15,62
<i>P. aeruginosa</i> INCQS 0313	$21 \pm 0,57$	$24 \pm 0,57$	31,25	15,62
<i>S. aureus</i>	$22 \pm 0,55$	$28 \pm 0,56$	15,62	15,62
MRSA	$18 \pm 0,55$	$26 \pm 0,57$	31,25	15,62

Nota: Controles (C+) de *Escherichia coli* (Ceftriaxona), *Pseudomonas aeruginosa* (imipeném + cilastatina sódica) e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina MRSA (Oxacilina).

Já em relação às bactérias Gram-positivas, o melhor halo de inibição foi expresso frente a *S. aureus* com halo de inibição de ($22 \pm 0,55$) e MIC de (15,62 μ g/mL) e MRSA uma média de inibição de ($18 \pm 0,55$) e MIC de 31,25 μ g/mL (TABELA 4). A MIC encontrada no presente estudo é maior do que reportado no estudo de Alvarez-Roca et al., (2021) que avaliou atividade bactericida de α -

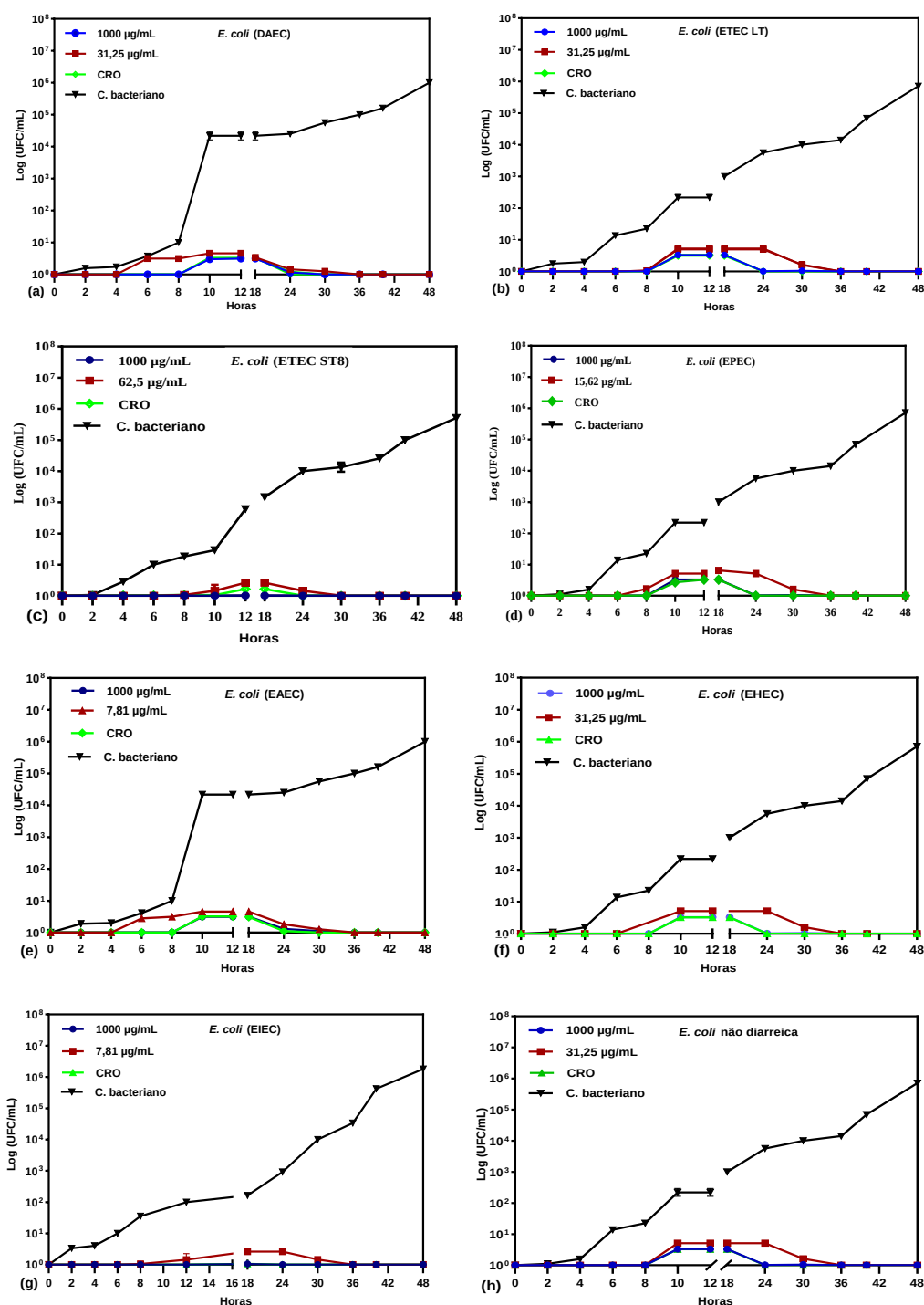
Ag_2WO_4 tratada com radiação a laser e $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não tratadas frente a MRSA, e os resultados demonstraram que o material não irradiado apresenta uma MIC de 125 $\mu\text{g/mL}$, quando o material é irradiado, apresenta uma MIC de 3,91 $\mu\text{g/mL}$ em relação às amostras não tratadas. Estudos realizados pelo nosso grupo também reportou excelente atividade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ contra fungo como *Cândida albicans* e bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e dentre outras bactérias de interesse clínico (Nobre et al., 2019; Bastos et al., 2022).

7.2. Teste de ação microbicida e microbiostático

Para melhor elucidar o comportamento microbicida e microbiostático do crescimento bacteriano após o tratamento com diferentes concentrações de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, foi avaliada a boa atividade inibitória a partir das MICs encontradas, em função da dose e tempo exposto as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA.

Como observado na Figura 11, os resultados mostram que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ teve um efeito significativo de ($P < 0,0001$) contra todas as cepas de *E. coli*, sendo que a melhor atividade observada foi contra *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), reduzindo a zero a log (UFC/mL) na concentração sub-letal de 1000 $\mu\text{g/mL}$, comparado ao controle de crescimento microbiano (FIGURA 11g). Sendo que na menor concentração de 7,81 $\mu\text{g/mL}$, ainda se observa uma excelente atividade com uma log abaixo 0,5 (UFC/mL) em todos os intervalos de tempo (FIGURA 11g). Também notou uma excelente atividade contra *E. coli* enterotoxigênica (ETEC ST8), com log de UFC/mL a zero na concentração sub-letal de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 11c). Já na concentração inibitória mínima houve um pequeno aumento na log entre as 10 horas a 24 horas, mas após 24 horas não houve uma queda na inibição, chegando a zero a presença de colônias, demonstrando o efeito bactericida na menor concentração (FIGURA 11c). Já para as demais *E. coli* os resultados foram similares com pequenas diferenças nos intervalos de tempos, assim como os resultados foram similares ao controle de droga. As cepas de *E. coli* apresentam comportamento semelhante no crescimento, com um aumento no log de UFC/mL nos intervalos de 6 a 30 horas, mas após o período de 36 horas, não foi possível verificar a presença de colônias nas placas,

Figura 11 - Cinética de crescimento dos oito patótipos de *Escherichia coli* após a exposição às concentrações inibitórias mínimas (MICs) de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄)



Nota: *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (a); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) (b); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) (c); *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) (d); *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (e); *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (f); *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) (g); *Escherichia coli* não diarréiogênica (h).

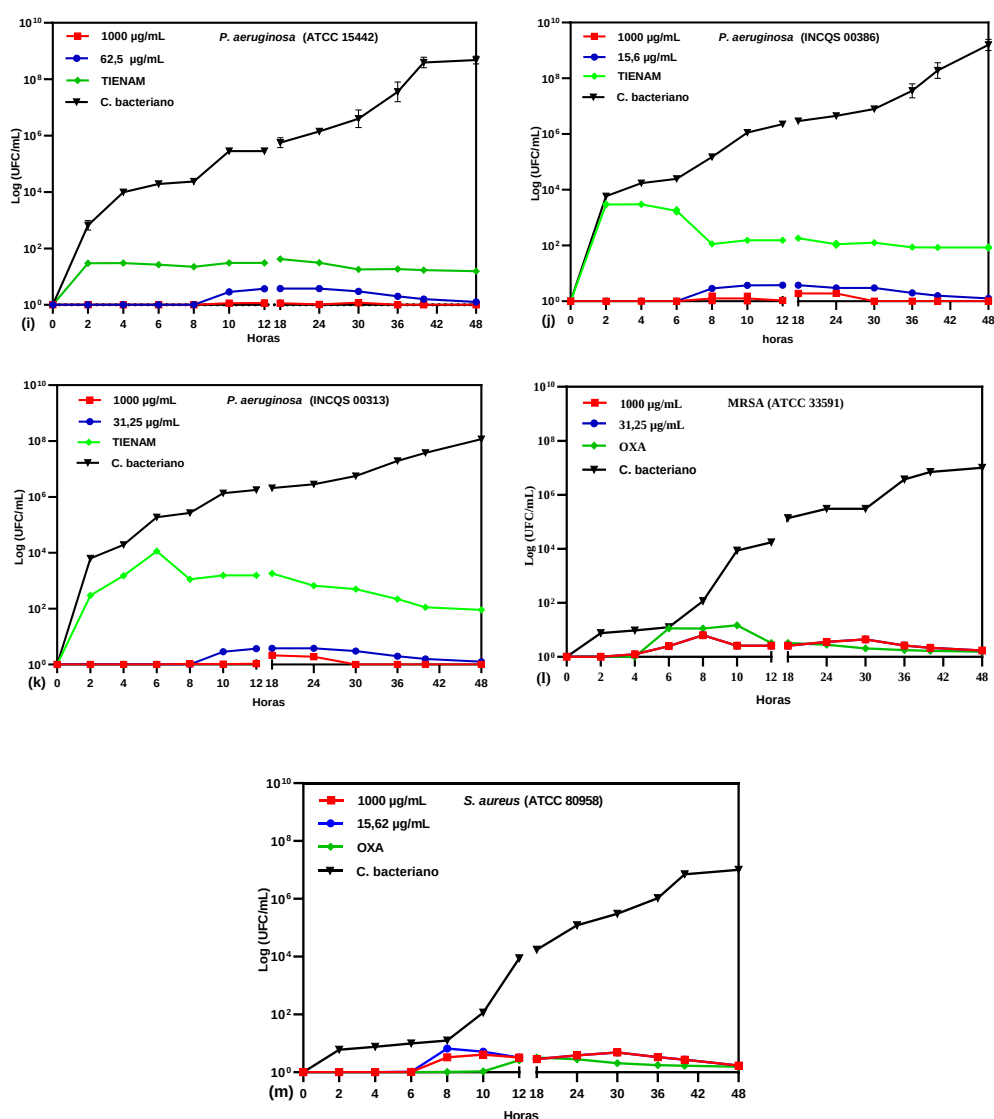
demonstrando que o α -Ag₂WO₄ tem um efeito bactericida contra as cepas de *E. coli*, tanto na concentração sub-letal como na concentração inibitória mínima. Um outro comportamento semelhante observado, foi o efeito bactericida do α -Ag₂WO₄ ser igual ou próximo à concentração sub-letal de 1000 µg/mL, não havendo diferença significativa entre a concentração mais alta e a concentração mínima. Porém fica evidente o efeito bactericida de o α -Ag₂WO₄ sobre as cepas patogênicas de *E. coli*, principalmente atuando na fase exponencial, visto que em todas as cepas ocorre um aumento na log (UFC/mL) a partir de 6 horas, porém o α -Ag₂WO₄ consegue atuar na inibição.

Quando avaliadas as cepas de *P. aeruginosa*, nota-se que o α -Ag₂WO₄ apresentou melhores resultados que o controle de droga em todos os intervalos de tempo e dose (FIGURA 12). Já na concentração sub-letal de 1 mg/mL, observa-se que houve uma redução a zero colônias frente a *P. aeruginosa* (ATCC 15442) em todos os intervalos de tempo, apenas na menor MIC de 62,5 µg/mL, ocorre uma pequena inibição no log (UFC/mL) partir de 8 horas, porém a replicação é lenta, assim como também a bactéria não consegue se replicar o suficiente para entrar na fase exponencial (FIGURA 12i). Na curva da cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00386) e *P. aeruginosa* (INCQS 0313), os comportamentos foram parecidos, sendo que na concentração sub-letal (1mg/mL) ocorre uma diminuição expressiva no log (UFC/mL) comparado ao controle de bactérias, porém das 18 às 30 horas ocorre um aumento na inibição, mas não ultrapassa a 0,01 na log UFC/mL (FIGURA 12j e 12k). O comportamento microbicida é observado a partir das 36 horas, e se mantém até às 48 horas. Já nas menores MICS de 15,6 µg/mL e 31,25 µg/mL, ocorreu uma redução considerável <0,05 log de morte bacteriana (FIGURA 12j e 12k). Dentre as três cepas de *P. aeruginosa* avaliadas o melhor resultado encontrado foi contra a cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 15442).

Nas curvas de *S. aureus* e MRSA, ocorre uma redução significativa na log (UFC/mL) em todos os intervalos de tempo, porém observa-se que os resultados na concentração sub-letal foram similares as 32,25 e 15,6 µg/mL e não houve diferença significativa apenas houve diferença significativa nos intervalos de 6 a 12 horas (FIGURA 12l e 12m). O comportamento microbicida e microbiostático frente às cepas testadas nas diferentes MICs de α -Ag₂WO₄, demonstram que o principal efeito contra as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA, é o

atraso da fase de crescimento exponencial, e com isto, as bactérias não consegue se replicar o suficiente e consequentemente ocorre a morte dos microrganismos. Os dados foram significativos com ($P < 0,05$) principalmente nos intervalos de 12, 18 e 30 em todas as curvas.

Figura 12 - Ação microbicida e microbiostático de tungstato de prata, frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

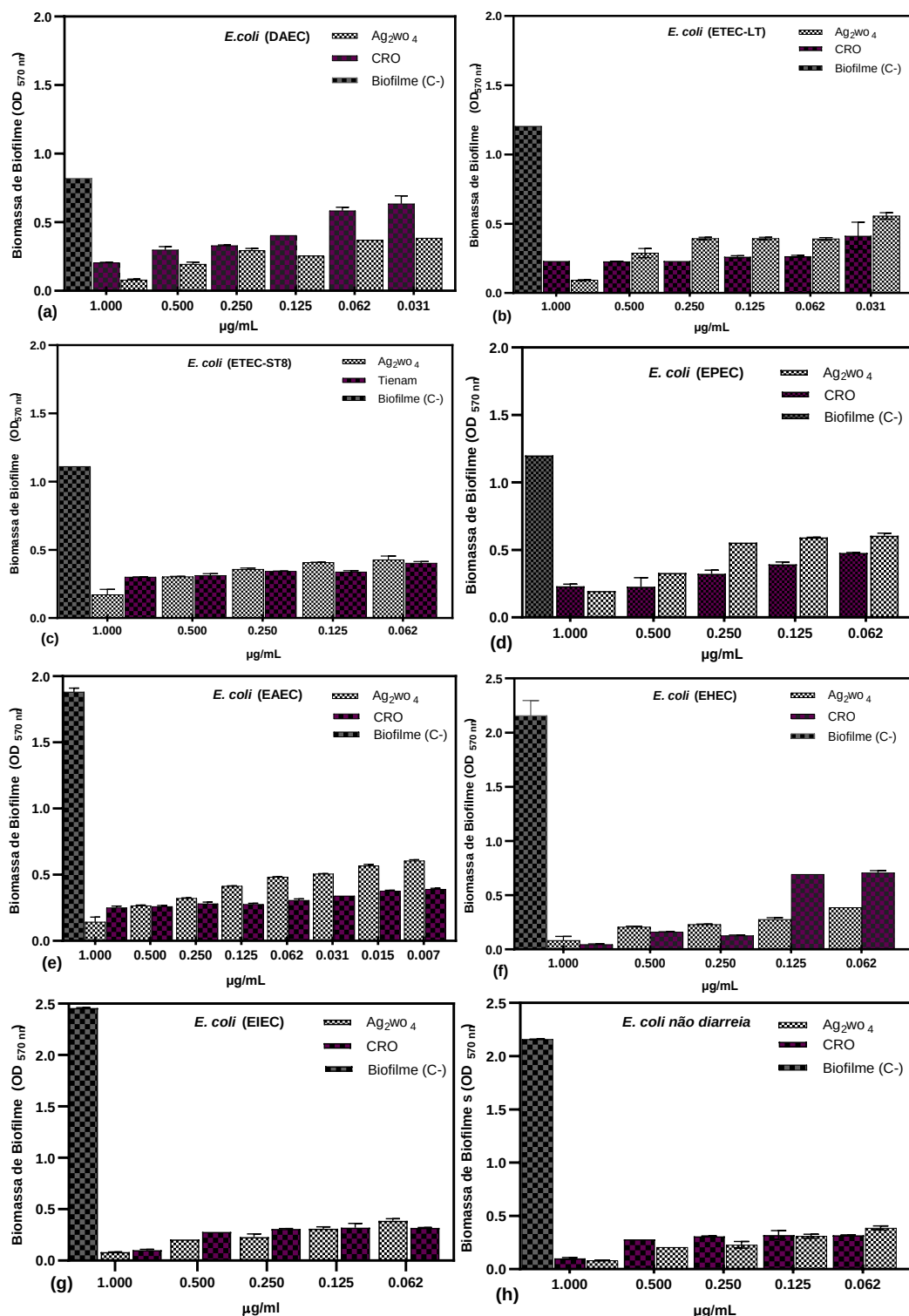


7.3. Atividade antibiofilme

A formação de biofilme é uma importante estratégia de sobrevivência e modo de persistência entre surtos epidêmicos dos patógenos humanos nos ambientes hospitalares, além dos biofilmes serem conhecidos por promover resistência contra vários agentes antimicrobianos e com isso agrava o estado de saúde dos pacientes hospitalizados. Aqui, avaliamos o efeito antibiofilme correspondentes às MICS de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ frente às cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA, visto que essas bactérias são conhecidas por sua capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies e além de estar associado ao aumento de riscos de infecções nos ambientes hospitalares, e agravamento devido a formação de biofilme.

Ao analisamos o impacto de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na formação de biofilmes dos oito patótipos de *E. coli*, após 48 horas de exposições nas diversas concentrações e MICs, observa-se uma redução significativa na formação de biofilmes contra todas os oito patótipos de *E. coli*, em comparação aos controles de crescimentos bacterianos (sem tratamento) (Figura 13). Os melhores resultados observados foram contra os patótipos (EHEC, EIEC e *E. coli* não diarreica) (Figura 13f, 13g e 13h). Também é possível verificar uma clara diminuição na absorbância, principalmente nas primeiras concentrações contra (DAEC, ETEC LT, ETEC ST e EPEC) (Figura 13a, 13b, 13c e 13d). Já o patótipo EAEC apresentou uma menor diminuição, porém comparado ao controle de bactéria é possível verificar o seu efeito significativo na diminuição da formação de biofilme (Figura 13e).

Figura 13 - A capacidade dos oito patótipos de *Escherichia coli* de produzir biofilme após as exposições às concentrações inibitórias mínimas (MICs) de tungstato de prata



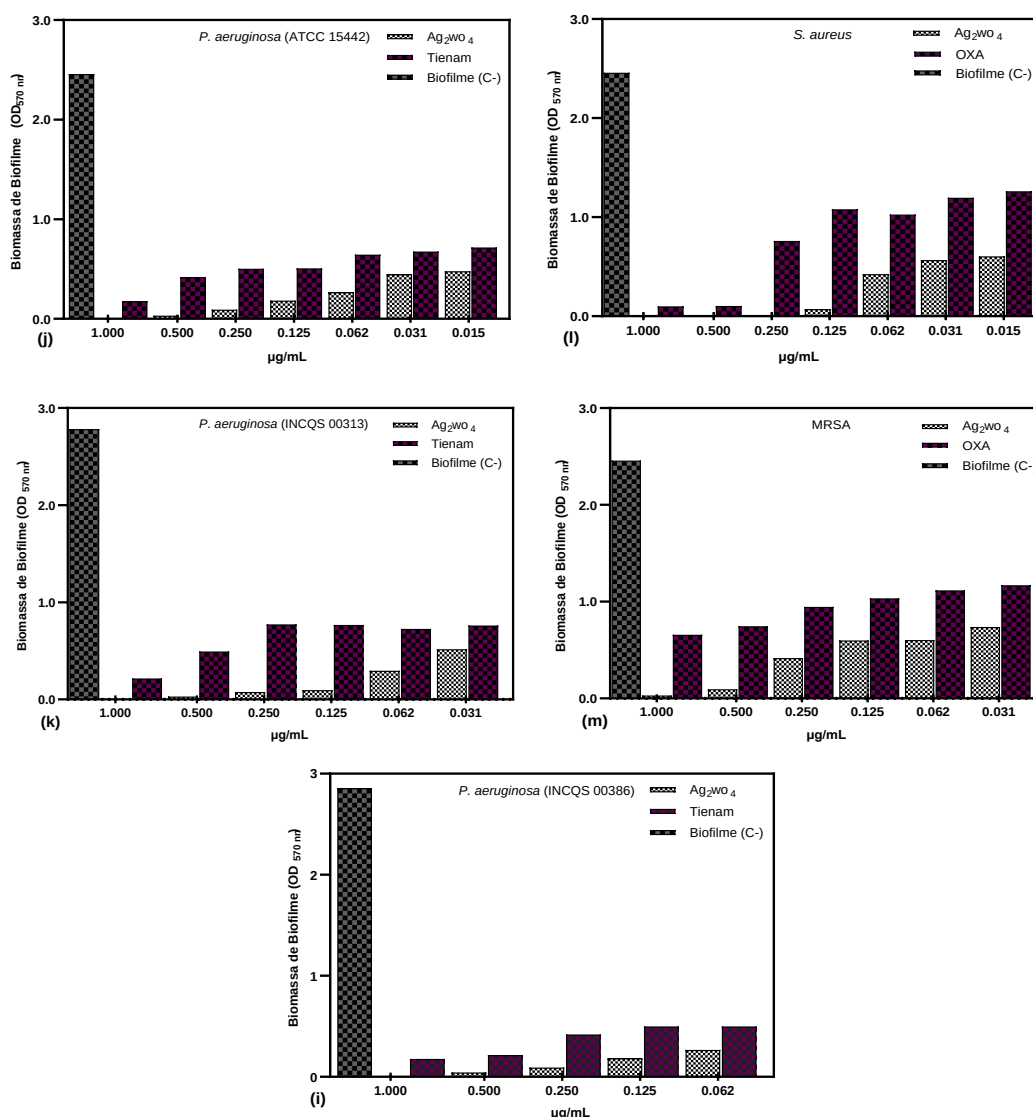
Nota: *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (a); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) (b); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) (c); *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) (d); *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (e); *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (f); *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) (g); *Escherichia coli* não diarreio gênica (h).

Os achados no presente estudo se tornam relevantes vistos que as cepas de *E. coli* tem capacidade de aderir a superfícies das células hospedeiras ou matriz extracelular, que facilita o acesso a outros nichos específicos e promove a colonização nos tecidos do hospedeiro (Desvaux et al., 2020; Habouria et al., 2022). Esses fatores de virulência associados aos biofilmes estão ligados a vários tipos de adesinas fimbriais, que permite que a *E. coli* produza uma variedade de adesinas promovendo a adesão a substratos ambientais (Desvaux et al., 2020; Habouria et al., 2022). Esses fatores de virulência muito comum no caso das ETEC, EHEC e *E. coli* não diarréica, que envolve um repertório grande e diversificado de pili, chamados antígenos do fator de colonização (CFAs), que se ligam a diferentes receptores na superfície das células hospedeiras e as EAEC que exibem um padrão típico de tijolo empilhado conhecido como adesão agregativa (Desvaux et al., 2020; Habouria et al., 2022).

As três cepas de *P. aeruginosa* os dados demonstram que α -Ag₂WO₄ na concentração sub-letal de 1000 µg/mL reduziram a zero a formação de biofilme contra as três cepas de *P. aeruginosa* e teve diferença significativa comparado ao controle de droga (Figura 14i, 14j e 14k). Também observou-se uma redução significativa na biomassa de biofilme nas menores MICs testadas (62,5, 31,25 e 15,6 µg/mL) (Figura 14i, 14j e 14k).

Ao analisar as cepas Gram-positivas, observa-se que a *S. aureus* teve uma redução a zero a formação de biofilme nas três primeiras concentrações (1000, 500 e 250 µg/mL), nas menores MICs houve uma redução na absorbância abaixo de 0,5 (Figura 14l e 14m). Com a MRSA, observou-se diminuição significativa na massa de biofilme, com D.O próximo a zero na concentração sub-letal (Figura 14m). Nas demais concentrações houve uma diminuição significativa na absorbância quando comparado ao controle de droga (Figura 14m). Os resultados encontrados demonstram que o α -Ag₂WO₄ é capaz de atuar na formação de biofilmes no estágio inicial de fixação, assim como é capaz de reduzir a zero a formação de biofilmes na concentração sub-letal de (1000 µg/mL). Além de diminuir significativamente os biofilmes formados por esses patógenos nas menores MICs testadas.

Figura 14 - A capacidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina de produzir biofilme após as exposições nas concentrações inibitórias mínimas



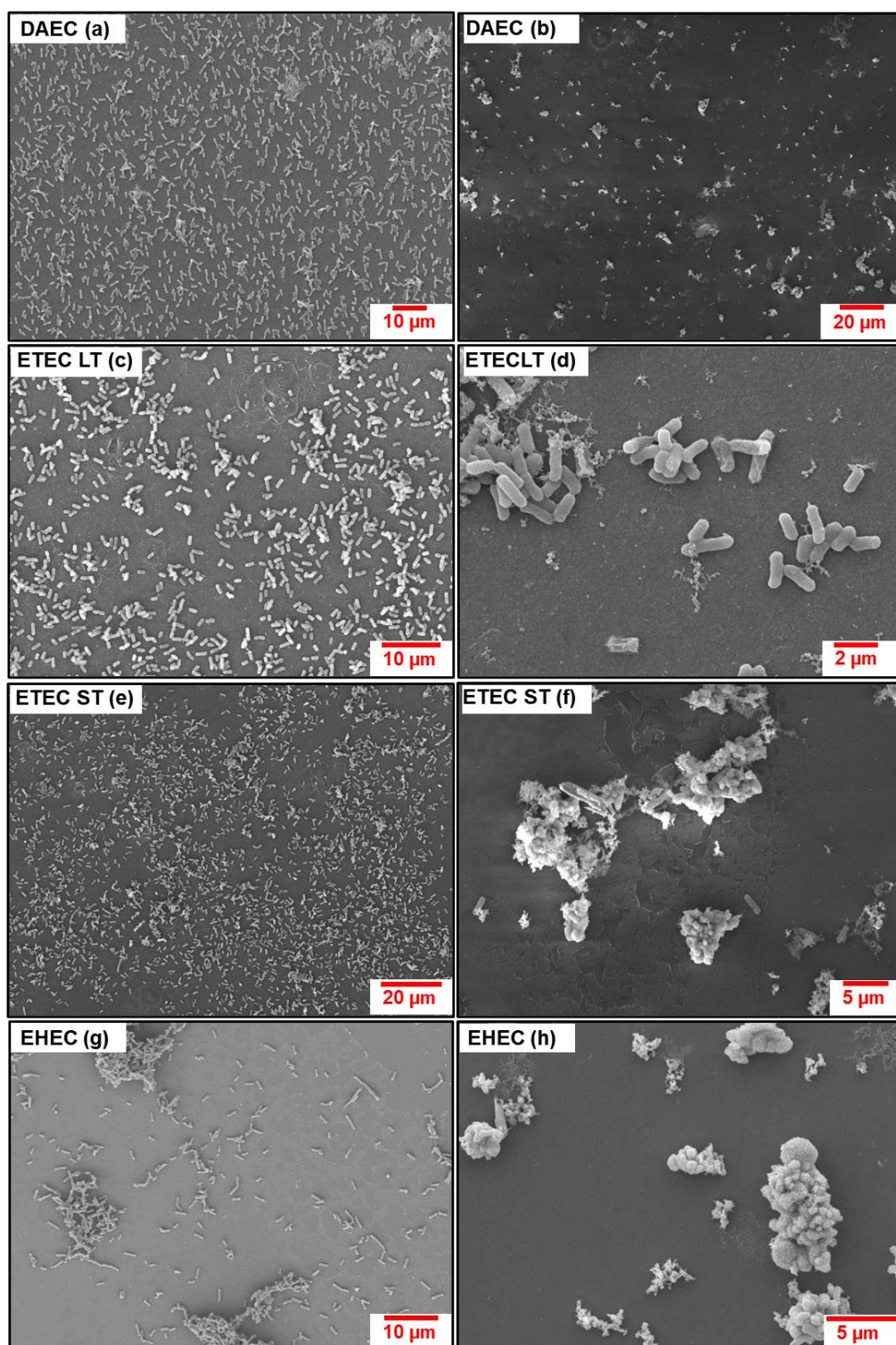
Esses achados se tornam relevantes, pois nesse estágio os biofilmes apresentam um metabolismo mais ativo e consequentemente ocorre uma rápida expansão das células planctônicas nos ambientes abióticos e bióticos (Kumar, Varela 2013). Com esses resultados é possível verificar que α -Ag₂WO₄ atua de forma eficaz nas células planctônicas, antes que ocorra a adesão irreversível das microcolônias, como também pode atuar interrompendo a maturação e evitando a dispersão bacteriana para colonizar outros locais (Thi, Wibowo, Rehm, 2020). Assim como também o α -Ag₂WO₄ pode atuar de forma eficaz na colonização múltiplas das duas espécies, visto que *P. aeruginosa* costuma colonizar junto a

S. aureus. Essa colonização ocorre por causa do peptídoglicano derivado de *S. aureus* que induz a *P. aeruginosa* a produzir piocianina, que funciona como antimicrobiano e toxinas que podem reduzir a viabilidade de *S. aureus* dentro do biofilme (Pajon et al., 2023). Em contrapartida facilita a seleção de variantes de pequenas colônias resistentes de *S. aureus*, que gera mutações na cadeia de transporte de elétrons e maior resistência à morte de *P. aeruginosa* (Pajon et al., 2023; Kakoullis et al., 2021).

7.4. Análises de alterações celulares por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

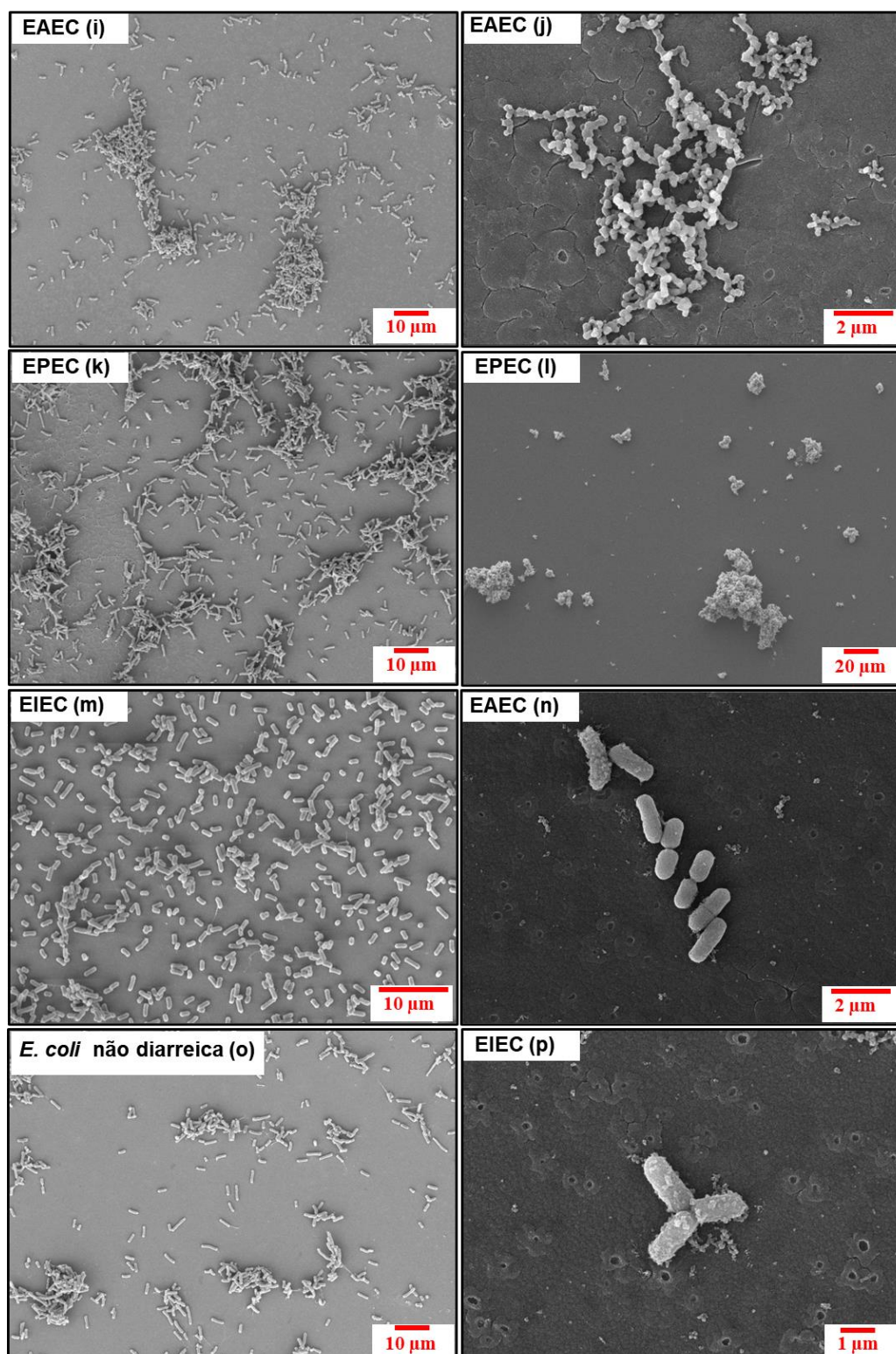
A microscopia eletrônica de varredura foi usada para examinar as alterações ultraestruturais das cepas de *E. coli*, que foram expostas à concentração sub-letal de 1000 µg/mL de α -Ag₂WO₄. Foram visualizadas as micrografias em menores e maiores ampliações, porém não foram possíveis verificar nem uma célula bacteriana das cepas EHEC e EPEC (Figura 15g e 16k). Apenas foram observados uma morfologia mucoide que envelopa os microcristais, esse comportamento explique a ação diferenciada de α -Ag₂WO₄ sobre EHEC e EPEC. Nas demais cepas é encontrado uma quantidade muito pequena de células, comparado aos controles de crescimento celular. Também foram observados o encurtamento das células bacteriana indicando que as *E. coli* não foram capaz de crescer até o comprimento máximo. Porém contra à cepa ETEC LT, algumas células parecem como se estivesse secando e várias ondulações (FIGURA 15c). Nas imagens obtidas com maior ampliação contra as três cepas EAEC, EIEC e *E. coli* não diarréia observou-se o microcristal aderido às superfícies das células bacterianas e esse comportamento pode justificar a atuação do α -Ag₂WO₄.

Figura15 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra *Escherichia coli*



Nota: *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) não tratada (a) tratada com α -Ag₂WO₄ (b); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) não tratada (e) tratada com α -Ag₂WO₄ (f); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) não tratada (c) tratada com α -Ag₂WO₄ (d); *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) não tratada (g) e tratada com α -Ag₂WO₄ (h).

Figura 16 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra *Escherichia coli*

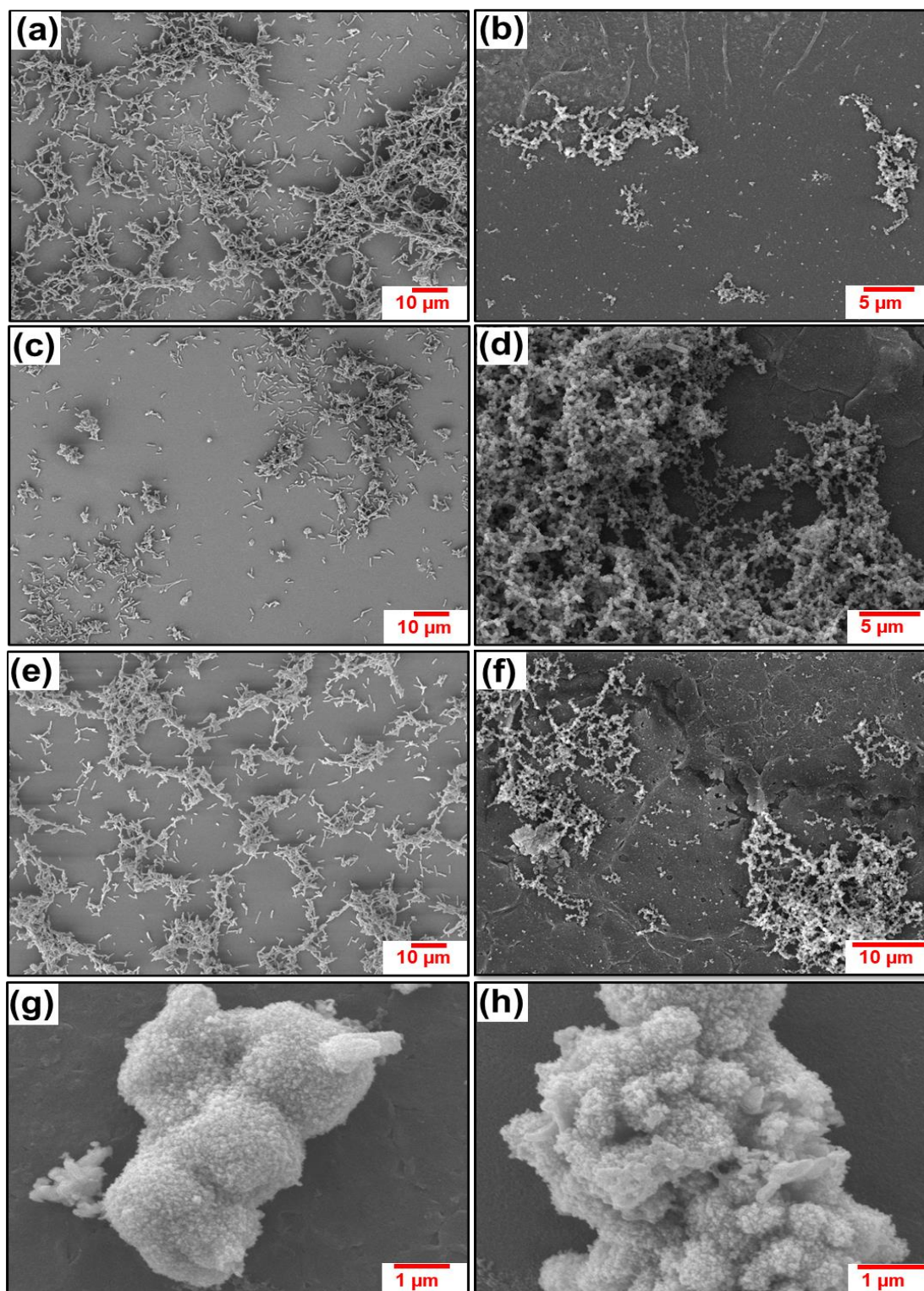


Nota: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) não tratada (i) tratada com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (j); *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) não tratada (k) tratada com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (l); *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) não tratada (m) tratada com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (n); *Escherichia coli* não diarreiogênica não tratada (o) e tratada com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (p).

Ao submeter às cepas de *P. aeruginosa* na concentração sub-letal de α - Ag_2WO_4 é possível verificar nas imagens com menor ampliação as cepas de *P. aeruginosa* (INCQS 00386) e *P. aeruginosa* (INCQS 00313) uma quantidade muito pequena de células bacterianas (FIGURA 17c e 17e), comparado aos controles de crescimento bacteriano (FIGURA 17d e 17f). Porém contra a cepa *P. aeruginosa* (ATCC 15442) não foi possível verificar nem uma célula, confirmando os resultados dos ensaios de ação microbicide (FIGURA 17a). As imagens obtidas com maior ampliação contra as cepas de *Pseudomonas* verificou-se que as três cepas apresentaram uma morfologia mucóide que envelopa os microcristais, esse comportamento talvez explique a ação diferenciada de α - Ag_2WO_4 contra as cepas de *Pseudomonas*, pois o semicondutor α - Ag_2WO_4 tem a finalidade de atrair os microrganismos, sem ser detectado e as nanopartículas de prata neutralizam e prende à bactéria levando morte (Assis et al., 2019; Blosi et al., 2021).

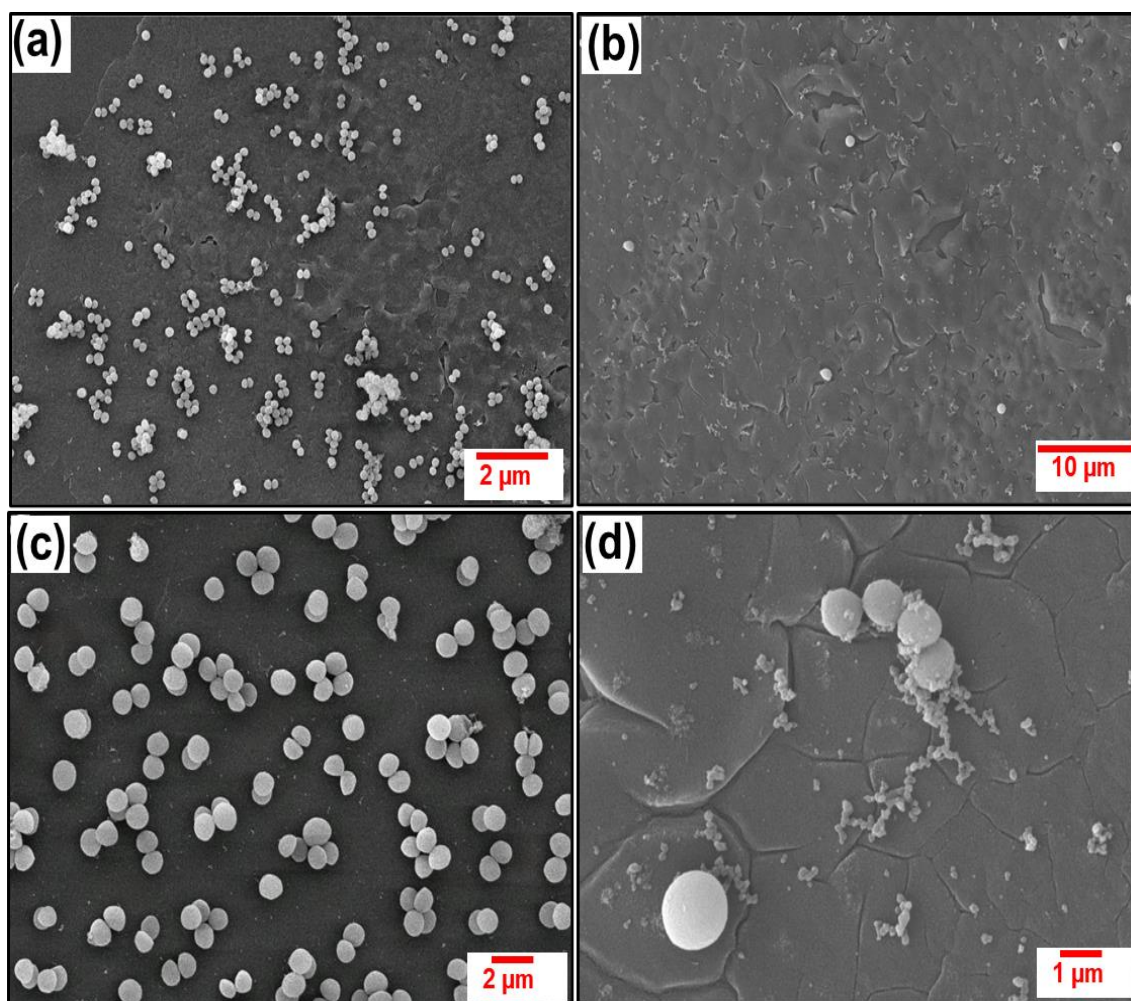
Já em relação as cepas de *S. aureus*, não foi possível verificar a presença de células bacterianas (FIGURA 18a). Já contra a MRSA verificou uma quantidade muito pequena de células (FIGURA 18c).

Figura 17 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas, contra *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: *P. aeruginosa* (ATCC 15442) não tratada (a) tratada com α -Ag₂WO₄ (b); *P. aeruginosa* (INCQS 00386) não tratada (c) tratada com α -Ag₂WO₄ (d) e *P. aeruginosa* (INCQS 00313) não tratada (e) e tratada com α -Ag₂WO₄ (f).

Figura 18 - Micrografias eletrônicas de varredura do efeito antibacteriano de tungstato de prata (α -Ag₂WO₄) exposta à concentração sub-letal de 1000 μ g/mL por 3 horas, contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina



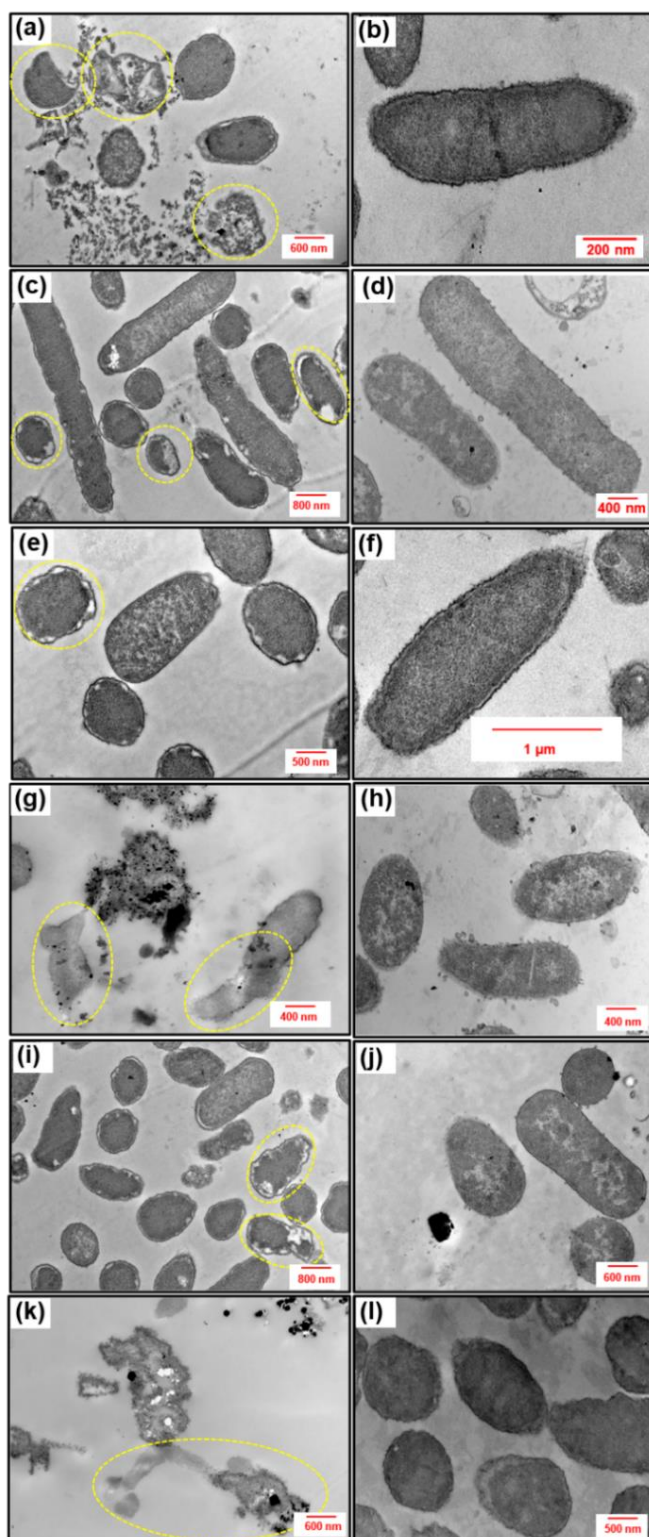
Nota: *Staphylococcus aureus* não tratada (a) tratada com α -Ag₂WO₄ (b) e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina não tratada (c) tratada com α -Ag₂WO₄ (d).

7.5. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises por microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas, a fim de verificar possíveis alterações morfológicas nas células tratadas numa concentração sub-letal de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

A adição de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, exerceu um efeito semelhante nas células para os oito patótipos de *E. coli* (FIGURA 19). No imageamento das células de *E. coli* obtida em maior ampliação mostra detalhes de uma estrutura interna em decomposição, fazendo com que o material citoplasmático seja liberado para o meio extracelular (FIGURA 19a, 19g e 19k), esses comportamentos foram observados nas oito cepas de *E. coli*. Outras alterações também são vistas em todas as células das *E. coli*, como rupturas na membrana plasmática (FIGURA 19a e 19k), desintegração da parede celular (FIGURA 19a), vacúolos (FIGURA 19c, 19e e 19i) diminuição do citoplasma (FIGURA 19i) e várias irregularidades na estrutura da parede (em todas as figuras). Todas as imagens obtidas apresentaram alterações iguais nas células bacterianas de *E. coli*. Esses danos não, são visualizados nos controles das células não tratada (FIGURA 19b, 19d, 19f, 19h, 19j e 19i).

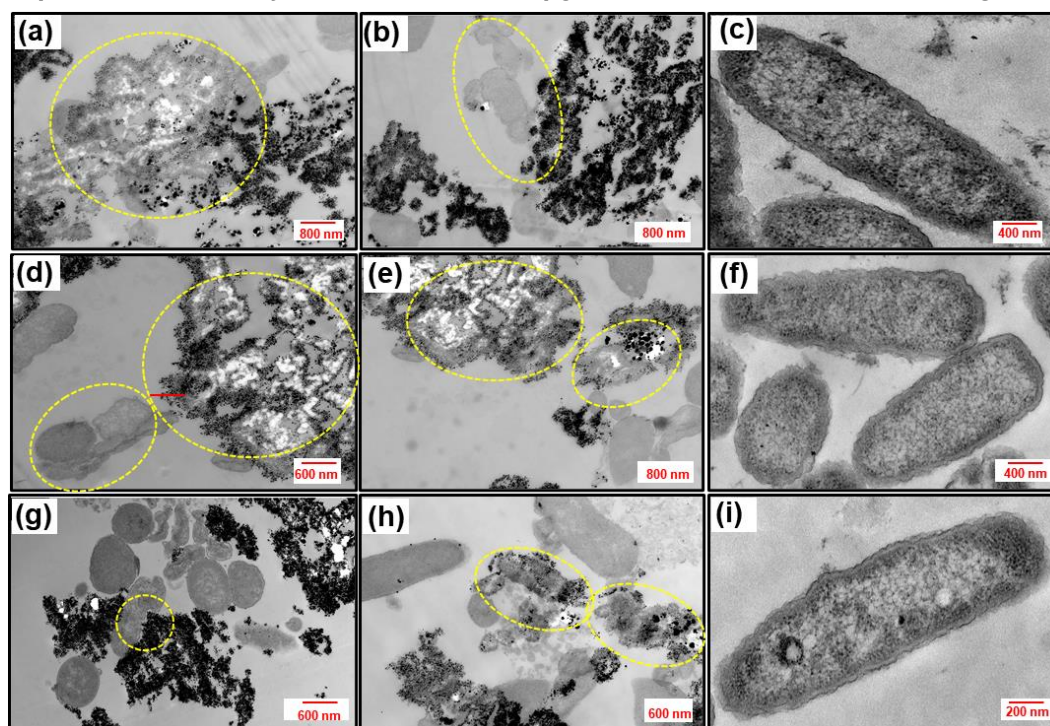
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito de tungstato de prata na concentração sub-letal de 1000 µg/mL por 3 horas contra os oito de *Escherichia coli*



Nota: *Escherichia coli* aderência (DAEC) tratada **(a)** não tratada **(b)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) tratada **(c)** não tratada **(d)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) tratada **(e)** não tratada **(f)**; *Escherichia coli* enteroenvasora (EIEC) tratada **(g)** não tratada **(h)**; *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) tratada **(i)** não tratada **(j)** e *Escherichia coli* não diarreioigênica tratada **(k)** não tratada **(l)**.

Nas micrografias obtidas para as três cepas de *P. aeruginosa* também são vistas diversas alterações morfológicas idênticas. As micrografias obtidas em maior ampliação mostram detalhes da destruição de *P. aeruginosa* em contato direto com o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, não sendo possível visualizar com nitidez as células de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *P. aeruginosa* (INCQS 00386) (FIGURAS 20), os mesmos comportamentos são visualizados nas células de *S. aureus* e MRSA (FIGURAS 21a e 21h). Também foram visualizados em algumas células visíveis nas três cepas de *P. aeruginosa* a desintegração da parede celular e várias irregularidades (FIGURAS 20b, 20d e 20h). Dentre as três espécies de *Pseudomonas*, foram vistas células mais intactas na cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00313), uma das cepas que produz o pigmento pioverdina, que são isolados de maior interesse clínico. Fica evidente a eficácia de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ tanto em cepas que produzem o pigmento pioverdina (verde) como isolados que produzem o pigmento piomelanina (marrom), ambos são identificados na maioria dos isolados clínicos e que tem maior ocorrência de resistência aos antimicrobianos.

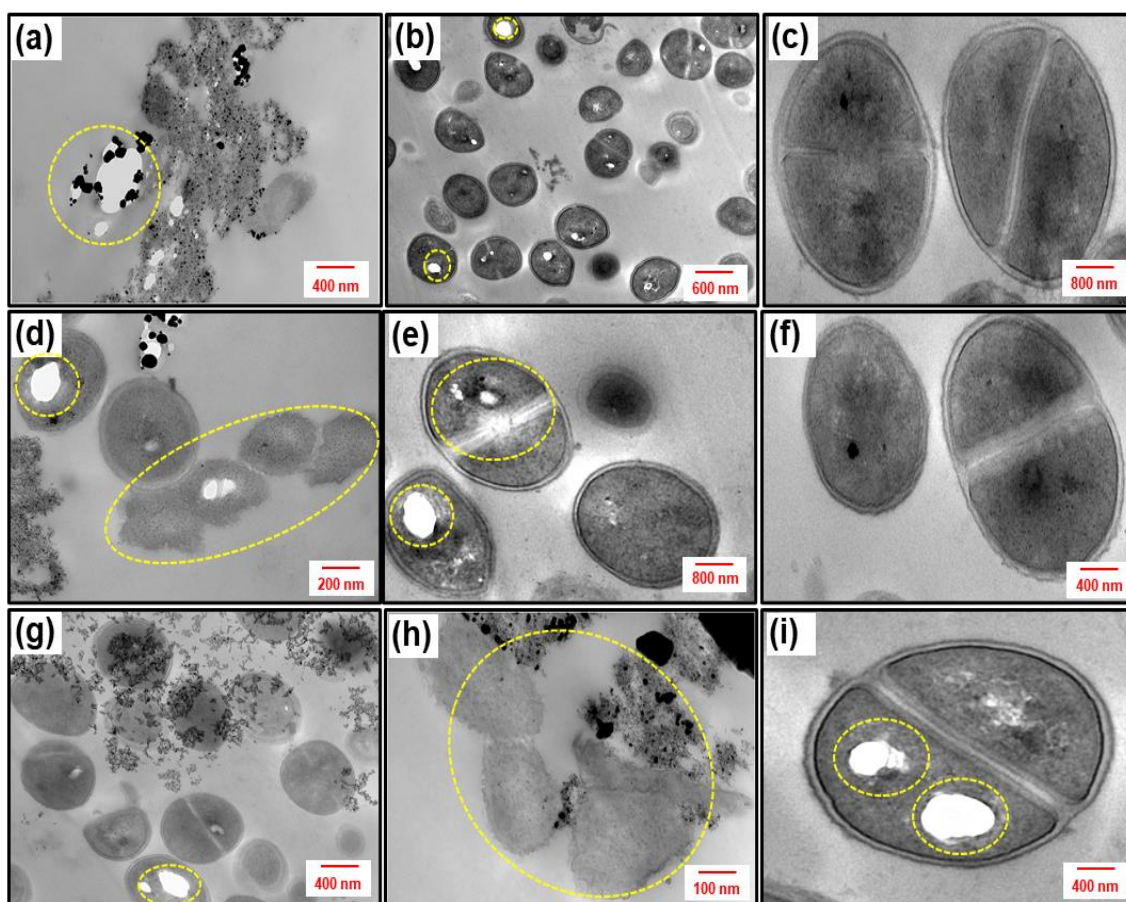
Figura 20 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito de tungstato de prata exposto à concentração sub-letal de 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Pseudomonas aeruginosa*



Legenda: *P. aeruginosa* (ATCC 15442) tratada (a - b) não tratada (c); *P. aeruginosa* (INCQS 00386) tratada (d - e) não tratada (f) e *P. aeruginosa* (INCQS 00313) tratada (g - h) não tratada (i).

Além da destruição total de algumas células de *S. aureus* e MRSA, também foram vistos grande vacúolos em forma de buracos tanto na região do citoplasma da *S. aureus* e MRSA, demonstrando que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ em contato direto causa a destruição total das células bacterianas. Assim como foram visualizadas irregularidades (Figuras 21b e 21g) e desintegração nas simetrias que ocasiona o estouro da parede (Figuras 21a, 21d e 21h), não permitindo que ocorra a divisão celular, esse comportamento é visto como possível alvo de ação antimicrobiana, já que alguns antibióticos atuam na síntese do peptidoglicano.

Figura 21 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito antibacteriano de tungstato de prata exposta à concentração sub-letal de 1000 $\mu\text{g/mL}$ por 3 horas, contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina



Legenda: *Staphylococcus aureus* tratada (a - b) não tratada (c); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina tratada (d - e) não tratada (f); Comportamento observado nas duas cepas (g - h - i).

Os diferentes mecanismos de ação $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ encontrados no presente estudo demonstram que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ atua em diferentes locais das cepas patogênicas de *E. coli*, *P. aeruginosa* como nas cepas de *S. aureus* e MRSA.

Os resultados encontrados frente às cepas de *P. aeruginosa* podem possibilitar várias aplicações tendo em vista que as *P. aeruginosa* possuem permeabilidade restrita da membrana aos diversos tratamentos (Kakoullis et al., 2021). Como no caso dos antibióticos que ao tratar as infecções causada por *P. aeruginosa* estão sujeitos a bomba de efluxo, enzimas inativadoras de antibióticos, como também por meio da aquisição de mutações, levando a deficiência nas porinas que reduzem ainda mais sua permeabilidade (Kakoullis et al., 2021).

Os resultados obtidos contra as cepas de *S. aureus* e MRSA, também são de extrema relevância, tendo em vista que as *S. aureus* em termos de resistência aos antibióticos, já foi descrito a sua capacidade de desenvolver mecanismos de resistência a quase todos os antibióticos usados nos tratamentos (Kakoullis et al., 2021). Assim como também a MRSA que é uma cepa proveniente de *S. aureus* resistente a todos os β -lactâmicos (Kakoullis et al., 2021).

7.6. Viabilidade e citotoxicidade células não cancerígenas

O $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foi submetido ao teste de citotoxicidade e viabilidade celular frente às linhagens normais MRC5 e VERO, com o intuito de verificar a segurança da amostra no uso farmacológico, a fim de verificar se as concentrações em estudo podem causar toxicidade nas células (ABDUL et al., 2014).

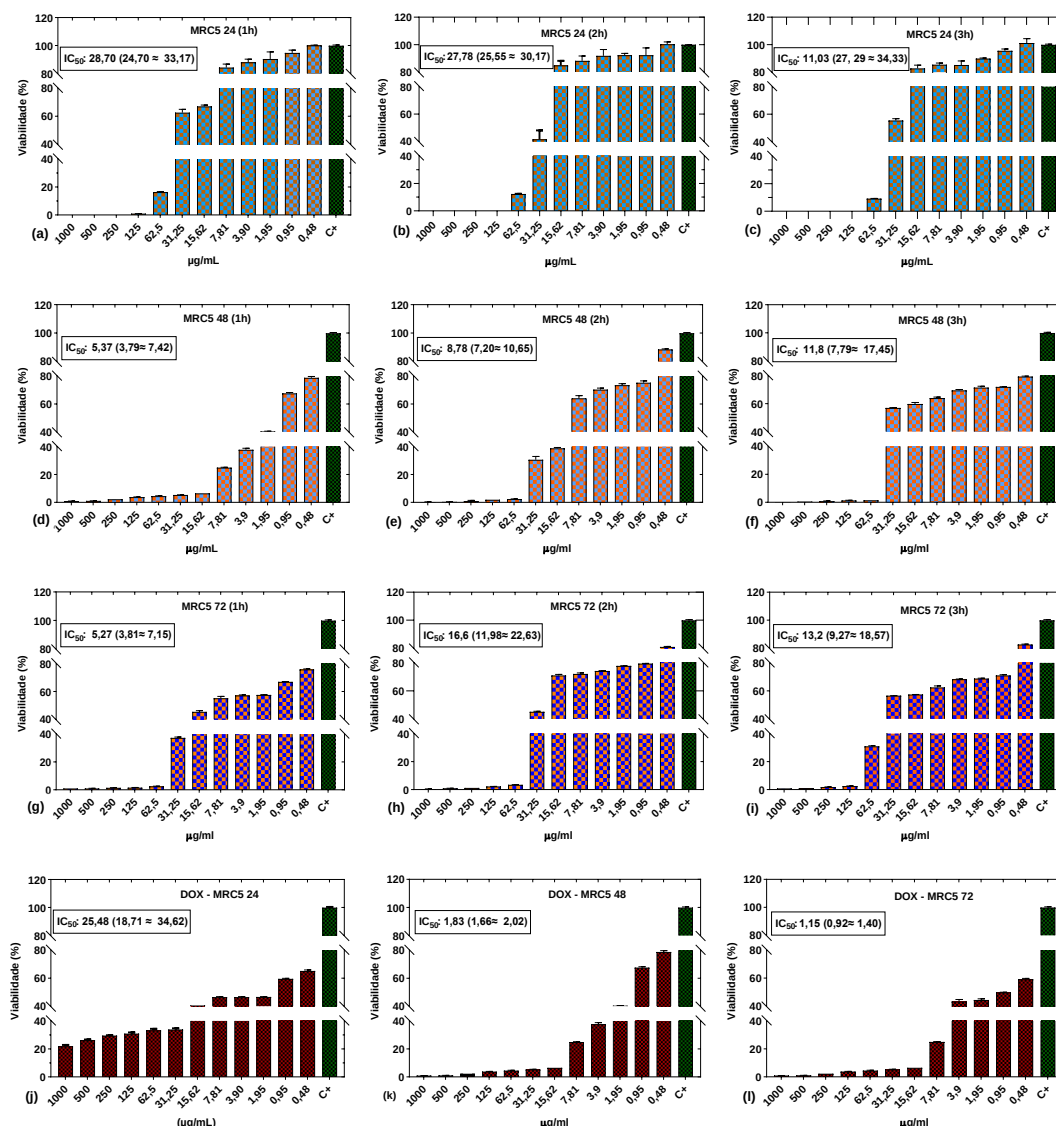
Na Figura 22 estão representadas as viabilidades em comparação a 100% em relação ao controle de células nos três períodos de tempos 24, 48 e 72 horas, também foi proposto a leitura em três intervalos de tempo (1, 2 e 3 horas), como forma de padronizar o melhor tempo de metabolização celular, frente a esse material. Outro critério adotado foi mensurar a fluorescência natural do microcristal, visto que algumas substâncias possuem fluorescência natural, que podem interferir no resultado, apresentando uma viabilidade falsamente positiva.

Seguindo os critérios mencionados acima, quando avaliada a viabilidade e toxicidade do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ frente a célula MRC5 no período de 24, 48 e 72 horas, verificou-se uma elevada toxicidade nas concentrações de 1000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$

nos três períodos. É possível observar de forma mais detalhada, que em 24 horas nos três tempos apresentou média de viabilidade de (0,83%, 0,30% e 0,13%) e toxicidade de (99,16%, 99,69% e 99,86%) na concentração inicial de 1000 µg/mL, superior ao controle de droga (FIGURA 22a a 22f).

No tempo de 48 horas, as leituras realizadas em 1, 2 e 3 horas apresentaram médias de viabilidade de (0,23%, 0,30% e 0,13%) e toxicidade de (99,76%, 99,69% e 99,86%) na concentração inicial de 1000 µg/mL, esse comportamento foram similares até a concentração de 62,5 µg/mL. Ao avaliar estatisticamente observa que entre as concentrações de 1000 a 125 µg/mL nas leituras de 2 e 3 horas não foram significativos, apresentando ($P < 0,9972$ a $P < 0,8140$). Houve diferença estatística quando avaliado de 1000 e 500 versus 62,5 µg/mL ($P < 0,0064$). Também não houve diferença estatística nas concentrações de (0,95 vs. 1,95 µg/mL) e (1,95 vs. 3,90 µg/mL) com ($P < 0,2939$) nas três leituras de 48 horas. Dentre as três leituras realizadas no período de 48 horas, houve diferença estatística na leitura realizada em 1 hora com ($P < 0,0004$ a $P < 0,0001$) nas concentrações mais altas (FIGURA 22d). Essa diferença estatística pode está associada ao processo de metabolização do alamar blue, sendo necessário um tempo maior para que o reagente seja metabolizado por enzimas mitocondriais presentes no citoplasma e conseqüentemente ocorra as diferenças entre as células viáveis a não viáveis. No período de 72 horas contra MRC5 os resultados são similares ao de 48 horas, ocorrendo pequenas diferenças nas três leituras. Como é possível verificar na (FIGURA 22g, 22h e 22i), as médias de viabilidade nas três leituras foram de (0,96%, 0,41% e 0,88%) e a toxicidade de (99,03%, 99,58 e 99,11%) na concentração inicial de 1000 µg/mL.

Figura 22 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata, frente a célula de fibroblasto de pulmão humanos (MRC5) nos tempos de 24, 48 e 72 horas



Nota: Doxorubicina (DOX)

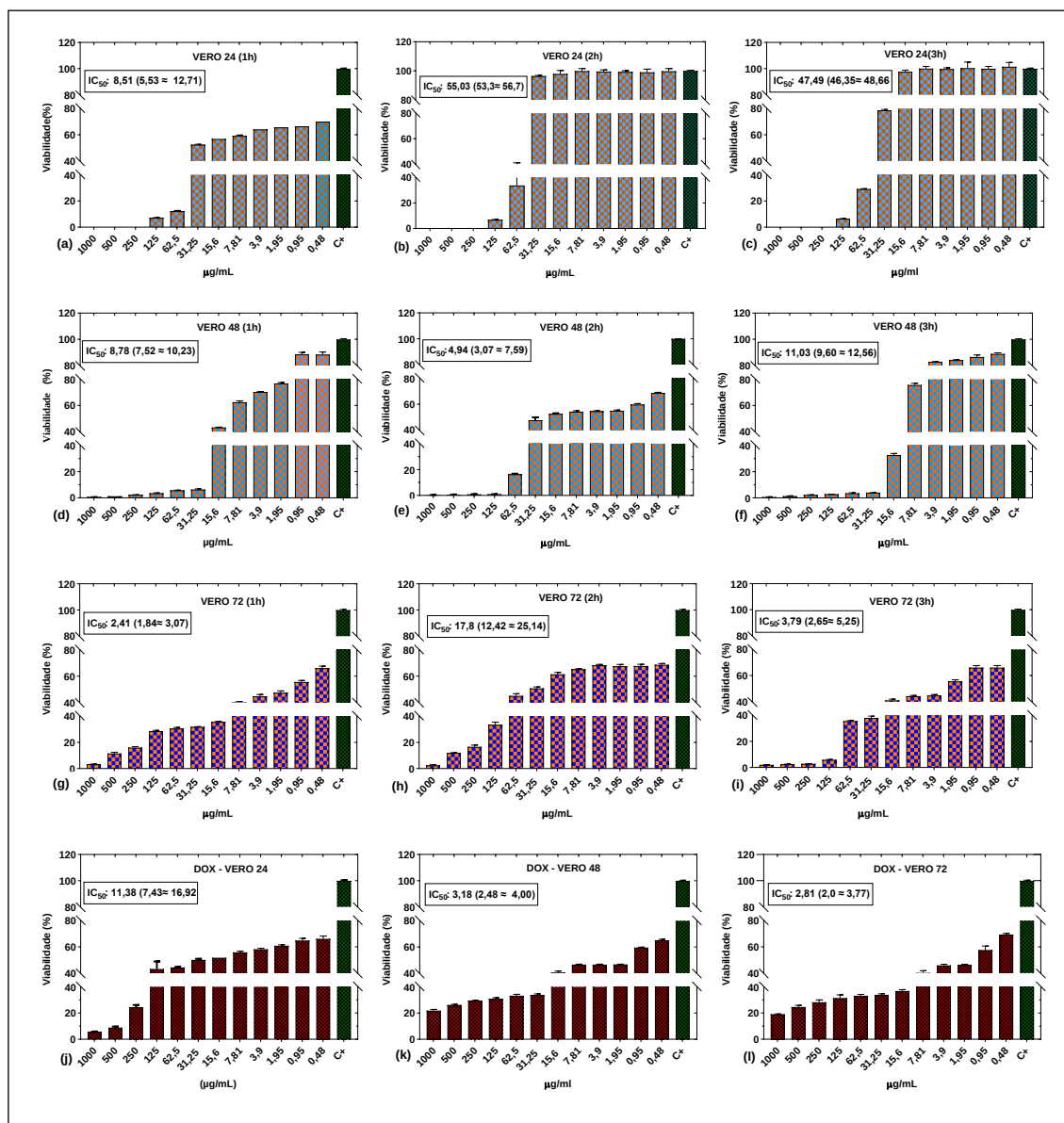
Essa toxicidade abaixo de 50% se mantém para ambos os tempos e intervalos de leitura até a concentração de 62,5 µg/mL, a partir da concentração de 31,25 µg/mL ocorre um aumento na viabilidade, ultrapassando os 50% ($P < 0,0001$). Também não houve diferença estatística nas três leituras nas concentrações de 1000 a 125 µg/mL ($P < 0,9598$ a 0,2852). As medias finais na concentração de 0,48 µg/mL nas três leituras no tempo de 24 e 48 horas se mantiveram entre (100%, 99,9% e 99%) e (88,41%, 68,74% e 73,36%), no tempo de 72 horas foram de (75,94%, 80,92% e 69,56 %).

Quando avaliadas a viabilidade do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ frente a célula VERO, conforme demonstrado na Figura 23, observa-se algumas diferenças, porém a elevada toxicidade também é observada nas concentrações de 1000 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$, semelhante a célula MRC5, com médias de viabilidades nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de (0,71%, 0,28% e 0,60%) e toxicidade de (99,28%, 99,71 e 99,39) respectivamente. A partir da concentração de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ as médias de viabilidade ultrapassam 50% no período de 24 horas, chegando à viabilidade na concentração final de 0,48 $\mu\text{g/mL}$ entre (88,41%, 68,74% e 73,36) (FIGURA 23a).

Ao avaliar estatisticamente, verifica-se que na leitura realizada em 1 hora não foi significativa nas concentrações (250 vs. 500), (125 vs. 250), (125 vs. 500), (31,25 vs. 62,50), (0,95 vs. 1,95), (0,48 vs. 1,95) e (0,48 vs. 0,95) com ($P>0,9999$), nas demais múltiplas correlações apresentou ($P>0,0001$). Assim como na leitura de 2 horas, não há significância nas concentrações de (1000 $\mu\text{g/mL}$ a 15,62 $\mu\text{g/mL}$) e (0,95 vs. 1,95) com $P>0,9999$ (FIGURA 23b). Já na leitura de 3 horas também é observado que não houve diferença significativa em relação a viabilidades nas concentrações de (1000 $\mu\text{g/mL}$ a 31,25 $\mu\text{g/mL}$), (0,95 vs. 1,95), (0,48 vs. 1,95) e (0,48 vs. 0,95), nas demais correlações houve diferença significativa com o valor de $P>0,0001$ (FIGURA 23c). Os resultados obtidos no período de 48 horas demonstram que as médias de viabilidade acima de 50% foram a partir das concentrações de 15,62 $\mu\text{g/mL}$, nas leituras de 1 e 3 horas (FIGURA 23d e 23f). Quando avaliada estatisticamente verifica-se que não significância em relação a viabilidades nas primeiras concentrações, semelhante as leituras de 24 horas.

Já no tempo de 72 horas a viabilidade inicial variaram de (3,34%, 2,57% e 2,11%) e toxicidade de (96,65%, 97,42% e 97,88%) na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 23g). Portanto, nas médias finais na concentração de 0,48 $\mu\text{g/mL}$ variaram de (66,13%, 68,74% e 59,68%). Também ocorreu diferença estatística nas concentrações mais alta com valor de ($P>0,0005$ a $P>0,0001$), não sendo significativo em (31,25 vs. 62,50 $\mu\text{g/mL}$), (31,25 vs. 125 $\mu\text{g/mL}$) e (1,95 vs. 3,90 $\mu\text{g/mL}$) na leitura de 1 hora (FIGURA 23g) e (0,48 vs. 3,90 $\mu\text{g/mL}$), (0,48 vs. 1,95 $\mu\text{g/mL}$) e (0,48 vs. 0,95 $\mu\text{g/mL}$), (0,95 vs. 7,81 $\mu\text{g/mL}$), (0,95 vs. 3,90 $\mu\text{g/mL}$) e (0,95 vs. 1,95 $\mu\text{g/mL}$) na leitura de 2 horas (FIGURA 23h).

Figura 23 - Inibição da toxicidade e viabilidade de tungstato de prata, frente a célula epitelial renal derivada de rins de macaco verde africano (VERO) nos tempos de 24, 48 e 72 horas



Foram determinadas as concentrações inibitórias (IC_{50}) das células em contato com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nos três períodos de tempos (24, 48 e 72 horas), como também nos três intervalos de leituras 1, 2 e 3 horas (TABELA 5). Dentre as leituras realizadas com a célula MRC5, o melhor IC_{50} foram nas leituras de 1 e 2 horas em 24 horas, tendo IC_{50} mínimo de 11,03 $\mu\text{g/mL}$ e máximo de 28,70 $\mu\text{g/mL}$ com intervalos que variaram de (25,55 a 30,17 $\mu\text{g/mL}$) (TABELA 5). Já nas leituras em 48 e 72 horas os melhores IC_{50} , foram nas leituras de 3 e 2 horas, com IC_{50} de 11,82 $\mu\text{g/mL}$ e 16,6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Já em relação ao

controle de droga o IC₅₀ na leitura de 1 hora foi próximo ao observado no período de 24 horas na leitura em 1 hora, porém ocorre uma diminuição na porcentagem de viabilidade nas leituras de 2 e 3 horas (1,83 µg/mL e 1,15 µg/mL) (TABELA 5). Comportamento semelhante foi observado com a célula VERO, que apresentou o melhor IC₅₀ também no período de 24 horas. Na leitura de 72 horas o melhor IC₅₀ foi na leitura de 2 hora com IC₅₀ de 17,8 µg/mL, nas demais leituras apresentou menores IC₅₀ comparado as leituras de 24 e 48 horas (TABELA 5).

Tabela 5 - Valores de IC₅₀ de tungstato de prata(α -Ag₂WO₄), frente a célula de fibroblastos de pulmão humanos (MRC-5) e a célula epitelial renal derivada de rins de macaco verde africano (VERO)

		IC ₅₀ (µg/mL) α -g ₂ WO ₄ (MRC5)		
		24 Hrs	48 hrs	72 hrs
1 hr	28,70 (24,70 a 33,17)	5,37 (3,79 a 7,42)	5,27 (3,81 a 7,15)	
2 hrs	27,78 (25,55 a 30,17)	8,78 (7,20 a 10,65)	16,6 (11,98 a 22,6)	
3 hrs	11,03 (27,29 a 34,33)	11,8 (7,79 a 17,45)	13,2 (9,27 a 18,5)	
DOX	25,48 (18,71 a 34,62)	1,83 (1,66 a 2,02)	1,15 (0,92 a 1,40)	
		α -g ₂ WO ₄ (VERO)		
1 hr	8,51 (5,53 a 12,71)	8,78 (7,52 a 10,23)	2,41 (1,84 a 3,07)	
2 hrs	55,03 (53,3 a 56,7)	4,94 (3,07 a 7,59)	17,8 (12,42 a 25,14)	
3 hrs	47,49 (46,35 a 48,66)	11,03 (9,60 a 12,56)	3,79 (2,65 a 5,25)	
DOX	11,38 (7,43 a 16,92)	3,18 (2,48 a 4,00)	2,81 (2,02 a 3,77)	

Legenda: Doxorubicina (DOX) e Horas (Hrs)

Ainda são escassos estudos com as células normais MRC5 e VERO envolvendo o α -Ag₂WO₄, no entanto os resultados obtidos com as células apresentam comportamento diferenciado de acordo com o tempo de exposição e período de metabolização, esse comportamento se assemelha aos resultados obtidos por Pereira et al (2022) que avaliou os compósitos de quitosana com α -Ag₂WO₄ em célula de NOK-si (queratinócitos orais normais espontâneos imortalizados) e o mesmo verificou que após 24 horas de contato houve diferença estatística entre as concentrações testadas e um comportamento não linear, assim como apresenta uma porcentagem de viabilidade maior que 50% a partir da concentração de 15,62 µg/mL, semelhante ao observado em diferentes intervalos do presente estudo. Assis et al., (2019) analisou o efeito citotóxico de

α -Ag₂WO₄ irradiado em célula não cancerígena BALB/3T3 pelo método de alamar blue, e ele verificou que a célula apresentou viabilidade de 80% e 95% quando exposta as concentrações de 11,58 µg/mL e 4,63 µg/mL, porém nas maiores concentrações de 46,31 µg/mL e 23,16 µg/mL observa altas porcentagens de citotoxicidade com as diferentes amostras de α -Ag₂WO₄.

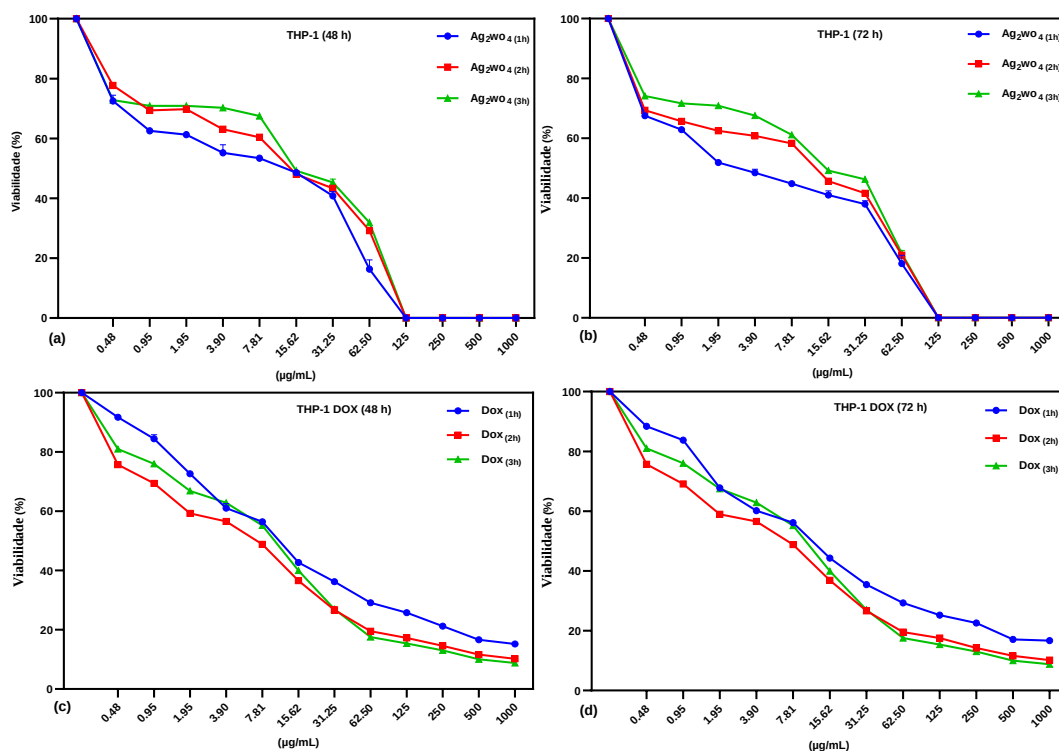
Ao correlacionar os resultados bacterianos e viabilidade celular, é possível verificar que o α -Ag₂WO₄ inibiu alto potencial antibacteriano contra as cepas de *E. coli* *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA com CIMs que variaram de 62,5 µg/mL para *P. aeruginosa* e 7,81 µg/mL para *E. coli* (EAEC). Com isto, determinar o índice de IC₅₀ do microcristal é de suma importância para verificar se o potencial antimicrobiano é superior a toxicidade. Logo é possível observar que o α -Ag₂WO₄ apresentou toxicidade superior na maioria dos intervalos de leitura, comparado as CIMs encontrada frente as bactérias em estudo, demonstrando uma alta taxa de toxicidade entre as concentrações de 1000 a 31,25 µg/mL. Apenas é observado o potencial antimicrobiano superior a toxicidade apenas contra as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* INCQS 0386, *P. aeruginosa* INCQS 0313, *S. aureus* e MRSA, com exceção de *E. coli* (ETEC-ST) e *P. aeruginosa* ATCC 15442 que apresentaram CIMs de 62,5 µg/mL respectivamente.

7.7. Viabilidade e citotoxicidade células cancerígenas

Ao avaliar a viabilidade e citotoxicidade da célula THP-1 nos tempos de 48 e 72 horas, seguindo os mesmos critérios utilizado com as células MRC-5 e VERO. Notou-se uma toxicidade de 100% nas concentrações de 1000 a 125 µg/mL tanto no tempo de 48 como em 72 horas nas três leituras (FIGURA 24a e 24b), assim como não houve diferença estatística ($P > 0,9999$). Essa toxicidade foi maior que o controle de droga nas primeiras concentrações. A porcentagem de viabilidade de 50% ocorreu a partir da concentração de 7,81 µg/mL ($P > 0,0001$) em todas as correlações no tempo de 48 horas. As porcentagens finais de viabilidade nos três intervalos foram (71,52%, 77,37% e 72, 84%). Já no tempo de 72 horas a porcentagem de viabilidade acima de 50% foi observada a partir da concentração de 1,95 µg/mL na leitura de 1 hora e nas leituras de 2 e 3 horas foi a partir da concentração de 7,81 µg/mL, respectivamente com ($P > 0,0001$). Na leitura de 3 horas não foi significativo, apenas nas concentrações de (0,48 vs. 1,95) e (0,48

vs. 3,90) que apresentou significância e teve médias finais na concentração de 0,48 µg/mL de (67,60%, 69,15% e 73, 72%).

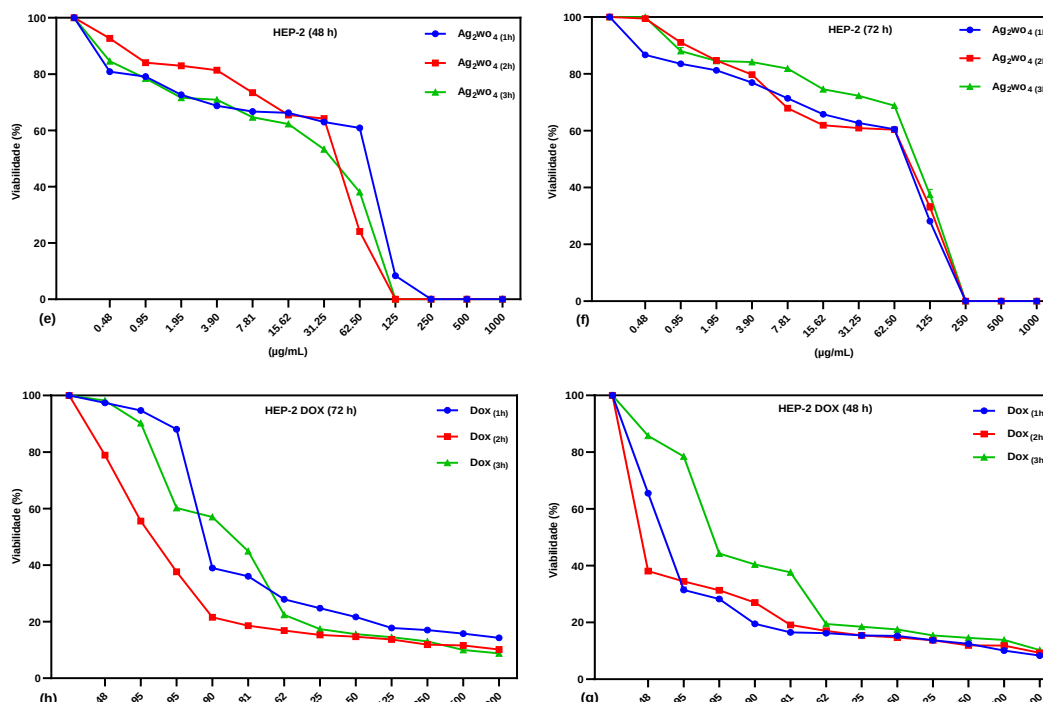
Figura 24 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$), frente a célula de monócito de sangue periférico humano (THP-1) nos tempos de 48 e 72 horas



Ao analisar a célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) verifica algumas diferenças em comparação com a célula de sangue periférico (THP-1). Que houve uma toxicidade de 100% até a concentração 250 µg/mL no tempo de 72 horas (FIGURA 25b), assim como não houve diferença estatística ($P > 0,9999$), e não houve significância nas correlações de (31,25 vs. 62,50 µg/mL) na leitura de 2 horas e nas correlações de (1,95 vs. 3,90 µg/mL) em 3 horas. No período de 48 horas apresentou uma toxicidade de 100% até a concentração 250 µg/mL apenas na leitura de 1 hora, já nas leituras de 2 e 3 horas a toxicidade de 100% foi até a concentração de 125 µg/mL ($P > 0,9999$). A porcentagem de viabilidade acima de 50% foi observada a partir da concentração de 31,25 µg/mL nos três intervalos, no tempo de 48 horas ($P > 0,0001$), e apresentou médias de viabilidade finais de (81,72%, 92,68% e 85,06%). Ao analisar às células no tempo de 72 horas a porcentagem de viabilidade acima de 50% foi na concentração de 62,50 µg/mL nas três leituras com ($P > 0,0001$), e chegando a 100% a

porcentagens das médias finais na concentração de 0,48 µg/mL. Entre as correlações não houve significância entre (15,62 vs. 31,25 µg/mL) e (15,62 vs. 62,50 µg/mL) na leitura realizada em 2 horas e nas correlações de (1,95 vs. 3,90) em 3 horas.

Figura 25 - Inibição da toxicidade e viabilidade de Tungstato de Prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$), contra a célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) nos tempos de 48 e 72



Também foram determinadas o IC_{50} nos dois períodos de tempos e intervalos (TABELA 6). O melhor IC_{50} de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na célula HEp-2 no período de 48 horas foram nas leituras de 1 e 2 horas com IC_{50} 24,6 µg/mL obtido na leitura de 2 horas e 23,4 µg/mL na leitura de 1 hora (TABELA 6). Portanto os melhores IC_{50} foram no tempo de 72 horas nas três leituras, porém o maior IC_{50} foi encontrado foi na leitura de 3 horas (63,8 µg/mL). Já em relação ao controle de droga os IC_{50} foram muito menores comparado $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (TABELA 6). Em relação aos IC_{50} obtidos frente a célula THP-1, os melhores IC_{50} encontrados foi de 11 µg/mL na leitura de 3 horas em 48 horas e de 9,5 µg/mL na leitura de 3 hora no tempo de 72 horas e de 11,0 µg/mL em 48 horas (TABELA 6).

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ de tungstato de prata(α -Ag₂WO₄), frente célula do epiteloma de laringe humano (HEp-2) e a célula de monócito de sangue periférico humano (THP-1)

	IC ₅₀ (µg/mL) α -g ₂ WO ₄ (HEP-2)		IC ₅₀ (µg/mL) α -g ₂ WO ₄ (THP-1)	
	48 hrs	72 hrs	48 hrs	72 hrs
1 hr	23,4 (14,9 a 35,9)	34,4 (24,8 a 47,1)	5,3 (3,8 a 7,3)	3,3 (2,4 a 4,4)
2 hrs	24,6 (9,3 a 31,1)	35,8 (26,9 a 47,3)	8,9 (6,6 a 11,8)	6,2 (4,4 a 8,6)
3 hrs	16,2 (11,8 a 22,1)	63,8 (48,4 a 82,6)	11,0 (7,8 a 15,3)	9,5 (7,0 a 12,8)
DOX	1,3 (0,9 a 1,6)	5,64 (4,68 a 6,8)	5,19 (4,6 a 5,8)	5,1 (4,6 a 5,5)

Nota: Doxorubicina (DOX) e Horas (Hrs)

Nos estudos realizados por Assis et al., (2019) foi analisado a viabilidade frente à linhagem celular de MB49 (carcinoma de bexiga de camundongo), expostas por 24 horas em contato com diferentes amostras de α -Ag₂WO₄, que apresentou de 10% a 50 % de viabilidade celular em comparação com controle célula.

Os estudos *in vitro* foram cruciais para a compreensão e aplicação desse material nos diversos campos, possibilitando avaliar danos em células saudáveis e contribuiu nas descobertas de novas substâncias e materiais bioativos (Andreghetto et al., 2011; Assis et al., 2019; Pereira et al., 2022). Além de permitir uma análise do comportamento da célula em processos biológicos, semelhante ao *in vivo*, assim como permitiu obter qualidade nas triagens iniciais de drogas e melhor reprodutibilidade (Andreghetto et al., 2011). Esses mesmos critérios são utilizados em células não cancerígenas, tendo em vistas que muitas pesquisas utilizam como modelos para o estudo de mecanismos moleculares de diversas doenças, em particular, nos estudos de tratamento de câncer (Andreghetto et al., 2011).

CAPÍTULO 3

8. MEMBRANAS POLIMÉRICAS OBTIDA PARTIR DA ELETROFIAÇÃO DO PCL E FUNCIONALIZADA COM TUNGSTATO DE PRATA (α -Ag₂WO₄)

8.1. ELETROFIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Os ensaios de eletrofiação foram realizados no Laboratório do grupo de pesquisa de Bioeletrônica e Eletroanalítica, Dispositivos Fotovoltaicos e Químico de Materiais (LABEL) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

8.1.1. Preparo e parâmetros de solução de policaprolactona (PCL)

Após a obtenção e caracterização de tungstato de prata, foi realizada a padronização do preparo e parâmetros de soluções poliméricas de PCL. Inicialmente foram pesados 1,58g dos seguintes reagentes, clorofórmio (Sigma-Aldrich, pureza > 99%) que foi utilizado como solventes de solubilização do polímero de PCL e acetona (Sigma-Aldrich, pureza > 99.5%) que foi utilizada para promover maior rapidez na evaporação dos solventes durante o processo de eletrofiação.

Em seguida foi pesado 0,500g de policaprolactona (PCL) em pellets (Sigma-Aldrich, pureza > 99%) em uma balança analítica (Marca Mettler Toledo - Modelo AB204), tendo uma proporção de 1:1 em massa de solventes. Após a pesagem, as soluções de solventes ficaram por um período de 15 minutos em um agitador magnético (Marca Nova ética - Modelo 113). Ainda sob agitação adicionou-se a PCL por mais 15 minutos até a solubilização total.

8.1.2. Proporção de α -Ag₂WO₄ na solução polimérica de PCL

Para a padronização de α -Ag₂WO₄, foi realizado um estudo variando a quantidade em massa para verificar a influência na morfologia e posterior caracterização, visando uma maior quantidade sem defeitos. Após a padronização inicial das concentrações de α -Ag₂WO₄ na solução polimérica de PCL, foram realizados cinco ensaios de eletrofiação em diferentes proporções (1:1, 0,75:1, 0,50:1, 0,25:1 e 0,1:1) de α -Ag₂WO₄ na matriz polimérica do PCL. Além disso, houve a eletrofiação dos grupos controles, neste caso, a droga imipeném + cilastatina sódica (TIENAM), ceftriaxona (CRO) e oxalina (OXA), em uma proporção em massa de 1:1 dos solventes. A mistura do polímero com o

óxido ocorreu inicialmente pela solubilização da PCL, e ainda sob agitação, foi adicionado as respectivas quantidades do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ que permaneceram sob agitação magnética constante por 16 horas.

8.1.3. Os parâmetros de processo para obtenção das membranas

O presente estudo utilizou o sistema de eletrofiação horizontal, com base nesse sistema foram determinados os parâmetros de processo logo após o período de 16 horas de agitação das soluções poliméricas. Após, as soluções foram inseridas, separadamente, em uma seringa de plástico hipodérmica com capacidade de 20 mL e agulha metálica de diâmetro de ($\Theta_{\text{capilar}} = 0,8 \text{ mm}$), que foi acoplada em uma bomba de infusão (Marca Bonther) com vazão volumétrica de ($Q = 100 \text{ a } 130 \mu\text{L/min}$) e distância de trabalho (d_T) entre a ponta da agulha e o coletor metálico foi de ($d_T = 18 \text{ cm}$). Os parâmetros de processo como diâmetro e d_T mantiveram fixos em todos os experimentos.

As fibras foram coletadas em uma placa coletora metálica aterrada de modelo estático, com uma agulha interconectada a uma fonte de alimentação de alta tensão (Marca Faíscas – Modelo FA+30 kV) com capacidade máxima de 30 kV. Em relação a tensão aplicada não foi possível mantê-la fixa, pois variou de (13 a 17,7 kV) e essa estabilização da tensão superficial de cada solução depende da formação do cone de Taylor, assim como a vazão depende da viscosidade de cada solução. Já os parâmetros ambientais como a umidade do ar (%) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), sempre ocorrem variações e dificilmente se mantêm constantes.

8.1.4. Caracterização morfológica das microfibras por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

O imageamento das membranas foi realizado utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (Marca JEOL - Modelo MEV-JSM-IT500HR) do Centro Multiusuário para Análise em Fenômenos Biomédicos (CMABio) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). As membranas foram posicionadas sobre stubs com o uso de uma fita dupla face de carbono, em seguida foram metalizadas com ouro por 4 minutos em um metalizador (marca JEOL Smart Coater). As visualizações das nanofibras foram obtidas utilizando uma aceleração de alta voltagem à 10 kV sob alto vácuo e obtidas as

micrografias em diferentes magnificações (x500, x1000, x7000, x11000, x13000, 17000, x23000 e x30000).

As análises estatísticas dos diâmetros das micrografias obtidas por MEV, foram baseadas no estudo realizado por Moraes (2015). As medições foram feitas manualmente utilizando o *software* processador de Imagem (versão gratuita) e essas contagens foram realizadas conforme as equações 1 e 2 que se baseia na obtenção dos diâmetros médios e desvios padrão, sendo que o valor de (n) corresponde ao número total de 100 medidas e x corresponde ao valor de cada diâmetro (nm). E por fim, os diâmetros das micrografias com os valores máximo, mediana e mínimo foram plotados em histograma para melhor compreensão dos resultados.

$$\overline{Dm} = \frac{(x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n)}{n} \quad (01)$$

$$Dp = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (02)$$

8.1.5. Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)

As análises por 4 Espectroscopia de dispersão de energia (EDS) foram realizadas por microscopia eletrônica de Varredura MEV (Marca VEGA3- TESCAN - Modelo EDS da Oxford), do laboratório Temática de Microscopia Óptica e Eletrônica (LTMOE) do Instituto (INPA), com aceleração de voltagem à 30 kV sob alto vácuo.

8.1.6. Difração de raio X (DRX)

A caracterização estrutural dos materiais obtidos foi realizada por difração de raios X (DRX). As membranas de PCL e PC contendo o α -Ag₂WO₄, foram coletadas por um difratômetro da Marca SHIMADZU, modelo XRD7000 de posse da Central Analítica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Campus Manaus Centro (CMC), que foi operado usando uma fonte de radiação do cobre (CuK α = 1,54056 nm), no intervalo 2 θ de 10 a 80°.

tendo uma velocidade de varredura de 0,05 a 25°C/min 1°s^{-1} , sob corrente 15 mA e tensão de e 3 kV. Também foi realizado o DRX de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro como controle de comparação.

8.1.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O estudo dos modos vibracionais ativos dos materiais, ou seja, PCL, $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e membranas funcionalizadas, se deu pela espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Para estes fins, foi utilizado um espectrômetro de FTIR marca Thermo Scientific, modelo iS20 SMART iTX, equipada com acessório ATR (Attenuated Total Reflection) com cristais de diamante. Para os ensaios as membranas de PCL e PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, que foram homogeneizadas e analisada numa proporção de 1:100 (m/m) prensada em pastilha (disco) translúcida à 80 KN/m² durante 60 segundos. Foram utilizadas 32 varreduras, com resolução de 2 cm⁻¹, e tendo os dados vibracionais coletado nos intervalos de 650 a 1800 cm⁻¹. Também foi realizado de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ como controle para a comparação dos modos ativos na membrana.

8.1.8. Estudo de molhabilidade através do ângulo de contato

Os ensaios de ângulo de contato θ (teta), são medidas quantitativas de umedecimentos que forma a superfície de um líquido em contato com um sólido, ou seja, esse ângulo de umectância é observado por meio do comportamento de uma gota de água em uma superfície por um período tempo (Farias 2021; Ferreira et al., 2022).

Logo a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade das membranas com as diferentes proporções de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e os controles de PCL, PCL + OXA, PCL + TIENAM, PCL + CRO foram determinadas pelas medidas dos ângulos de contato com a água utilizando um microscópio digital (DINO-Lite plus). Inicialmente foi adicionada 10 μL de água destilada sobre as superfícies das membranas por um período de 2 minutos à temperatura ambiente e as medidas dos ângulos de contato foram obtidas com o auxílio do *software* Imagem (versão gratuita), que foi expresso como média aritmética de três medições (Média $\pm$ Desvio padrão - DP).

Para medir a formulação dos ângulos de contato foram utilizados diversos critério bastante difundido na literatura que determina que, valores abaixo de 5° graus em 0,5 segundos após a deposição da gota de água destilada é denominado como um material superhidrofílico, ângulos menores que 90° são caracterizados como hidrofílicos, ângulo igual a 90° e menor que 150° são denominados hidrofóbicos, e por último, materiais com ângulo de contato acima de 150° são considerados superhidrofóbicos (Farias 2021).

8.1.9. Ensaios mecânicos de tração uniaxial

As análises mecânicas foram realizadas baseada com a norma ASTM D882-12 (ASTM, 2012) e obtendo a tensão de ruptura e o alongamento de ruptura das fibras por texturômetro (Stable Microsystems SMD - TA.XT2). Inicialmente foram preparados 10 corpos para cada prova de cada membrana com dimensões 7cmx1cm e foram submetidas à tensão unidirecional à temperatura ambiente, velocidade de 5mm/s e posição inicial de L0 = 4cm.

8.1.10. Análise térmica por meio de termogravimétrica (TGA)

Foram realizadas as análises de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG), com intuito de verificar a estabilidade térmica das membranas. As curvas termogravimétricas das membranas de PC + α -Ag₂WO₄ foram obtidas por meio de um analisador termogravimétrico da (marca Setaram, modelo Setsys Evolution 1750) que possui aquecimento de até 1600°C e faixa de forno <1100°C, resolução 0,1 µg. As medições das membranas foram obtidas na faixa de aquecimento entre 50 e 600°C/min, sob atmosfera de gás nitrogênio (N₂) e tendo uma vazão de 50°C/min. Os ensaios de DSC/TG podem ser efetuados em simultâneo.

8.1.11. Ensaios de Liberação por Espectrofotométrica (UV-Vis)

Os ensaios de liberação das microfibras foram realizados no laboratório da Central Analítica do Departamento de Química (LAEQ) da UFAM. Inicialmente foram analisadas todas as membranas de PCL + α -Ag₂WO₄, assim como o controle PCL e o α -Ag₂WO₄ puro.

As membranas foram cortadas no formato quadrado com largura e comprimento de 20 mm, após foram transferidas para um becker de vidro

contendo 2 mL de água destilada, e foram avaliadas nos intervalos de tempos de (30, 60, 90, 120 minutos). A cada 30 minutos era retirado completamente os 2 mL de cada amostra, em seguida adicionava-se mais 2 mL para a contagem de mais 30 minutos e repetiu-se o processo até o intervalo de 120 minutos. Para leitura da absorbância foi transferido 1 mL para a cubeta e monitorada através da técnica de espectrofotométrica UV-Vis, no equipamento (Modelo EVOLUTION 260 BIO), utilizando a faixa de 800 a 200nm.

8.1.12. Esterilização por ozônio (O₃)

Após a caracterização das microfibras foi necessário realizar a esterilização por ozônio (O₃) com objetivo de eliminar os contaminantes que poderiam influenciar nos ensaios biológicos. O ensaio foi baseado no trabalho realizado pelo grupo (Farias 2021). Para cumprir esse objetivo foi utilizado uma caixa acrílica (Glove-Box), que foi interligado a um gerador de ozônio (Marca Padoxi) que possui uma vazão de (6,5 L/min) e dosagem máxima de (150 ppm), que ao ser ligado a atmosfera interna ficou rica em ozônio. No interior da caixa contém um dessecador com sistema de pressão, que foi higienizado com clorexidina à 2%. Após assepsia as microfibras foram depositadas no interior do dessecador, sendo mantida o controle negativo de pressão interna a (-600 mmHg), para que ocorresse o período de aeração, o O₃ foi injetado na concentração máxima e sempre mantendo o controle da pressão interna até atingimento de (-50 mmHg). Por fim, ainda no interior da caixa, as microfibras foram embaladas e seladas a vácuo utilizando uma seladora de (Marca Registron - Modelo RG -300 A).

8.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS MEMBRANAS

8.2.1. Cepas bacterianas utilizadas

Inicialmente foi realizada uma triagem antimicrobiana para melhor direcionar o estudo, esses resultados foram publicados em 2022 (Tópico 6). Para melhor aprofundamento foi necessário selecionar os melhores resultados obtidos da triagem preliminar, que direcionou para a avaliação da atividade antimicrobiana de onze bactérias Gram-negativas e duas Gram-positivas

(TABELA 7). As cepas bacterianas pertencem ao banco da Plataforma de Bioensaios de compostos biotecnológicos (RPT11H) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/FIOCRUZ) que fica dentro da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT).

Tabela 7 - Descrição das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Grupos	Bactérias	ATCC
Gram negativas	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	BUTANTÃ F1845
	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	INCQS LT 2871
	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	INCQS ST8
	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	CDC EDL 933171
	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	CDC EDL O42
	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica (EPEC)	ATCC E234869
	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	ATCC 1381
	<i>Escherichia coli</i> não diarreio gênica	ATCC 10536
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (pigmento marrom)	INCQS 00313
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (pigmento verde claro)	INCQS 00386
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (pigmento verde fluorescente)	ATCC 15442
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	ATCC 33591

8.2.2. Teste de esterilidade

Os ensaios de esterilidade foram aplicados com intuito de verificar a presença e ausência de microrganismos como bactérias e fungos presentes na membrana. As membranas foram cortadas em forma de discos no tamanho de (10 mm), depois foram transferidas para os meios líquidos de crescimentos bacteriano: Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA), Müller Hinton (MH) (HIMEDIA) e o caldo Sabouraud para fungos. Os tubos contendo 10mL dos respectivos meios foram mantidos sob agitação de (150 rpm) por 72 horas a 37 °C para bactérias e 7 dias a 27 °C para fungos. Após o período de incubação, os meios que apresentavam turbidez demonstravam contaminação por bactéria e fungos. Após o período de incubação foi adicionado 100µL de cada caldo nos meios de placa: ágar macConkey (AMC) (HIMEDIA), *Pseudomonas* ágar (PIA) (BD); Ágar sangue (AS) (HIMEDIA) e MH para bactérias e ágar Sabouraud para

fungos, e incubou-se na estufa bacteriológica a 37 °C por 72 horas para bactérias e 7 dias a 27 °C para fungos.

8.2.3. Crescimento e padronização dos inóculos bacterianos

As cepas foram cultivadas previamente em 5 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), que ficou por 24 horas a 37 °C em agitação a (150 rpm) em uma incubadora refrigerada (Marca SOLAB – Modelo SL - 221). Para verificação da pureza dos isolados, as oito cepas de *E. coli* foram isoladas no meio ágar macConkey (AMC), *Pseudomonas* ágar (PIA) para *P. aeruginosa* e Ágar sangue (AS) (HIMEDIA) para *S. aureus* e MRSA e incubou-se na estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após o isolamento e confirmação da pureza bacteriana, selecionou-se uma colônia pura de cada bactéria e adicionou-se novamente em um novo caldo BHI que ficou por 24 horas a 37 °C em agitação.

Para a concentração final das culturas microbianas, foram ajustadas a ($1,5 \times 10^8$ UFC mL) no espectrofotômetro UV-Visível (Marca Shimadzu – UV 1800), com um comprimento de onda a 600nm e a calibração da transmitância em 100%.

8.2.4. Ensaios de Susceptibilidade (Kirby-Bauer)

O método é utilizado para mensurar a resistência e susceptibilidade de bactéria em contato com uma substância por meio da formação de um halo de inibição, demonstrando sensibilidade à droga (Bauer et al., 1966). Utilizou-se o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (AMH) (HIMEDIA) para a realização dos testes em placas. Após o preparo do AMH, foi destruído 20 mL em placas de vidro de 150 x 20 mm, em seguida as placas foram mantidas em temperatura ambiente por volta de 30 minutos até a solidificação total do meio. Após a padronização do inóculo, foi inserido um swab estéril em cada um dos diferentes tubos contendo os diferentes inóculos. Em seguida os microrganismos alvos foram semeados em toda a superfície da placa em três direções, girando a placa aproximadamente 60° com o objetivo de assegurar distribuição uniforme do inóculo bacteriano. Posteriormente, foram adicionadas nas superfícies do AMH as membranas com diâmetros de 10 mm, também foram adicionados os controles positivos ceftriaxona para (*E. coli*), imipeném + cilastatina sódica (TIENTAM) para (*P. aeruginosa*) e oxacilina para (*S. aureus* e MRSA). As placas

foram incubadas na estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas, decorrido o período de incubação foi feita a medição dos halos de inibição. Vale ressaltar que também foram realizados os ensaios pilotos das membranas esterilizadas e não esterilizadas com objetivo de verificar se a utilização do ozônio poderia interferir, apresentando inibição. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

8.2.5. Teste de ação Microbicida e Microbiostático

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Bastos et al., (2015), com modificações. Os cultivos e padronização dos inóculos foram realizados conforme mencionado na seção 5.2.1. Inicialmente foram confeccionados os discos de aproximadamente 20 mm das membranas que foram adicionados em uma placa de 6 poços, contendo um volume de 5 mL de BHI, na concentração final de 5×10^5 UFC/mL. Logo após, as placas foram incubadas a 37 °C, sob agitação de (100 rpm) nos intervalos de (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 h). A cada intervalo, retirou-se 100 mL e foi realizado uma diluição de 1:10 e desta diluição 100 µL foi semeado na superfície da placa de Petri contendo o meio AMH. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação foram realizadas as contagens de colônias. Sendo possível construir uma curva logarítmica, onde o eixo das ordenadas corresponde ao número de UFC/mL em escala logarítmica.

8.2.6. Atividade antibiofilme

Para avaliação da capacidade de interferência das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ sobre os biofilmes em formação foram utilizados os oito patótipos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA, os ensaios foram reproduzidos de acordo com Swolana et al., (2022), com modificações. Os cultivos e padronização dos inóculos foram realizados conforme mencionado no tópico 4.5.3. Após 24 horas de incubação as culturas foram diluídas a 0,1 densidade óptica (DO) para medição da absorbância (620nm) em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu). Os discos de aproximadamente 20mm das membranas de PCL com as diferentes proporções de α -Ag₂WO₄ foram adicionados em uma placa de 24 poços, contendo um volume de 3 mL de BHI, na concentração final de 5×10^5 UFC/mL. As placas foram mantidas por 48 horas (100 rpm, 37 °C).

Após o período de incubação, foram retiradas as suspensões bacterianas e adicionadas em uma nova placa e os poços foram lavados com tampão fosfato (PBS, pH = 7,2) por três vezes para a retirada total das células planctônicas. Em seguida foram corados com 200 μ L cristal violeta 0.1% (INLAB) e exposta por 15 minutos a temperatura ambiente. Após 15 minutos de incubação, os poços foram lavados por mais quatro vezes com água Miliq. Para a diluição do biofilme foi adicionado 200 μ L de etanol a 96%, e por fim, a absorbância foi monitorada no leitor de microplaca (GloMax® Explorer), em um comprimento de ondas de (λ = 570 nm).

8.2.7. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A metodologia adotada foi de acordo com SANTOS et al., (2008). As suspensões bacterianas foram coletadas da fase exponencial de 6 horas. Em seguida adicionou-se à membrana de PCL + α -Ag₂WO₄ na proporção de 1:1 em uma placa de 24 poços contendo um volume final de 3 mL de cada inóculo bacteriano, após incubou-se por 3h a 37 °C.

Decorrido o período, as células bacterianas foram fixadas por meio da submersão das amostras em solução Karnovsky (1% paraformaldeído + 3% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,2 M pH 7,2) por 24 horas, em temperatura ambiente, seguida de três lavagens sucessivas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por 10 minutos cada. A pós-fixação foi realizada por 1 hora em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,3, e desidratadas com soluções de acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 15 minutos. As bactérias foram submetidas à infiltração em resina epon seguindo o gradiente de trocas de acetona para epon na proporção de 2:1, 1:1 e 1:2 com intervalos de 10 horas, até as amostras estarem totalmente submersas na resina. Posteriormente estas foram alocadas nos moldes de silicone e permaneceram na estufa à 70 °C por 48 horas para a formação dos blocos, que foram submetidos a cortes ultrafinos de 70 a 100 nm e depositados sobre grades de cobres cobertas com formvar. As células foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (Modelo JEOL JEM - 1400Flash), em alto vácuo sob voltagem de

80kV, e as imagens foram obtidas com uma câmera integrada ultra sensitiva (Câmera AMT 43 Megapixel Bottom Mount).

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1.1. Preparo, parâmetros e proporção de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na solução polimérica de PCL

Na Tabela 8 são demonstrados os parâmetros ambientais como temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade (%) e o parâmetro de processo (tensão/kV) que foram aplicados na obtenção das microfibras de PCL com as diferentes proporções em massa de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

Tabela 8 - Os parâmetros observados na obtenção das microfibras de policaprolactona (PCL) com as diferentes concentrações de tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$)

Microfibras		Parâmetros processos		Parâmetros Ambientais		Visualizações visíveis a olho nu	
		V (kV)	Q	U (%)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Estabilidade do Cone de Taylor	Observação de pérolas
Controles	PCL	14,1	130	39	26,1	Sim	Não
	OXA	17,3	120	39	26,1	Sim	Não
	TIENAM	15,8	100	39	25,2	Sim	Não
	CRO	16,0	100	40	25,1	Sim	Não
(PCL + Ag_2WO_4)	1:1	17,7	100	42	25,5	Sim	Sim
	0,75:1	16,8	110	43	26,1	Sim	Não
	0,50:1	15,2	110	44	26,5	Sim	Não
	0,25:1	14,4	120	48	25,6	Sim	Não
	0,1:1	14,4	130	48	27,2	Sim	Não

Nota: Tensão (kV), vazão volumétrica (Q), umidade (%) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Na Figura 27 observa a formação de pequenas pérolas na superfície da membrana na proporção de 1:1 de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Essas pequenas pérolas, pode indicar um acúmulo do microcristal visto que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não é uma substância solúvel, porém a formação dessas pequenas pérolas não interferiu na estabilidade do cone de Taylor.

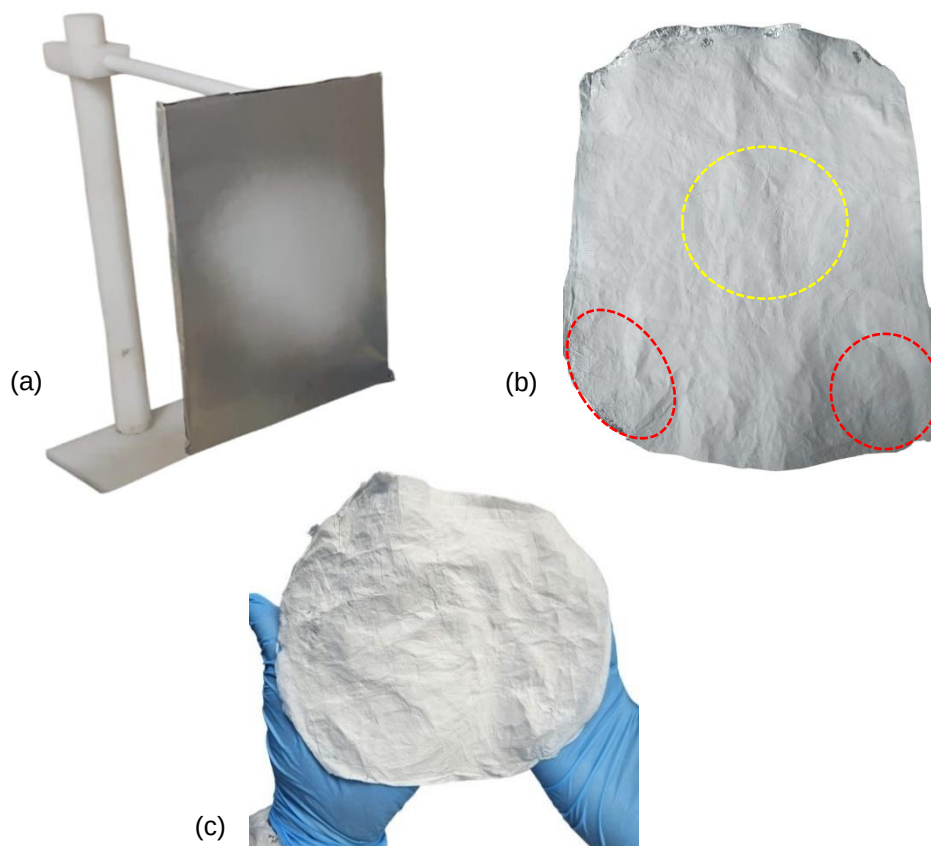
Foi observado um aumento na tensão, de acordo com o aumento da proporção de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Em relação aos parâmetros ambientais ocorreram várias oscilações como pode ser visto no parâmetro de umidade que variou de 39 % a 48 % e temperatura de 25,1 $^{\circ}\text{C}$ a 27,2 $^{\circ}\text{C}$. Todas as microfibras apresentaram estabilidades no cone de Taylor sem gotejamento no jato aplicado nas tensões padronizadas para cada solução.

9.1.2. Análise morfológica das microfibras de PCL com α -Ag₂WO₄

Na Figura 26 é demonstrada a imagem da membrana de PCL + α -Ag₂WO₄ obtidas utilizando o sistema horizontal. Sendo que na região destacada em vermelho é possível verificar uma área mais transparente com menor deposição de fibras, na região em destaque no círculo amarelo nota-se uma região mais esbranquiçada demonstrando uma maior deposição de fibras (Moraes 2015; Ferreira et al., 2022).

Os tipos de fibras obtidas dependem muito do modelo do sistema utilizado e o tipo de coletor, pois ambos têm um papel fundamental na produção e estrutura final das fibras. No trabalho realizado por Moraes (2015) é reforçado algumas desvantagens em utilizar o coletor retangular estático, devido a não uniformidade da espessura da membrana e fibras não alinhadas. Porém, a obtenção de fibras alinhadas não faz parte do objetivo do presente trabalho.

Figura 26 - Imagem da membrana de policaprolactona com Tungstato de prata



Nota: Deposição das fibras na placa metálica **(a)**, deposição total das microfibras **(b)**, Fibras intactas após a retirada da fibra do papel alumínio **(c)** (editado no PhotoRoom).

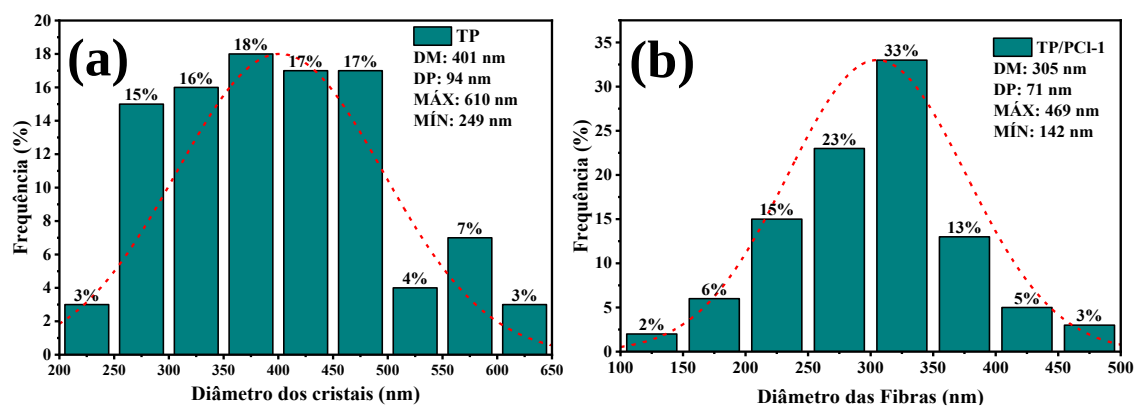
9.1.3. Caracterização morfológica das microfibras por microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que possibilita que um feixe de elétrons focalizado realize uma varredura na superfície da amostra, explorando ponto a ponto e gerando diferentes tipos de sinais que possibilitam obter informações em relação a morfologia e composição do material analisado.

Para esse estudo, foram realizadas capturas de imagens das microfibras de PCL obtidas com magnificações de x500, x1000, x7000, x11000, x13000, 17000, x23000 e x30000, que são demonstrados nas Figuras 28, 30, 32, 34 e 36. As curvas de distribuições e histogramas dos diâmetros das microfibras de PCL, PCL + controles de drogas e PCL + α -Ag₂WO₄, com seus respectivos valores médios, desvios padrões e gaussiana da distribuição normal dos diâmetros próximos ao valor médio.

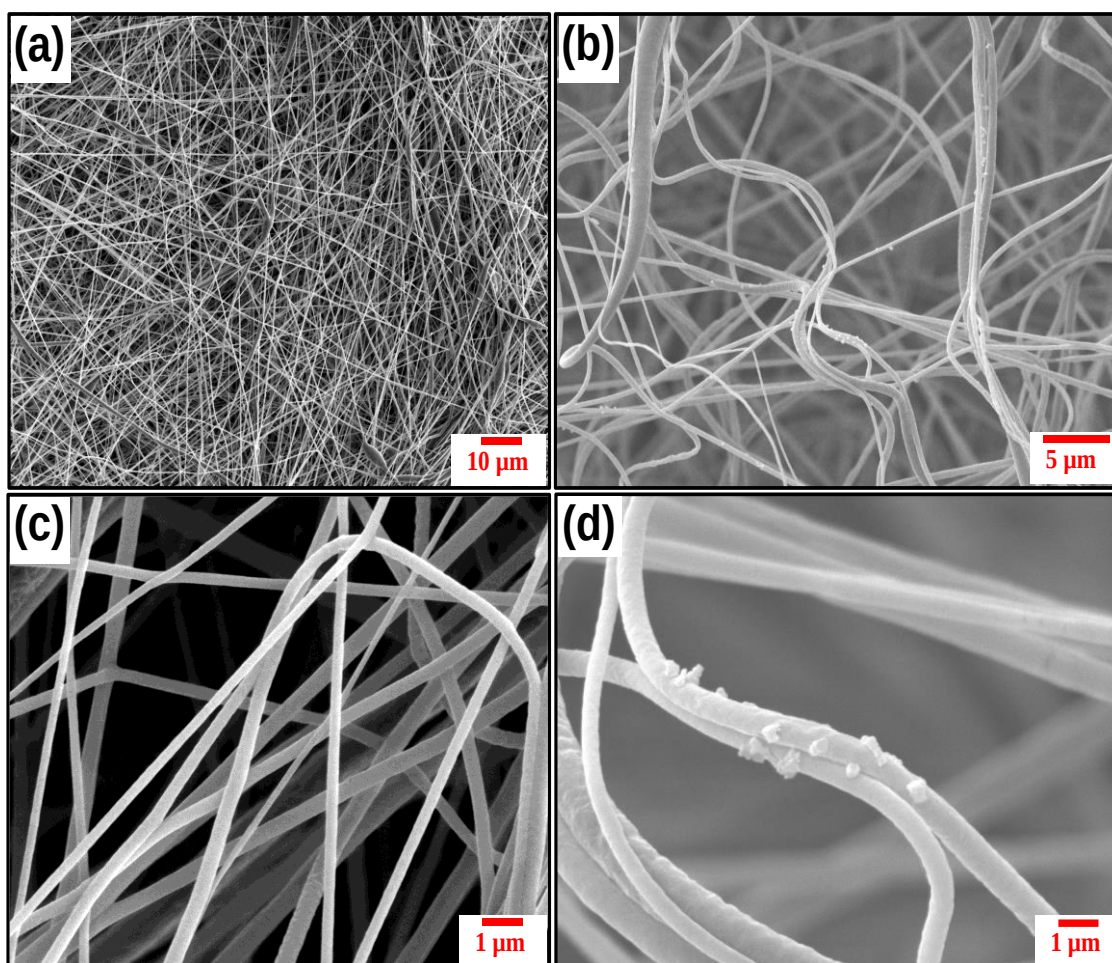
Os resultados mostram que as microfibras de TP/PCL-1:1 eletrofiadas em 17,7 kV, apresentam diâmetros variados, com uniformidade na maioria das fibras e estão aleatoriamente distribuídas (FIGURA 28). O perfil da curva gaussiana mostra que o máximo de frequência ocorre no intervalo de 200 a 350 nm e apresenta diâmetro médio de 305 ± 71 nm e diâmetro máximo ($D_{\max}$) de 469 nm e mínimo de ($D_{\min}$) equivalente a 142 nm, conforme apresentado na Figura 27b. Nas micrografias, é possível verificar algumas fibras não uniformes, e a presença de pequenos defeitos estruturais em formas de gotas, sendo estas, responsáveis pela redução da área superficial (FIGURA 28a). Além disso, na Figura 28c e 28d, nota-se que é possível identificar fibras com superfície rugosa. Enquanto na Figura 28b e 28d é possível verificar a presença de estruturas na forma de pequenos cristais na superfície das fibras, o qual sugere-se estar relacionado ao tungstato de prata ancorado à superfície.

Figura 27 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das membranas de policaprolactona com tungstato de prata na proporção 1:1



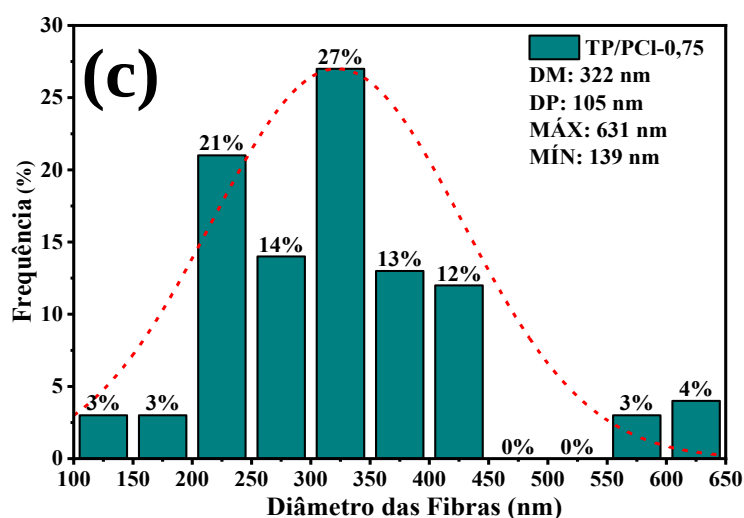
Nota: Tungstato de prata (TP)

Figura 28 - Micrografias das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção 1:1



No histograma Figura 29c, às fibras de TP/PCL-0,75:1 eletrofiadas em 16,8 kV, exibem diâmetros maiores que as fibras obtidas na maior proporção de 1:1, com $D_{\max} = 631$ nm e $D_{\min} = 139$ nm, assim como apresentam diâmetros das fibras com maiores máximos de frequência para a curva gaussiana entre o intervalo de 200 e 450 nm.

Figura 29 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,75:1

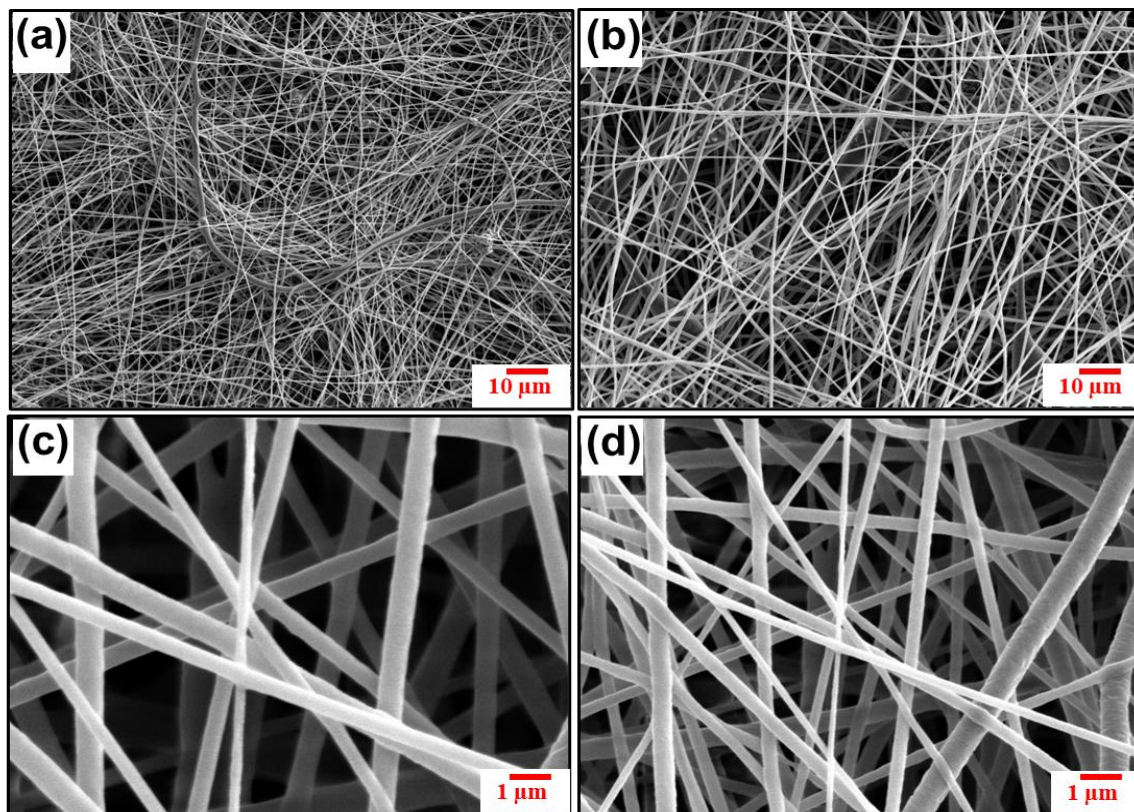


Na FIGURA 30a é possível verificar as análises das micrografias sob menor ampliação que permitiu visualizar pequenos aglomerados de partículas com dimensões submicrométricas que são características do α - Ag_2WO_4 , esses pequenos aglomerados podem estar associados a dispersão dos cristais na solução polimérica. O que indica a necessidade de melhor dispersão destes na mistura para alcançar uma melhor distribuição.

Para essa amostra, não foram visualizados defeitos em formas de gotas, apesar de serem vistos algumas áreas na membrana assemelhando-se a planos não uniformes com superfícies mais porosas. Onde, a porosidade observada pode estar associada ao início da estabilização do cone de Taylor, devido a tensão necessária para formação das fibras. As Figuras 30b e 30d, são visualizadas algumas fibras que se destacam por sua espessura e rugosidade e

ausência de uniformidade, sobretudo, com menor densidade de defeitos estruturais.

Figura 30 - Micrografias das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,75:1



Já as morfologias das fibras eletrofiadas em 15,2 kV na proporção de 0,50:1, conforme apresentado nas Figura 32, apresentam acréscimo de uniformidade e redução de rugosidade. Na curva gaussiana apresentada, o diâmetro médio obtido foi de 338 ± 80 nm, com variações de $D_{\max} = 542$ nm e $D_{\min} = 154$ nm (FIGURA 31d).

Figura 31 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,50:1

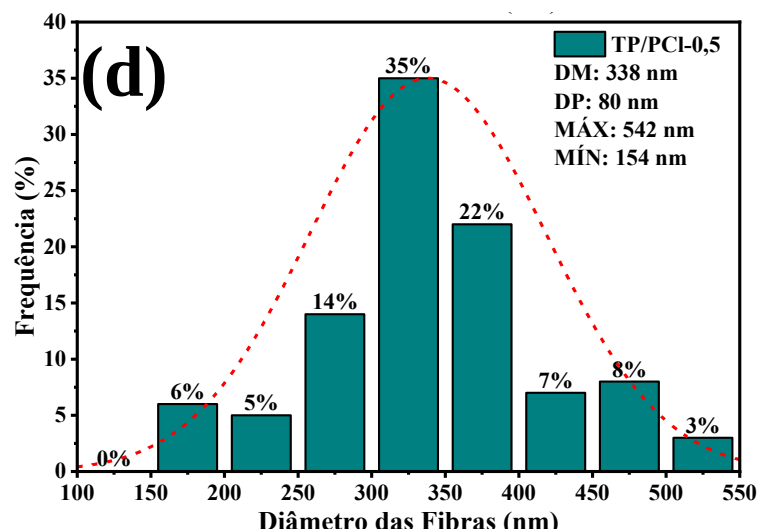
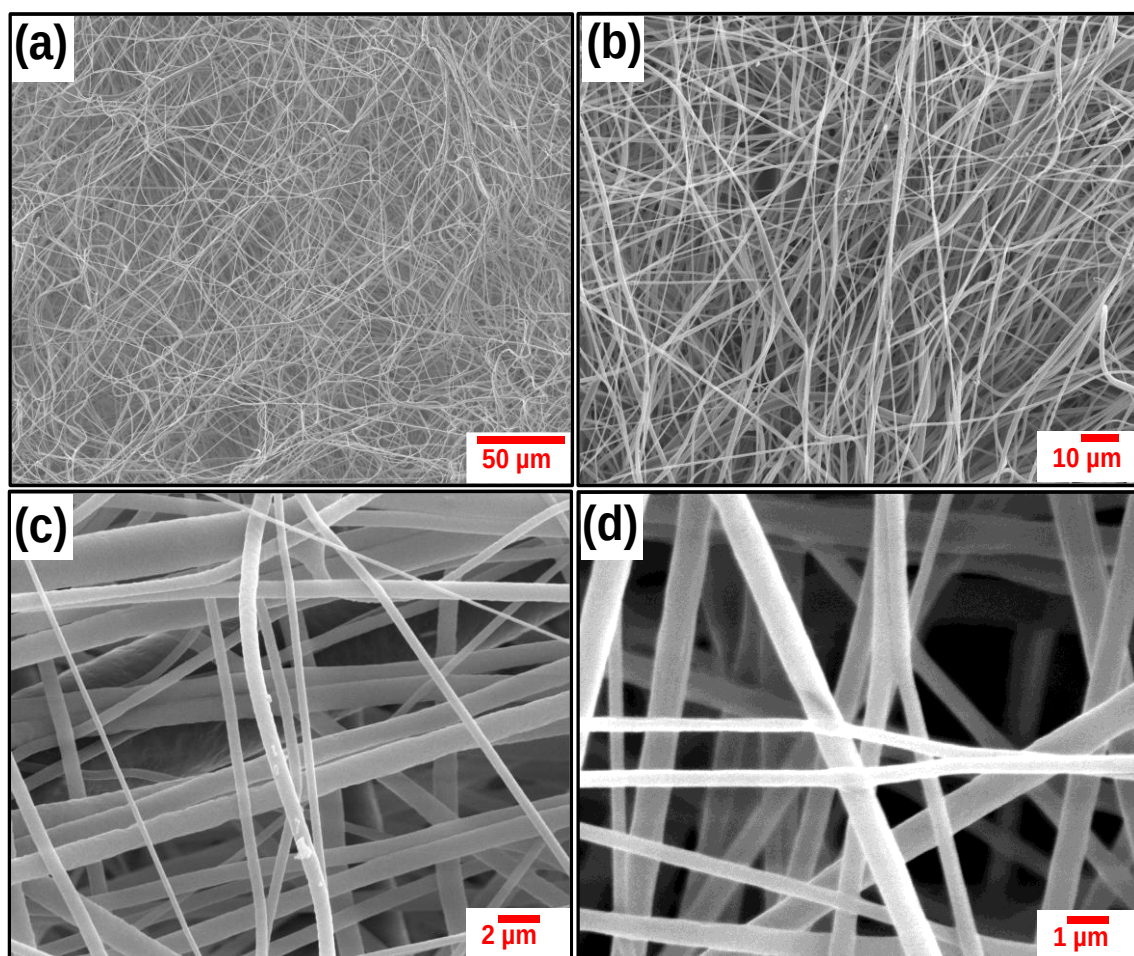


Figura 32 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção 0,50:1



Nas Figuras 34 e 36, correspondente as fibras eletrofiadas em 14,4 kV, é possível verificar fibras uniformes e lisas, com pouca ocorrência de defeitos estruturais comparado as fibras obtidas para as proporções de 1:1, 0,75:1 e 0,50:1. Embora seja possível identificar a presença de fibras não uniformes e rugosas.

As imagens obtidas das fibras nas proporções de 0,25:1 e 0,1:1 é possível verificar pequenas ondulações nas fibras com menor diâmetro, o que sugere o encapsulamento de cristais do tungstato de prata, em um modelo de “core-shell”, ao fundir-se com as fibras do PCL (FIGURA 34c e FIGURA 36c e 36d). Em relação aos diâmetros obtidos as micrografias obtidas nas proporções de 0,1:1 apresentam variações nos diâmetros com máximos de frequência de 250, 300 e 400 nm (FIGURA 35f).

Figura 33 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,25:1

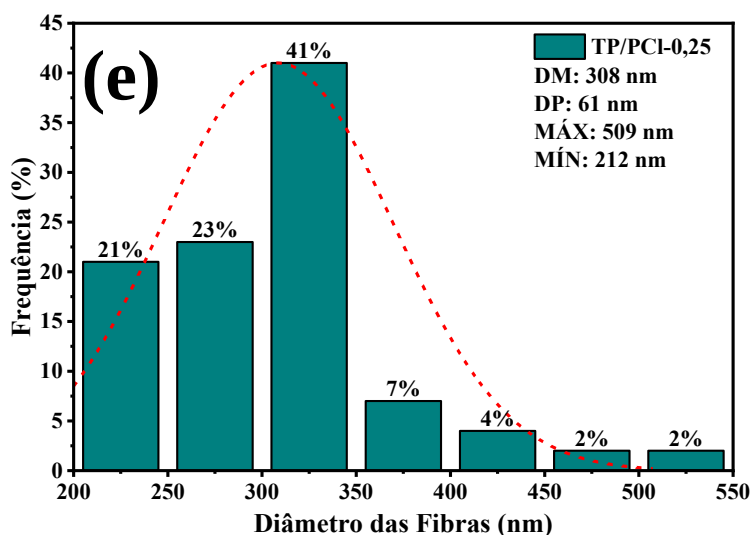


Figura 34 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,25:1

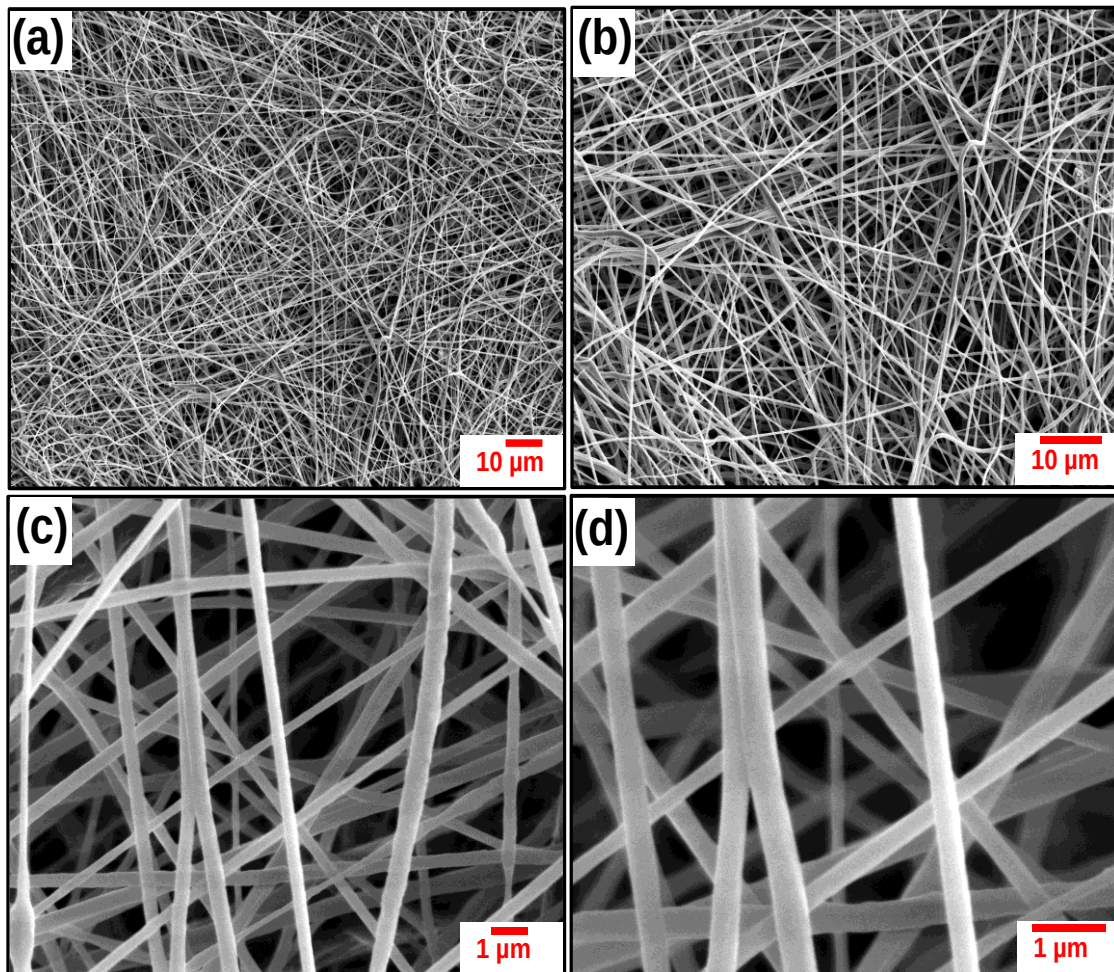


Figura 35 - Curva de distribuição e histograma dos diâmetros, valores médios e desvio padrão das microfibras de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,1:1

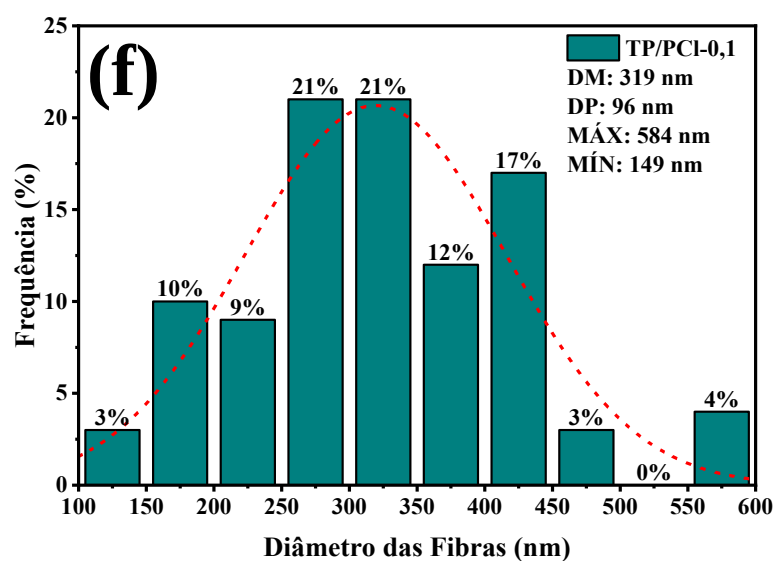
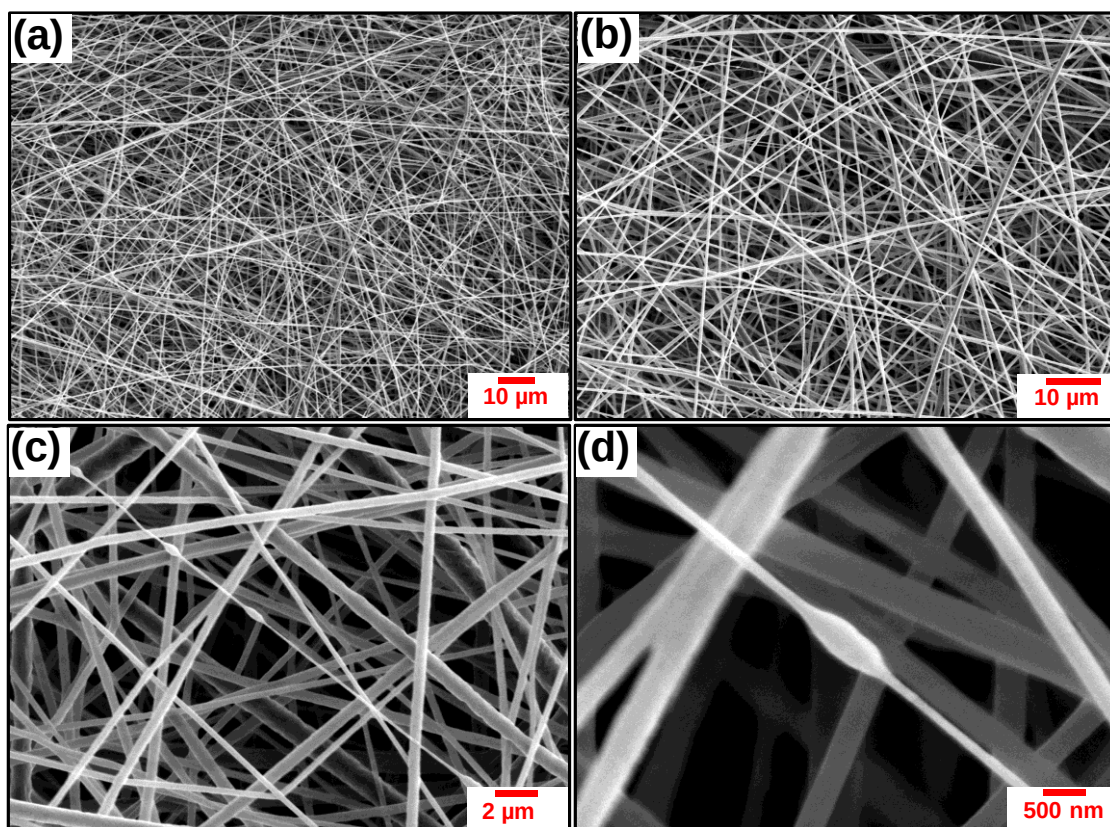


Figura 36 - Micrografias de policaprolactona com Tungstato de prata na proporção de 0,1:1



A Figura 37 estão as imagens das membranas dos controles, sendo demonstrado na Figura 37d o controle de PCL, que foi produzida em condições ótimas de processamento, tais como estabilidade do cone de Taylor, ampla área de deposição das fibras e ausência de gotas ou “beads”. Neste caso, apresentando diâmetro médio de $277 \pm 85,7$ nm e $D_{\max} = 488$ nm e $D_{\min} = 151,5$ nm. Os diâmetros do controle de PCL são próximos ao reportado em um trabalho recente de Ferreira et al (2022) que apresentou diâmetro médio de $318 \pm 159,96$ nm. Sendo que os diâmetros tendem a variar dependendo do tipo de substância, assim como pode variar dependendo dos parâmetros aplicados.

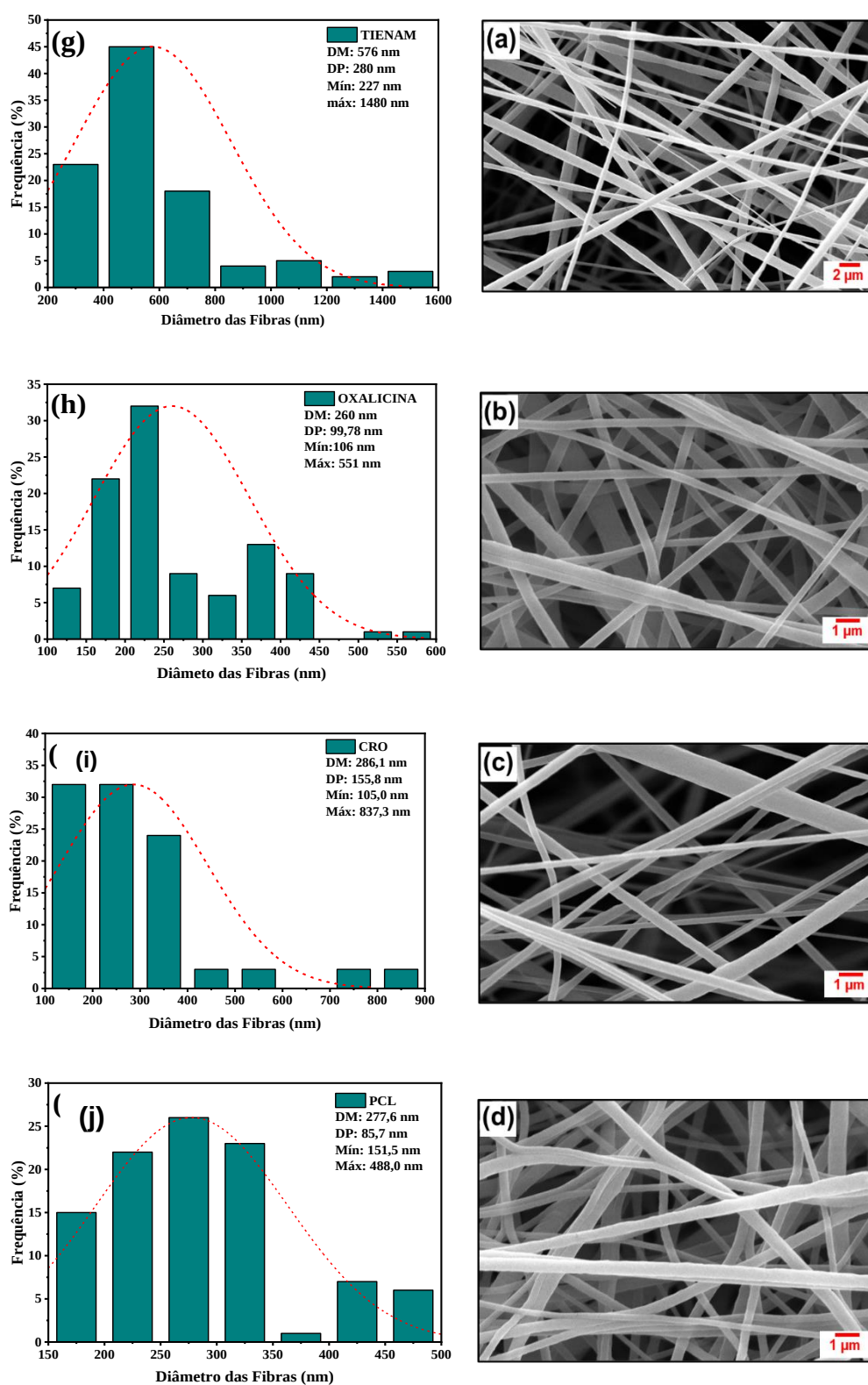
Ao comparar os diâmetros das fibras de PCL e PCL+ α -Ag₂WO₄, nota-se que os diâmetros de PCL+ α -Ag₂WO₄ foram maiores em comparação com os diâmetros das fibras de PCL puro. Essa diferença pode estar associada à incorporação do α -Ag₂WO₄. Entre as fibras de PCL+ α -Ag₂WO₄ não houve diferença significativa, porém verificou que na maior proporção de 1:1 os diâmetros foram menores comparado as menores proporções. Segundo o estudo realizado por Farias (2021) os diâmetros menores estão associados

principalmente a alta tensão aplicada de 17,7 kV ou pode estar associado a região analisada no momento da caracterização, tendo em vista que os dados em gerais mostram que as fibras estão distribuídas próxima ao ponto médio da gaussiana, isso ocorre devido à boa homogeneidade pelo processo de eletrofiação (Brito 2013).

Os outros defeitos morfológicos observados nas primeiras nanofibras obtidas nas maiores proporções podem estar associados a viscosidade, tempo de vôo do jato polimérico entre o capilar e o coletor, esses parâmetros têm a tendência a impedir alongamento adequado das fibras, gerando nanofibras mais curtas com presença de defeitos estruturais, como os defeitos em forma de gota e fibras não uniformes (Moraes 2015; Mancipe et al., 2019; Segundo et al., 2021).

Na adição de PCL + TIENAM na proporção de 1:1 também foram vistos outros problemas, como diversas rachaduras e algumas fibras ultrafinas em forma de fitas (FIGURA 37a), assim como apresentou diâmetro médio de 576 nm e diâmetros máximo de 1480 nm e mínimo de 227 nm (FIGURA 37g). Os controles OXA e CRO apresentaram ausência de defeitos em suas morfologias com aspectos mais liso e mais uniforme (FIGURA 37c e FIGURA 37d). Porém apresentaram diâmetros bem menores ao observado nas fibras de PCL + TIENAM, no entanto apresentam diâmetros máximo próximo ao controle de PCL, sendo o $D_{\max} = 286,1$ nm e $D_{\max} = 260$ nm e mínimo de $D_{\min} = 105$ nm e $D_{\min} = 106$ nm, respectivamente.

Figura 37 - Micrografias dos controles de policaprolactona com Imipeném + cilastatina sódica, Ceftriaxona, Oxacilina, na proporção de 1:1



Nota: Imipeném + cilastatina sódica (TIENAM), Ceftriaxona (CRO), Oxacilina (OXA).

Apesar dos microcristais apresentarem diâmetros maiores, como demonstrado na Figura 27a, esses resultados comprovam que o microcristal de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ encontram-se tanto na superfície das fibras como nanoencapsulado ou dentro das fibras conforme são vistos na Figura 28d, Figura 32c, Figura 36c e Figura 36d, assim como esses dados são confirmados pelo EDS.

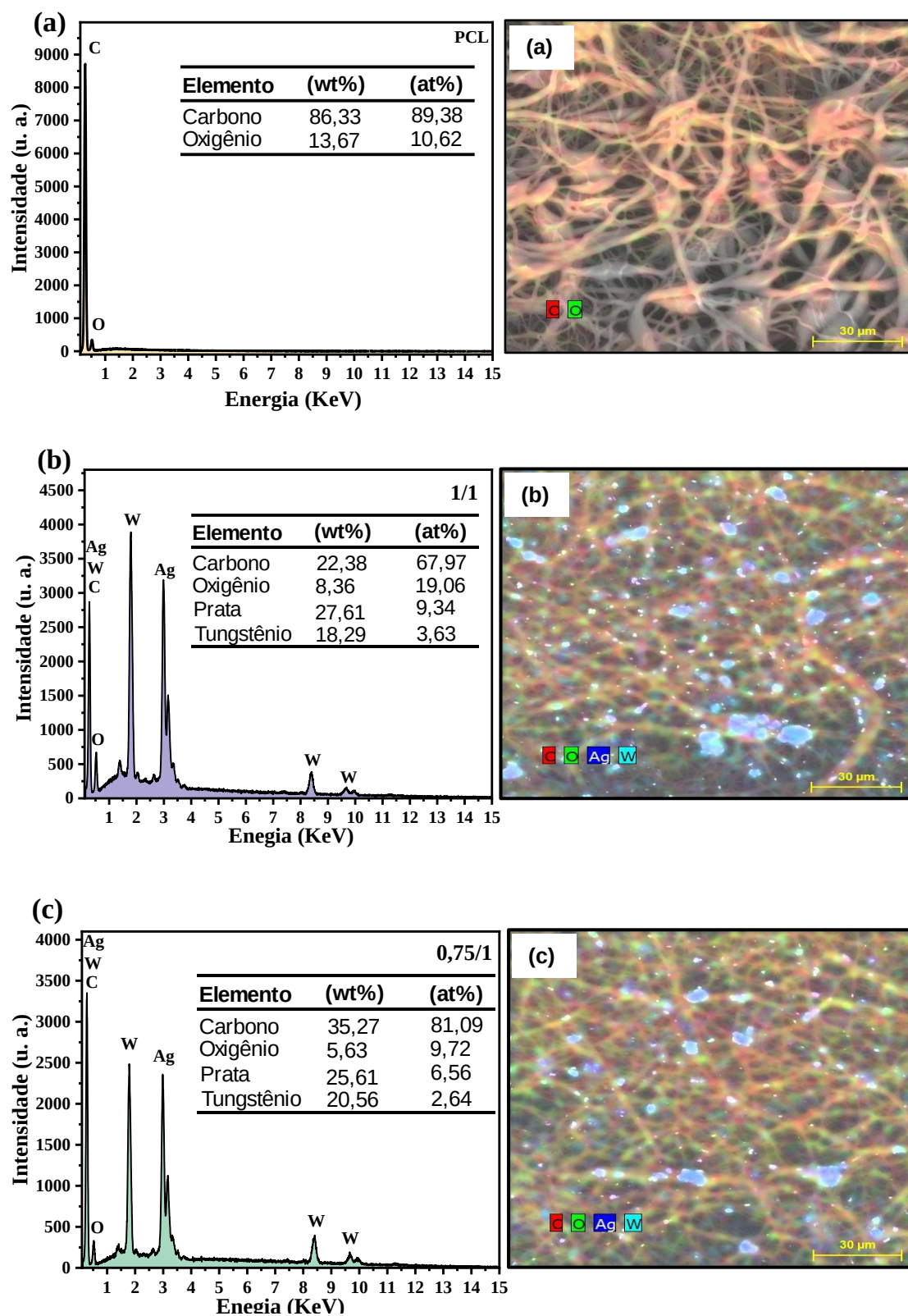
A obtenção de fibras de policaprolactona vêm sendo bastante utilizada, por é um poliéster alifático com capacidade de degradação e baixa toxicidade, permitindo ampliar às aplicações, principalmente na produção de arcabouços usados matrizes carregadoras de substâncias ativas, como reportado em um estudo realizado pelo grupo (Farias 2021), assim como diversos estudo recente (D'amato et al., 2018; Chiesa et al., 2020; Permyakova et al., 2022). Também têm sido empregados o uso de diversos solventes, como clorofórmio e acetona na eletrofiação, com o propósito de criar as condições propícias para a formação dos fios e obter maior rapidez na evaporação dos solventes durante o processo de eletrofiação (Farias 2021). Como uma forma de endossar os polímeros podem ser facilmente moldados e quimicamente alterados para adaptar-se às suas propriedades biológicas específicas, e podem vir a ser produzido nanofibras com propriedades melhoradas conforme reportada no presente estudo.

9.1.4. Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)

A espectroscopia de dispersão de energia (EDS) é uma técnica semi-analítica utilizada para obter informações sobre a composição elementar de uma amostra por meio de comparações com uma biblioteca de espectros conhecidos. Essa técnica é comumente realizada em conjunto com a microscopia eletrônica de varredura (MEV), aproveitando a capacidade do MEV em produzir imagens em alta resolução e o EDS para a análise da composição química (Ferreira et al., 2022).

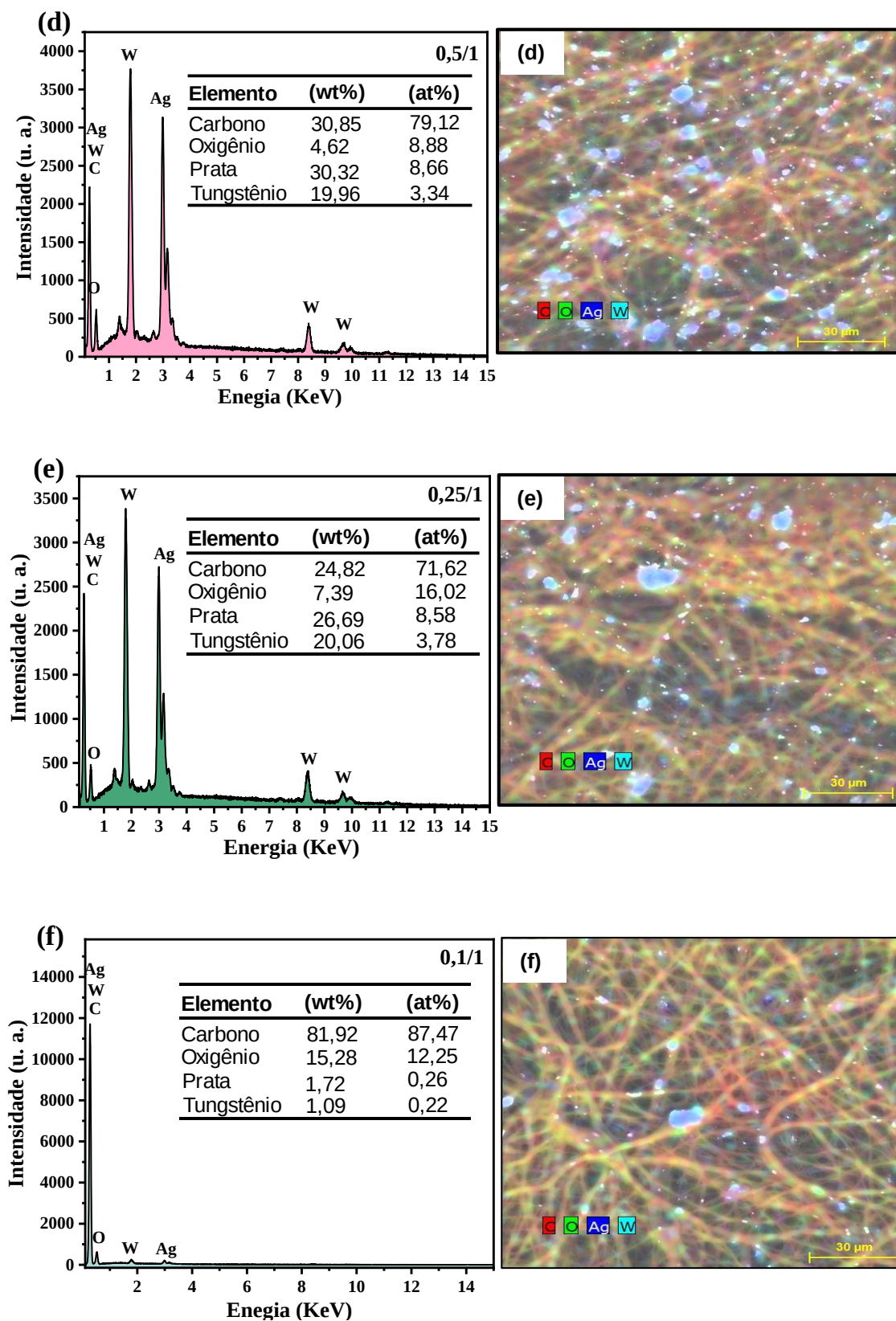
As análises por EDS realizada nas microfibras PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, foram confirmadas a presença dos elementos prata (Ag), tungstênio (W) e oxigênio (O) nas fibras eletrofiadas, assim como foi confirmada a presença dos elementos de oxigênio (O) e carbono (C) que compõem o polímero de PCL (FIGURA 38).

Figura 38 - Imagens de MEV e mapas elementares EDS correspondentes as microfibras do controle de PCL e PCL + α -Ag₂WO₄ nas proporções de 1:1 a 0,25:1



Nota: Porcentagem do número de massa total dos elementos presente nas fibras (**wt%**) e porcentagem total do número de átomos (**at%**).

Figura 39 - Imagens de MEV e mapas elementares EDS correspondentes as microfibras do controle de PCL e PCL + α -Ag₂WO₄ nas proporções de 0,50:1 a 0,1:1



Nota: Porcentagem do número de massa total dos elementos presente nas fibras (**wt%**) e porcentagem total do número de átomos (**at%**).

A presença desses elementos nas fibras de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ apresentaram distribuição oscilatórios nos números de massa e átomos presente nas membranas, sendo que as fibras na maior proporção de 1:1 apresenta menor porcentagem no número de massa total comparada as fibras na proporção de 0,75:1, 0,50:1 e 0,25:1. Na Figura 38b são obtidos 27,61% (wt) de prata e 18,29% (wt) de tungstênio no número total de massa e 9,34% (wt) de prata e 3,63% (at) de tungstênio no número total de átomos que compõem a região analisada. A membrana na menor proporção de 0,1:1 apresentam menores porcentagens no número de massa e átomos como o esperado.

Apesar do número de massa e átomos presente nas fibras apresentarem comportamento diferenciados, se verifica que os elementos que compõem a fase alfa de tungstato de prata, estão presentes em todas as membranas. Esses comportamentos são semelhantes ao observado nos resultados obtidos por MEV, tendo em vista, que os resultados obtidos por EDS, são análises complementares e se utilizam a mesma região analisada por MEV. Os resultados encontrados no presente estudos estão em comum acordo com a literatura, conforme reportado no trabalho de Pereira et al (2022).

9.1.5. Difração de raio X (DRX)

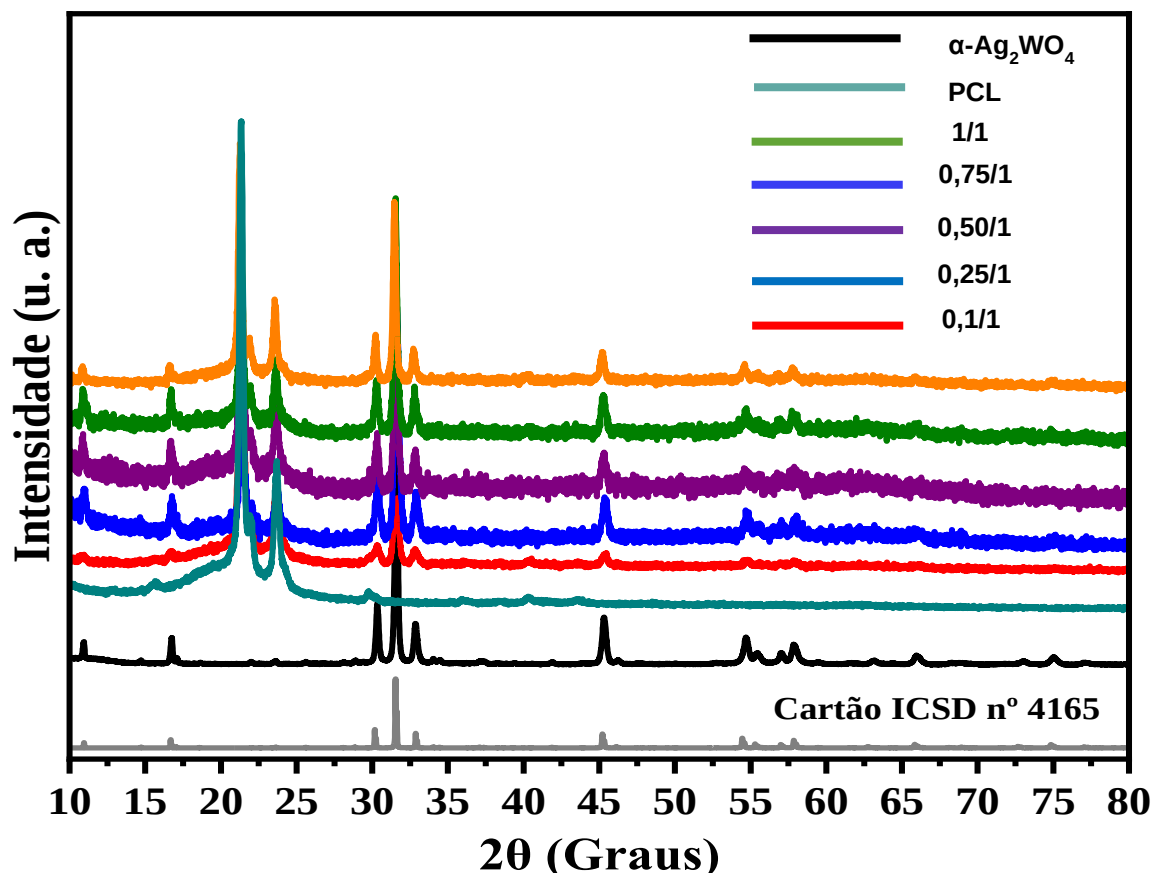
As análises por difração confirmam a presença de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas fibras de PCL, essa análise possibilita estudo mais detalhado das informações cristalográficas de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na superfície das membranas. Ao observar o difratograma referente ao controle das fibras de PCL, qual são vistos dois picos de cristalinidade de reflexão em $2\theta = 21,6^\circ$ e $23,6^\circ$, assemelhando-se aos picos reportados por Anitasari e colaboradores (2023) e Suárez et al., (2022).

A indexação do padrão de difração do tungstato de prata puro revela um elevado grau de similaridade aos planos cristalográficos, tanto em perfil como posição, com a fase alfa do tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$), concordando com estudos reportados anteriormente, cartão Inorganic Crystal Structure Database (ICSD) N°. 4165 e literatura consultada (Assis et al., 2019; Ribeiro et al., 2022).

A presença de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas fibras foram confirmadas devido apresentar picos bem definidos indicando a obtenção de um material com elevado grau de cristalinidade e grau de ordem/desordem a longo e curto alcance para cristais nas fibras de PCL. Dentre as reflexões em $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas fibras é

possível destacar os maiores picos nos valores $2\theta = 11,1^\circ$, $16,7^\circ$, 20° , 24° , $30,3^\circ$, $31,6^\circ$, 33° , $45,2^\circ$ e $54,6^\circ$, associados aos planos cristalográficos (110), (011), (002), (231), (400), (402) e (232), semelhante ao trabalho de Macedo et al (2018) que avaliou a morfologia e atividade fotocatalítica de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

Figura 40 - Padrão de difração das cinco membranas de policaprolactona com Tungstato e prata



A célula unitária de tungstato de prata, PCL e as membranas de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ foram modeladas utilizando o software de disponibilidade gratuita Visualization for Electronic Structural Analysis (VESTA), que possibilitou identificar a composição dos clusters AgO_x e WO_y , semelhante ao aplicado com tungstato de prata puro. Apesar de ainda serem escassos estudos de difração de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nota-se que os resultados obtidos estão em ótima concordância com os difratogramas dos controles de comparação de tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$) e o polímero de policaprolactona (PCL), conforme já relatados em diversos estudos na literatura (Assis et al., 2019; Ribeiro et al.,

2022; Anitasari et al., 2023). Vale salientar que não houve impacto entre as reflexões $2\theta = 11,1^\circ$, $16,7^\circ$, 20° , 24° , $30,3^\circ$, $31,6^\circ$, 33° , $45,2^\circ$ e $54,6^\circ$ em nem uma das proporções de PLC + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

9.1.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

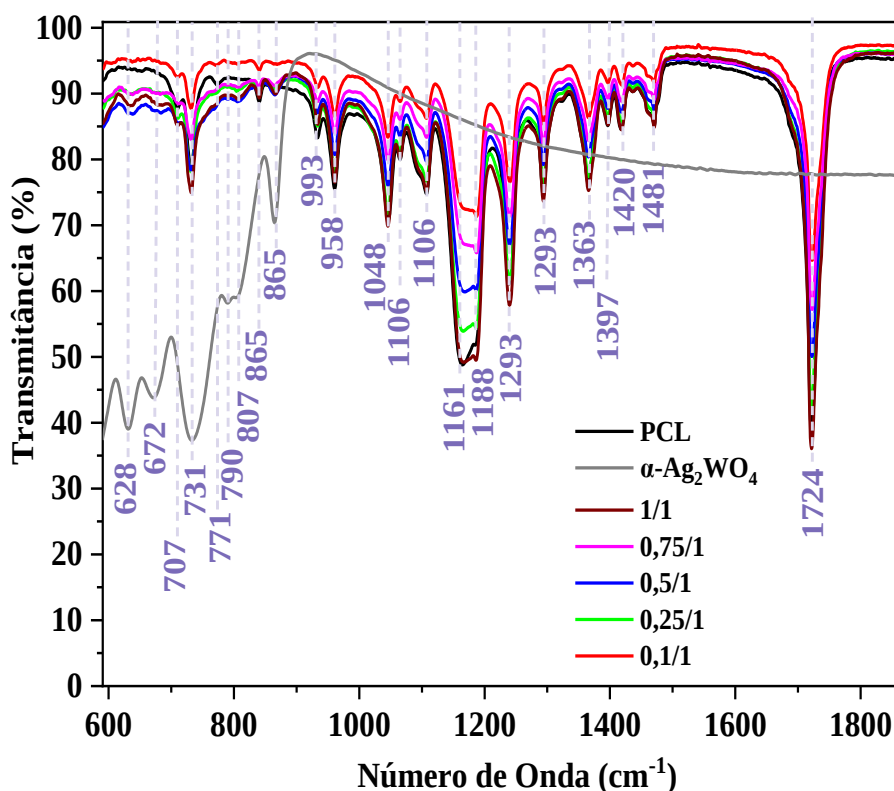
Os resultados por FTIR confirmam a presença de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e estão em concordância com os resultados obtidos por DRX. Os espectros foram comparados com os controles padrões da fase alfa de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e o polímero de PCL, que são espectros bastante conhecidos e reportados na literatura como relatado em um estudo recente de Anitasari et al (2023) que estudou *Scaffolds* de caprolactona (PCL) em processo de osteogênese. Outro estudo realizado por Segundo et al (2021), que utilizou o polímero impresso de ácido gálico incorporado em esteira de caprolactona, assim como no estudo de Macedo et al (2018) confirma o espectro de tungstato de prata puro.

Com base nesses critérios mencionado acima, ao avaliar de forma mais detalhada os espectros por FTIR, são vistos picos mais acentuados da PCL na faixa de 1724 cm^{-1} característico do estiramento do grupo de carbonila (C=O) (FIGURA 41). Vibrações moleculares associadas a função éster, comumente identificados na faixa de 1730 a 1750 cm^{-1} , são associadas as características do polímero de PCL (Khosravi, 2018; Ramírez-Cedillo et al., 2019; Suárez et al., 2022). As posições dos modos vibracionais associado a segunda faixa de maior intensidade nas bandas de 1161 a 1188 cm^{-1} , estão associados ao alongamento das ligações C-O e C-C, assim como é atribuído ao terceiro pico na faixa de 1293 cm^{-1} , que são frequentemente associada à fase de cristalinidade da PCL (FIGURA 41).

Os resultados obtidos são semelhantes ao observado nos estudos de Segundo et al (2021), Suárez et al (2022) e Anitasari et al (2023). As análises vibracionais na região de 600 a 1800 cm^{-1} das membranas de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, são obtidos os maiores picos de intensidades nas mesmas faixas que o PCL puro, no entanto houve uma intensidade diferenciada não vistas no PCL puro na faixa de 628 cm^{-1} , 772 cm^{-1} , 790 cm^{-1} , 807 cm^{-1} e 865 que estão associadas as vibrações assimétricas de O-W-O dos clusters $[\text{WO}_6]$ (Macedo et al., 2018).

Macedo et al (2018) obtém espectros na faixa de 829 a 896, próximo ao reportado no presente estudo. Tanto nas análises por DRX como no FTIR se observa que não há mudança nos espectros nas diferentes proporções de PCL + α -Ag₂WO₄, tendo comportamento que se assemelham a PCL ou α -Ag₂WO₄ puro.

Figura 41 - Espectroscopia das membranas de policaprolactona com Tungstato de prata



9.1.7. Estudo de molhabilidade das membranas através do ângulo de contato

A hidrofobicidade e hidrofiliicidade com diferentes proporções das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄, são expressos na Figura 42 e Tabela 9, assim como os ângulos de contatos dos controles PCL, PCL + OXA, PCL + TIENAM e PCL + CRO.

Dentre os ângulos de contatos obtidos é possível verificar o ângulo médio de $(125^\circ \pm 0,55)$ do controle de PCL. Já as microfibras dos controles de drogas

(PCL + OXA, PCL + TIENAM e PCL + CRO) apresentaram ângulos médio de ($133^{\circ} \pm 0,59$, $130^{\circ} \pm 0,57$ e $131^{\circ} \pm 0,69$) respectivamente e por fim, as microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ que apresentaram ângulos médios que variaram de ($153^{\circ} \pm 0,60$ a $120^{\circ} \pm 0,57$). De uma forma mais detalhada, dentre as cinco microfibras avaliadas nas diferentes proporções, pode-se observar que a microfibra na proporção de 1:1 apresentou um ângulo médio mais alto de $153^{\circ} \pm 0,60$, demonstrando maior hidrofobicidade, seguido das fibras obtidas na proporção de 0,75:1 e 0,50:1 que apresentaram igualmente ângulos médios de ($127^{\circ} \pm 0,59$). Sendo que o menor ângulo observado foi na menor proporção de 0,1:1, que apresentou ângulo médio de ($120^{\circ} \pm 0,57$). O comportamento das gotas observado nas microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ são característicos de materiais hidrofóbicos. Também pode-se observar que houve um aumento na hidrofobicidade de acordo com aumento da proporção de PCL + α -Ag₂WO₄.

A hidrofobicidade observada nas microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ está associado principalmente ao PCL, porque é um material que possui característica hidrofóbica devido a uma longa e repetidas unidades de grupos de metileno na molécula de PCL, que consequentemente resulta em maior hidrofobicidade (Zhang et al., 2021). Diversos estudos recentes vêm relatando os ângulos de contato da PCL eletrofiada com deposições aleatórias variando entre 122° a 145° (Farias 2021; Ferreira et al., 2022; Zhang et al., 2021). Materiais hidrofóbicos a partir de nanofibras de PCL podem vir a ser utilizados na aplicação de tecido têxtil, como observado no estudo realizado por Ferreira et al., 2022, que produziu um material sustentável à base de PCL, com e sem função antimicrobiana, por meio da incorporação do óleo essencial (OE) de *Lavandula luisieri*. No mesmo estudo também foi demonstrado que tanto o PCL quanto o PCL + OE obtiveram uma boa aplicação museológica e com boa resistência à rachadura, além de apresentar e excelente resultado de brancura.

Figura 42 - Valores de ângulo de contato das microfibras de Policaprolactona + tungstato de prata

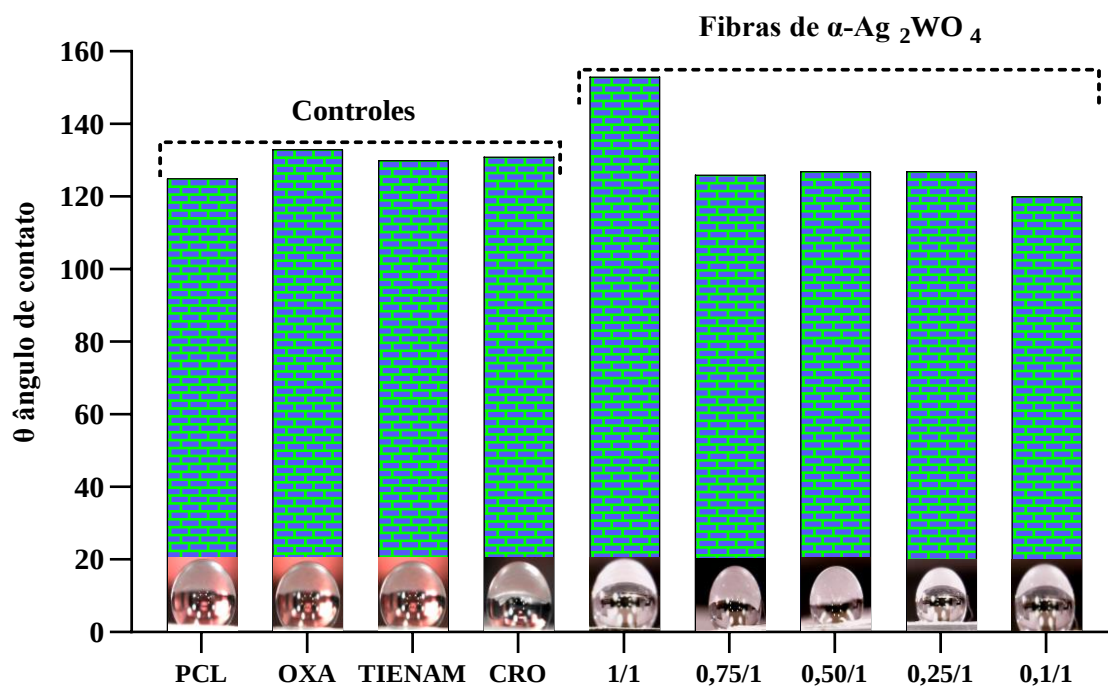


Tabela 9 - Valores de ângulo de contato das microfibras de Policaprolactona + tungstato de prata

Ângulo de contato (θ)		Ângulo médio (DP)
Microfibras Controles	Policaprolactona (PCL)	125° ± 0,55
	Oxalina (OXA)	133° ± 0,59
	Imipeném + cilastatina sódica (TIENAM)	130° ± 0,57
	Ceftriaxona (CRO)	131° ± 0,69
Microfibras (PCL+ α-Ag ₂ WO ₄)	1:1	153° ± 0,60
	0,75:1	127° ± 0,65
	0,50:1	127° ± 0,59
	0,25:1	126° ± 0,55
	0,1:1	120° ± 0,57

9.1.8. Análise térmica por meio de Termogravimetria (TGA)

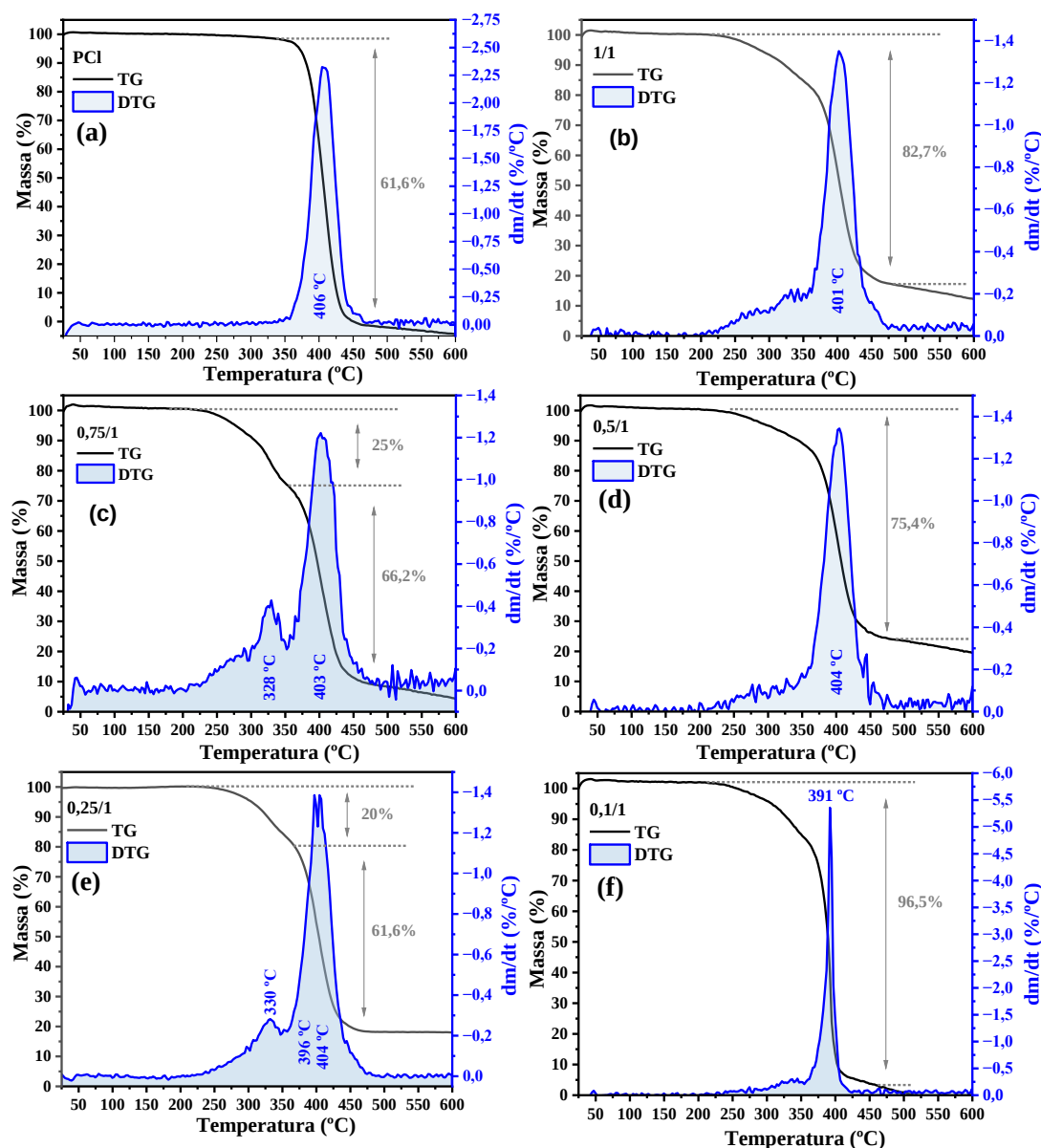
Nas análises de TGA exibiu um termograma de perda de peso gradiente Figura 43 em todas as membranas. Na fibra do controle de PCL observa uma perda de massa de 61,6% entorno de 406 a 500°C, essas perdas de massa foram próximas ao observado nas cinco membranas de PCL + α -Ag₂WO₄. De uma forma geral, verifica-se que não houve perda de massa significativa abaixo de 300°C em todas as análises, somente após, inicia o processo de termodecomposição da PCL. Na literatura vem sendo reportado que essa ausência de perda de massa na matriz polimérica próximo a 300°C demonstram inexistência de água nas fibras, assim como, inexistência de resíduos dos solventes que foram utilizados no preparo das soluções poliméricas (Farias 2021; Suárez et al., 2022).

As cinco microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ apresentam um perfil estável entre a faixa de 50 a 250°C. Ao avaliar separadamente as curvas de TGA das membranas nas proporções de 1:1, 0,75:1, 0,50:1, 0,25:1 e 0,1:1, de forma mais detalhada observa-se que a membrana na maior proporção de 1:1 teve uma perda de massa de 82,7% na temperatura de 401 a 450°C (FIGURA 43b). Assim como foi observado um comportamento semelhante na membrana na proporção de 0,50:1, em que houve uma perda de massa de 75,4% na mesma temperatura de 404 a 450°C (FIGURA 43d), ambas apresentaram resultados semelhantes ao observado no controle de PCL.

No entanto, na incorporação das membranas nas proporções de 0,75:1 e 0,25:1 ocorreu um comportamento diferenciado, com dois intervalos de perda de massa na de 25% e 66,2% nas temperaturas de 328°C e 403°C aproximadamente nas fibras na proporção de 0,75:1 (FIGURA 43c). Já na microfibra na proporção de 0,25:1, a perda de massa foi de 20% e 61,6% nas temperaturas de 330 e entre 396°C a 404°C respectivamente (FIGURA 43e). A curva de DTG demonstram que ocorreu dois picos na perda de massas em dois intervalos, mas são foram próximo ao intervalo observado no controle de PCL, assim como não houve perda significativa na estabilidade térmica do polímero antes de 250 °C. Na Figura 43f das fibras na proporção de 0,1:1 é observado uma maior perda de massa de 96,5% entre os intervalos de temperatura de 391 a 500°C. Na literatura são reportadas as temperaturas do início de degradação da PCL entre 382°C e 409°C por Mohammed et al (2008) e de 430,18°C por

Farias (2021), assim como no estudo realizado por Suárez et al (2022) que a termodegradação ocorreu a parti de 372 °C. Os valores obtidos no nosso estudo são próximos ao reportadas na literatura.

Figura 43 - Curvas de termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) das membranas de PCL e PCL + α -Ag₂WO₄



Os resultados encontrados nesse estudo possibilitam conhecer melhor as propriedades térmicas das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ ao ser submetida a alta temperatura, tendo em vista a importância para indústrias no desfecho final dos novos materiais. Por outro lado, os resultados possibilitam conhecer melhor

se o material pode ser submetido a alta temperatura sem perder suas propriedades, assim verificar a termoestabilidade de um polímero se torna crucial para verificar o papel desse material durante o processamento, moldagem e aplicações final visando aplicação industrial (Zhang et al., 2021).

9.1.9. Ensaios mecânicos de tração uniaxial

O ensaio de tração consiste em aplicar uma força de tração uniaxial nas membranas, alongando-lhe até ocorrer a ruptura. Esse método é de suma importância para verificar os módulos de elasticidade, tensão máxima, alongamento na ruptura e força máxima utilizada ao submeter ao extensômetro.

Na Tabela 10 consta as medidas obtidas antes de submeter as membranas ao extensômetro, e são medidos os comprimentos no medidor (L0), espessuras (a), larguras (b) e distâncias (LOT) em milímetros (mm). Ao analisar essas medidas, verifica-se que as larguras das cinco membranas são semelhantes, porém ocorrem diversas oscilações das medidas no comprimento, largura, distância e comprimento.

Tabela 10- Características das membranas utilizadas para fazer as medidas

Fibras	L0 [mm]	a [mm]	b [mm]	LOT [mm]	LOH [mm]
1:1	36,000	0,100	15,000	36,000	36,000
0,75:1	40,800	0,100	15,600	40,800	40,800
0,50:1	35,700	0,100	14,800	35,700	35,700
0,25:1	43,400	0,100	15,600	43,400	43,400
0,1:1	29,500	0,100	16,000	29,500	29,500

Nota: Comprimento no medidor (**L0**), Espessura (**a**), Largura (**b**), Distância (**LOT**) e comprimento (**LOH**).

A Tabela 11 consta os resultados da fase elástica, Tensão de limite de resistência [σ_{Max}/Mpa], alongamento máximo sem ruptura (%) e alongamento em que ocorre a ruptura (%). Ao analisar separadamente cada membrana, pode verificar que a microfibras na proporção de 1:1 apresentou a fase elástica maior comprado as demais membranas, porém a resistência à tração e alongamento foram menores de (0,82Mpa) e (1,31%), assim como foi aplicado força máxima menor comparada as demais membranas ($32,25 \pm 0,11\%$). Já a membrana na proporção de 0,75:1 exibiu melhores comportamentos mecânicos, com

resistência à tração de $4,3 \pm 0,10$ Mpa e teve um alongamento máximo sem ruptura de $6,72 \pm 0,12$, e foi aplicado força máxima de 181,62%. As membranas nas proporções de 0,50:1 a 0,1:1 apresentaram comportamento semelhantes com alongamento máximo que variaram de $1,99 \pm 0,10$ a $2,83 \pm 0,13$ e sendo aplicado força máxima de $77,76 \pm 0,10$ a $96,35 \pm 0,18$.

Tabela 11- Medidas obtidas dos módulos de elasticidade, tensão e alongamento de ruptura das membranas

Fibras	Modulo de Young [Mpa]	Tensão de limite de resistência [σ_{Max}/Mpa]	Alongamento (%)	Força máxima Fmax [N]
1:1	$15,80 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,20$	$1,31 \pm 0,10$	$32,25 \pm 0,11$
0,75:1	$14,24 \pm 0,10$	$4,3 \pm 0,10$	$6,72 \pm 0,12$	$181,62 \pm 0,09$
0,50:1	$9,38 \pm 0,11$	$1,91 \pm 0,11$	$2,83 \pm 0,13$	$96,35 \pm 0,18$
0,25:1	$9,87 \pm 0,10$	$1,28 \pm 0,15$	$1,99 \pm 0,10$	$94,36 \pm 0,11$
0,1:1	$11,65 \pm 0,15$	$1,38 \pm 0,10$	$2,04 \pm 0,10$	$77,76 \pm 0,10$

O estudo realizado por Ramírez-Cedillo et al., (2019), foram obtidas membrana de PCL com dióxido de titânio, que foram eletrofiada utilizando o mesmo solvente utilizado no presente estudo, assim como utilizou um coletor retangular estático que resultou em fibras aleatoriamente distribuídas, com valores de $0,66 \pm 0,13$ MPa e $152,40 \pm 0,759\%$.

9.1.10. Ensaio de liberação por espectrofotométrica (UV-Vis)

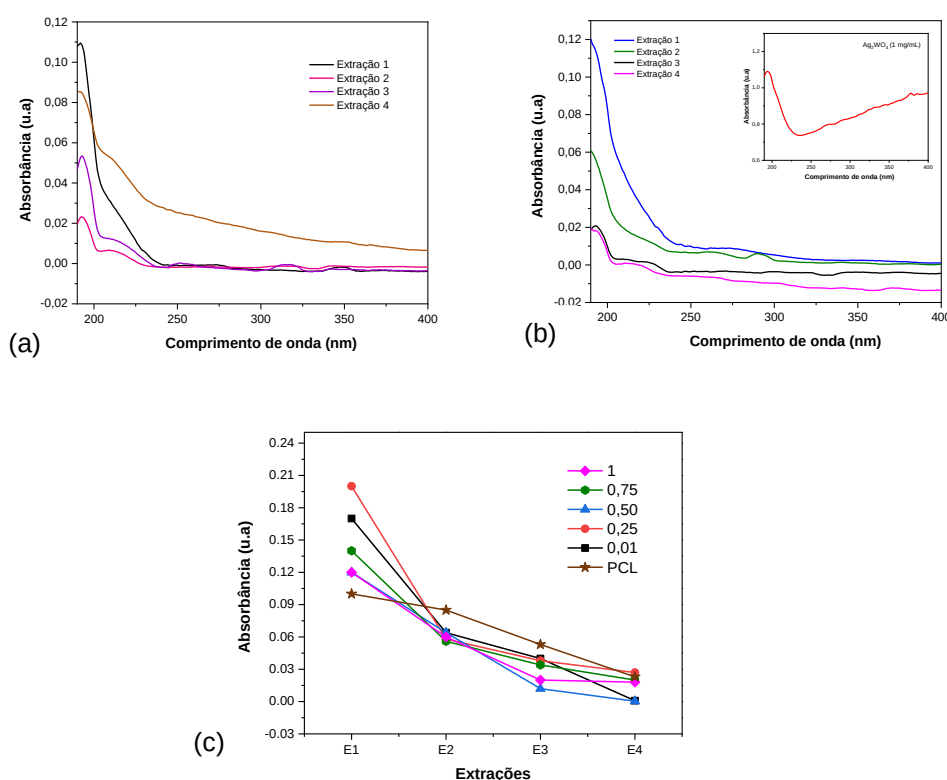
Os ensaios de liberação são bastante utilizados na liberação *in vitro* de medicamento, logo, é de suma importância compreender o perfil de liberação de novas substâncias, visando direcionar novos estudos e novas aplicações (Lohani et al., 2014), ainda se torna mais relevante, devido à escassez de estudos envolvendo $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$.

Os diferentes perfis de liberação das fibras de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ incorporadas na matriz polimérica da PCL são demonstrados na Figura 44. Esses perfis foram obtidos analisando as cinco proporções de 1:1, 0,75:1, 0,50:1, 0,25:1 e 0,1:1 com tempos de liberação de 30, 60, 90 e 120 minutos (Figura 44c).

Ao avaliar o perfil de liberação das microfibras de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, as fibras não apresentam perfil significativo de liberação, o que se observa que ocorre aumento mais acentuado na primeira extração de 30 minutos, mas após

30 minutos há uma queda na absorbância chegando a 0 (FIGURA 44c), esse mesmo comportamento é semelhante para as cinco membranas. Na Figura 44b a membrana na maior proporção apresentou absorbância de 0,12 na primeira extração de 30 minutos e o controle de tungstato de prata teve uma absorbância acima de 1,0. Ao comparar a curva de liberação de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro com as microfibras, verifica houve uma baixa liberação do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Entretanto, os perfis de liberação das fibras de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ são semelhantes ao observado no controle de PCL, no qual é visto que o polímero vai sendo liberado aos poucos, mas essa liberação pode estar acontecendo devido à baixa interação intermolecular da cadeia polimérica modificada com a estrutura química do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (Lohani et al., 2014).

Figura 44 - Perfil de liberação da membrana de PCL e as membranas de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$



Nota: sendo membrana de PCL (a), Membrana PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na proporção de 1:1 (b) e Comparação todas as membranas (c).

Ao associar esses resultados com os ensaios realizado com as células verifica que $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ a apesar da elevada toxicidade nas primeiras concentrações frente as células normais conforme reportadas na seção 7.6.

Pressupõem que as microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄, poderiam ser utilizadas no tratamento de infecções ou tumores sólidos, tendo em vista que os ensaios de liberação visam demonstrar a velocidade na liberação contínua de um medicamento no local da infecção, assim como, possibilita utilizar concentrações mais elevadas, com intuito de se obter melhores resultados (Lohani et al., 2014). Porém o presente estudo não avaliou o efeito citotóxico das fibras de PCL + α -Ag₂WO₄, frente as células normais e cancerígenas, e com isto, a uma necessidade urgente de verificar de forma mais aprofundada o efeito desse material nas células e realize ensaios que simule um ambiente mais próximo da aplicação desejada. Portanto, o desenvolvimento de microfibras com perfil de liberação entregues localmente pode ser uma oportunidade promissora para o tratamento eficiente de tumores sólidos ou infecções causadas por bactérias patogênicas (Lohani et al., 2014; Pereira et al., 2022).

Por outro lado, a policaprolactona já vêm sendo largamente utilizado na produção de biomateriais, devido à baixa toxicidade, permeabilidade e biocompatibilidade, possibilitando a aplicação na engenharia tecidual na produção de arcabouços usados como matrizes carregadoras de medicamentos, substâncias bioativas, fatores de crescimento entre outras (Bas et al., 2017; Zhang et al., 2021).

9.1.11. Teste de esterilidade por ozônio (O₃)

Os testes de esterilidade realizados, demonstrou que não houve turbidez nos meios de crescimento nem presença de colônias de bactérias e fungos nos meios isolados em placas, demonstrando ausência de contaminação por bactérias e fungos após o processo de esterilização por ozônio. Também foi avaliado as microfibras não esterilizadas e observou-se que não houve crescimento de bactérias, demonstrando que as microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄, são capazes de eliminar os microrganismos que estão na superfície da membrana ou podemos pressupor que durante o processo de eletrofiação não houve contaminação de contaminantes externos.

Na literatura vem sendo reportado o uso da esterilização por ozônio para eliminar uma variedade de microrganismos, além desta metodologia ser utilizada para esterilizar diversos materiais termossensíveis como as nanofibras, possibilitando manter a integridade do material, visto que as fibras não suportam

os processos de esterilização utilizados nos métodos convencionais (Redigueri 2017; Farias 2021).

Redigueri (2017) investigou também, se o tratamento de ozônio afetava a morfologia das fibras e o mesmo demonstrou que as micrografias esterilizadas com ozônio apresentavam morfologia lisas sem sinais de danos e sem alterações no diâmetro, corroborando com o nosso estudo, que não apareceu nem um pico adicional em FTIR.

9.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

9.2.1. Ensaios de Susceptibilidade (Kirby-Bauer)

O potencial antimicrobiano das cinco proporções de PCL + α -Ag₂WO₄ foram avaliados através do método de difusão em ágar. Os halos de inibição foram mensurados em milímetro (mm) possibilitando determinar o potencial de inibição das microfibras sobre os microrganismos susceptíveis. Na Tabela 12 são expressos os halos de inibição das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ que inibiu todas as cepas testadas semelhante ao observado com α -Ag₂WO₄ puro. Os melhores resultados foram contra as cepas de *Pseudomonas* que apresentaram médias de halos que variaram de ($22 \pm 0,55$ a $13 \pm 0,57$). Sendo que o melhor resultado foi contra a cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 15442), com halos de inibição nas cinco proporções de ($22 \pm 0,55$), ($21 \pm 0,55$), ($19 \pm 0,55$), ($18 \pm 0,55$) e ($16 \pm 0,55$) respectivamente. Seguido da cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00386) que apresentou halos de ($17 \pm 0,55$), ($17 \pm 0,55$), ($15 \pm 0,55$), ($15 \pm 0,55$) e ($14 \pm 0,55$), respectivamente.

Dentre as oito cepas de *E. coli*, pode-se observar que houve pequenas diferenças nos diâmetros dos halos, assim como apresentou halos de inibição na maior e menor proporção testada contra os oito patótipos. O maior halo de inibição foi de $16 \pm 0,55$ contra a cepa DAEC, seguido da ETEC-ST e EPEC que apresentou halos de ($16 \pm 0,51$) e ($15 \pm 0,55$) nas proporções de 1:1 e 0,75:1. Já contra as bactérias gram-positivas resultados foram similares com pequenas diferenças nos tamanhos dos halos, sendo que o melhor resultado foi contra a cepa de *S. aureus*. Vale salientar que o controle de PCL puro não apresentou halos de inibições frente as bactérias em estudo, confirmando principalmente que as fibras não retêm o solvente após a eletrofiação ao ponto de interferir nas análises, reforçando o estudo realizado por D'Amato et al (2018) que estuda e

afirma que as propriedades mecânicas das fibras que retêm o solvente após a eletrofiação mudam e evaporam ao longo do tempo. Esses achados reafirmam que as fibras de PCL são seguras para aplicação na engenharia de tecidos, andaimes, fabricação têxtil, filtração, dentre outros (D'Amato et al., 2018; Ferreira et al., 2022).

Tabela 12 - Média de halo de inibição das microfibras, frente aos oito patótipos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Bactérias	Médias de Halos (mm)							
	Microfibras de PCL + α -Ag ₂ WO ₄					Controles		
	1:1	0,75:1	0,50:1	0,25:1	0,1:1	CRO	TIAM	OXA
DAEC	16	16	14	13	13	20	-	-
ETEC-LT	15	15	15	15	14	20	-	-
ETEC-ST	16	15	15	14	13	21	-	-
EHEC	14	14	14	14	13	20	-	-
EAEC	15	15	14	13	13	21	-	-
EPEC	16	15	14	14	13	20	-	-
EIEC	15	15	15	14	12	21	-	-
<i>E. coli</i> nd	14	14	14	13	13	20	-	-
Pa (15442)	22	21	19	18	16	-	21	-
Pa (00386)	17	17	15	15	14	-	16	-
Pa (00313)	15	15	14	14	13	-	12	-
<i>S. aureus</i>	14	14	13	13	12	-	-	20
MRSA	13	13	13	12	12	-	-	20

Nota: *Pseudomonas aeruginosas* (P.a); tungstato de prata fase alfa (α -Ag₂WO₄); policaprolactona (PCL), milímetros (mm) e não testado (-).

Trabalhos recente vem utilizando a PCL para incorporação de diversas substâncias e materiais, como no trabalho de Ferreira e colaboradores, (2022) que incorpora o óleo essencial (OE) de *Lavandula luisieri*, e verifica uma redução de 99,33% contra *S. aureus* e 99, 29% contra *P. aeruginosa*. Outro trabalho recente realizado por Permyakova e colaboradores, (2022), verificou uma redução de 100% de *S. aureus* e *E. coli* em uma fibra incorporada com Óxido de zinco (ZnO) e PCL. Assim como outros trabalhos vêm produzindo membranas

de PCL eletrofiadas com aplicação para inibição do crescimento bacteriano (Chen; Lin, 2020; Chiesa et al., 2020).

Figura 45 - Fotografia dos halos de inibição das microfibras de policaprolactona com tungstato de prata, frente aos oito patótipos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina



9.2.2. Teste de ação Microbicida e Microbiostático

Para a comparação da eficácia das membranas frente as bactérias, utilizou-se os controles dos crescimentos bacterianos, assim como, foram utilizados os controles de drogas, que serviu como base de comparação da

eficácia na inibição e morte microbiana. Os controles de drogas apresentaram resultados conforme o esperado em todos os testes.

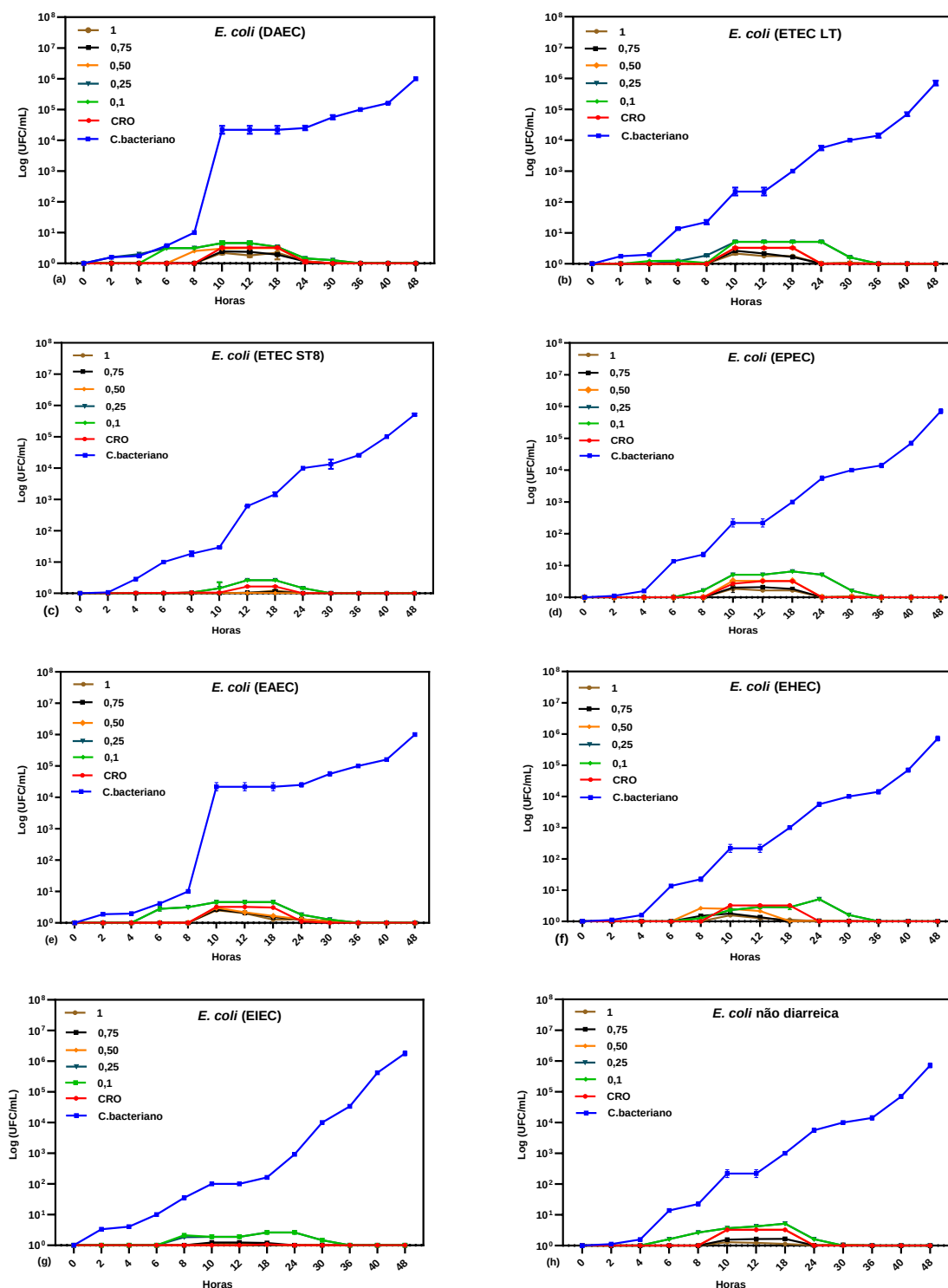
Foram avaliados o efeito microbicida e microbiostático das microfibras frente a oito patótipos de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e MRSA nas proporções de 1:1 a 0,1:1 Figura 46 e 47. Dentre as cepas de *E. coli* avaliadas, pode-se observar uma excelente atividade contra os oito patótipos. Sendo que os melhores efeitos microbicidas foram contra *E. coli* enterotoxigênica (ETEC ST) (FIGURA 46c) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (FIGURA 46g), com redução a zero no log UFC/mL nas proporções de 1:1 a 0,25:1. Na menor proporção de 0,1:1 também se observa um excelente efeito bacteriostática com um log próximo a zero. Nas demais cepas de *E. coli* os efeitos bactericidas e bacteriostáticos são semelhantes ao efeito observado no α -Ag₂WO₄, apresentando um aumento na log UFC/mL a partir dos intervalos de 4 a 36 horas, após o período de 36 horas, não foi possível verificar a presença de colônias. Outro comportamento que se assemelha ao α -Ag₂WO₄ puro, é a redução na log UFC/mL em todas as cinco proporções, ocorrendo uma pequena diferença na proporção de 0,1:1. O efeito bactericida das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ sobre as cepas patogênicas de *E. coli* são evidentes, demonstrando atuar principalmente na fase exponencial, um comportamento semelhante ao observado no α -Ag₂WO₄ puro.

Ao avaliar o efeito bactericida e bacteriostático das três cepas de *P. aeruginosa*, é possível verificar que houve uma redução a zero no log UFC/mL nas proporções de 1:1 e 0,75:1 (Figura 47i a 47k), sendo que a cepa de *P. aeruginosa* ATCC (15442) houve uma redução a zero no log UFC/mL até a proporção 0,25:1 (Figura 47i), assim como também observou-se um excelente efeito bactericida e bacteriostático contra a *P. aeruginosa* (INCQS 00386) e *P. aeruginosa* (INQS 00313), em comparação ao controle de crescimento bacteriano em todos os intervalos de tempo e proporções (Figura 47j e 47k). Os resultados com as microfibras foram similares ao α -Ag₂WO₄ nas proporções 1:1 e 0,75:1, já nas proporções a partir de 0,50:1 a 0,1:1 foram diferentes ao observado no α -Ag₂WO₄, que ocorreu um aumento na inibição entre 18 e 30 horas, mas após as 36 horas observou-se um comportamento microbicida e se manteve até às 48 horas. Já em relação às membranas ocorre uma inibição da log UFC/mL a partir das 6 horas na *P. aeruginosa* (INQS 00313) e contra a *P.*

aeruginosa ATCC (15442) e *P. aeruginosa* (INCQS 00386) a inibição ocorre a partir das 8 horas e o comportamento microbicida foi observado a partir de 30 horas na proporção de 0,50:1 frente as cepas de *P. aeruginosa* (INQS 00313) e *P. aeruginosa* (INCQS 00386). Já na menor proporção de 0,1:1 os comportamentos bacteriostáticos foram similares para as três cepas de *P. aeruginosa*. Em relação às cepas Gram-positivas, houve uma redução próximo a zero nas proporções (1:1 e 0,50:1) frente a cepa de MRSA, nas menores proporções também houve uma redução próximo a zero a partir das 10 horas (Figura 47l). Na curva da *S. aureus*, houve uma diminuição significativa na log UFC/mL próximo a zero nas proporções de 1:1 a 0,50:1 (Figura 47m). Nas demais proporções também se observa uma diminuição significativa na UFC/mL quando comparado ao controle de droga. No entanto dentre as cepas de *S. aureus* e MRSA, o melhor resultado observado foi contra a cepa MRSA.

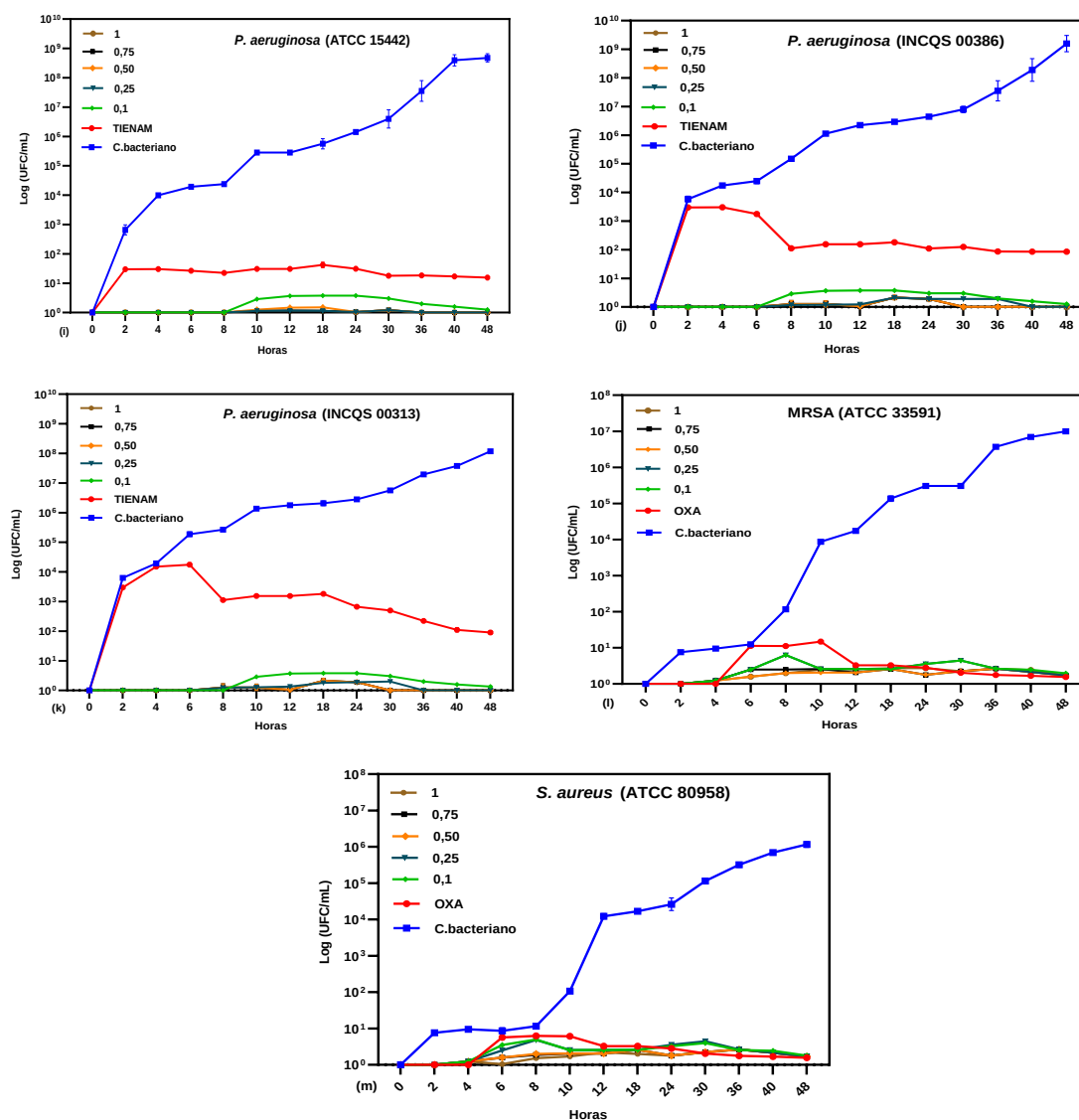
Os resultados obtidos com as nanofibras são similares ao observado ao α -Ag₂WO₄, demonstrando que o α -Ag₂WO₄ presente nas nanofibras não perdem seu efeito ao ser incorporado ao polímero de PCL e confirma a atividade de α -Ag₂WO₄, pois a ação microbicida de α -Ag₂WO₄ é bastante reportada na literatura, como pode ser visto no trabalho realizado por Alvarez-Roca et al., (2021) que avaliou atividade bactericida de α -Ag₂WO₄ tratada com radiação a laser e α -Ag₂WO₄ não tratados frente a MRSA, e os resultados demonstraram que o material não irradiado apresenta uma MIC de 125 μ g/mL, quando o material é irradiado, apresenta uma MIC de 3,91 μ g/mL em relação às amostras não tratadas. Um estudo realizado pelo nosso grupo também reportou excelente atividade de α -Ag₂WO₄ contra fungo como *Cândida albicans* e *Trichophyton rubrum* e bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli* (EHEC) (Nobre et al., 2019). Na triagem inicial do presente estudo foi publicado o artigo (CAPÍTULO 1) reportando as atividades contra diversas bactérias de interesse clínico como *Acinotobacter baumannii*, *Hafia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica* dentre outras (Bastos et al., 2022). Na literatura vêm sendo reportado que a melhoria da atividade antimicrobiana de α -Ag₂WO₄ está associada à formação de nanopartículas de prata (AgNPs) na superfície do α -Ag₂WO₄, que, de acordo com diversos estudos, apresentam excelente atividade bactericida contra diversos patógenos (Assis et al., 2019; Blosi et al., 2021).

Figura 46- Ação microbicida e microbiostático das membranas de policaprolactona com tungstato de prata, frente aos oito patótipos de *Escherichia coli*



Nota: *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) **(a)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) **(b)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) **(c)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) **(d)**; *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) **(e)**; *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) **(f)**; *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) **(g)**; *Escherichia coli* não diarreiogênica **(h)**.

Figura 47 - Ação microbicida e microbiostático das membranas de policaprolactona com tungstato de prata, frente às *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

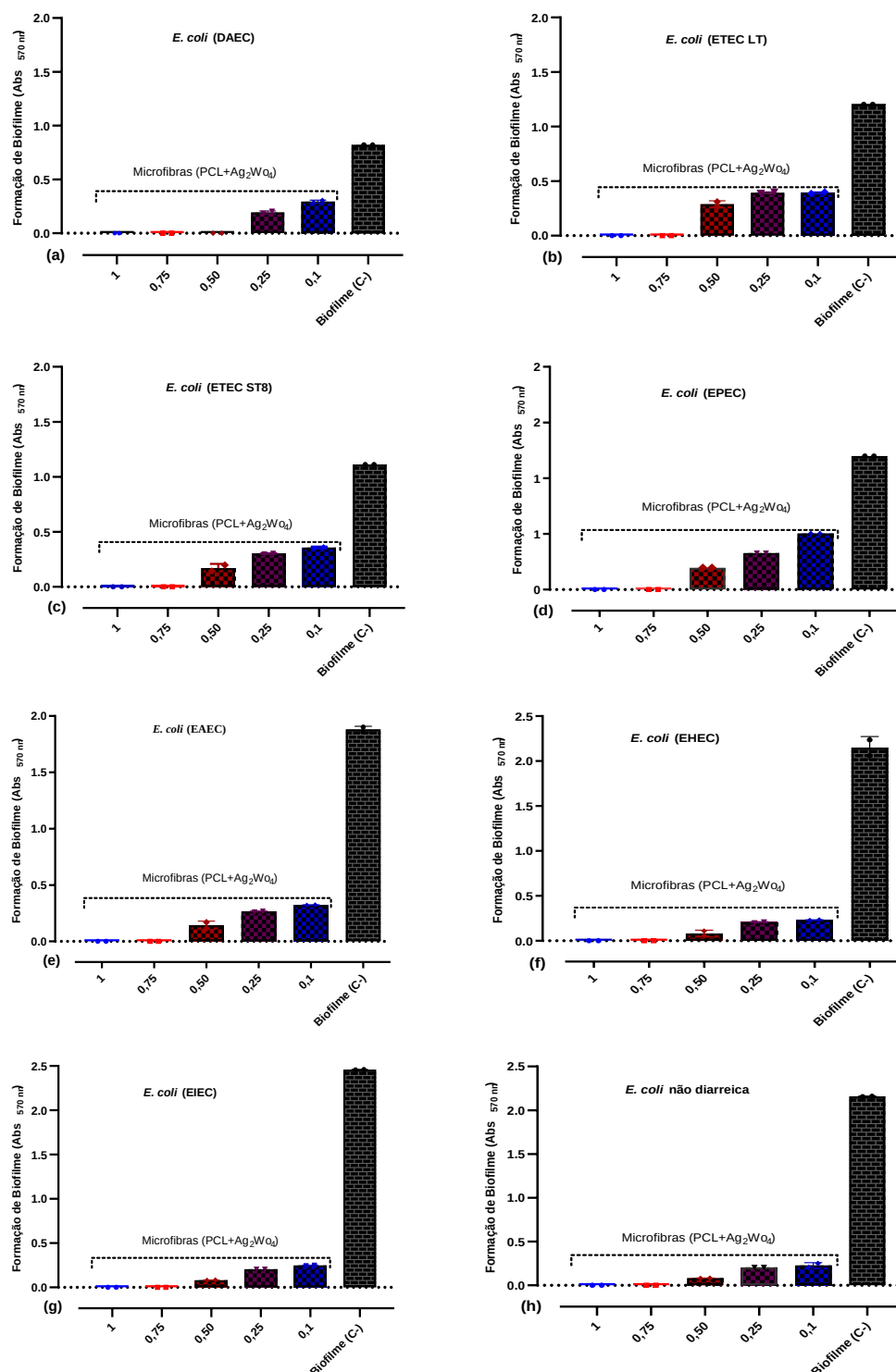


9.2.3. Atividade antibiofilme

Na busca por novas alternativas de prevenção, principalmente utilizando materiais metálicos, o estudo de materiais como $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ vêm se tornando novas opções de barreiras preventivas, tornando-se ainda mais vantajoso quando são incorporados aos polímeros para formar biomateriais compatíveis visando novas aplicações como em materiais têxtis (Pereira et al., 2022). Com isto o presente trabalho avaliou o efeito antibiofilme das microfibras de PCL com as diferentes proporções de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, que foram expostas por 48 horas frente aos oito patótipos de *E. coli*, três cepas de *P. aeruginosa* e as duas cepas de *Staphylococcus aureus* (FIGURA 48 e 49).

Dentre as cinco proporções avaliadas, houve uma redução a zero na absorbância da formação do biofilme contra os oito patótipos de *E. coli* nas proporções de 1:1 e 0,75:1. Os melhores resultados foram contra os patótipos DAEC, EHEC, EIEC e *E. coli* não diarreica em todas as proporções (FIGURA 48a, 48f, 48g e 48h). Também é possível verificar uma expressiva diminuição na D.O contra (ETEC LT, ETEC ST, EPEC e EAEC) nas proporções de 0,50:1, 0,25:1 e 0,01:1 (FIGURA 48b, 48c, 48d e 48e). A bactéria DAEC teve uma redução a zero na absorbância até a proporção de 0,50:1. A partir das proporções de 0,25:1 e 0,1:1 houve uma redução significativa na DO abaixo de 0,5 nas em comparação aos controles de crescimentos bacterianos (sem tratamento).

Figura 48 - A capacidade dos oito patótipos de *Escherichia coli* de produzir biofilme após a exposição as microfibras de policaprolactona com tungstato de prata



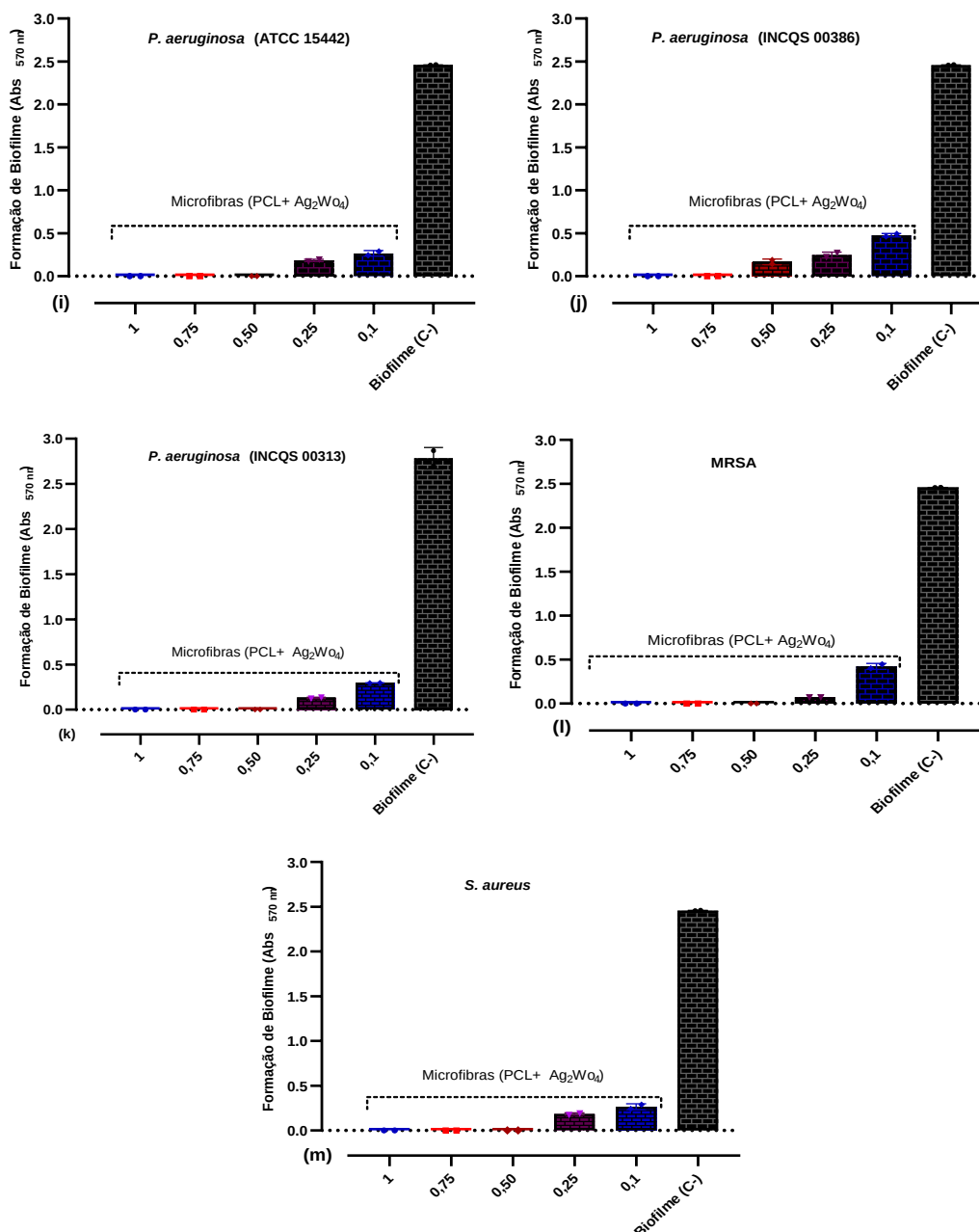
Nota: *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) **(a)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) **(b)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) **(c)**; *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) **(d)**; *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) **(e)**; *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) **(f)**; *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) **(g)**; *Escherichia coli* não diarreogênica **(h)**.

Ao avaliar o efeito antibiofilme das três *P. aeruginosa*, é possível verificar que houve uma redução a zero na absorbância da formação de biofilme semelhante a *E. coli* (FIGURA 49i, 49j e 49k). Os melhores efeitos antibiofilme foram nas cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *P. aeruginosa* (INQS 00313), com redução a zero na formação do biofilme até a proporção de 0,50:1 (FIGURA 49i e 49k), nas demais proporções ocorrem uma redução significativa na D.O em comparação aos controles de bactérias. Assim como também ocorre uma diminuição na absorbância da formação do biofilme de *P. aeruginosa* (INQS 00386) (FIGURA 49j).

Já contra as cepas Gram-positivas, observa-se uma redução a zero na formação do biofilme nas três primeiras proporções (1:1, 0,75:1 e 0,50:1) tanto na MRSA (FIGURA 49m) como na *S. aureus* (FIGURA 49l). Na menor proporção também houve uma redução significativa na absorbância abaixo de 0,5 nas duas cepas testadas.

Os resultados do presente estudo são promissores, mas pouco se sabe sobre a ação desses microcristais sobre biofilmes. Na literatura são reportadas mais recentemente, atividades antibiofilmes de fungos, como realizado no trabalho de Pimentel et al (2022), que verificou que o α -Ag₂WO₄ apresentou uma redução significativa de aproximadamente 1,5 log₁₀ ($p < 0,0001$) no biofilme, semelhante ao medicamento padrão de fluconazol e no estudo realizado por (Assis et al., 2019), porém ambos os estudos avaliam o α -Ag₂WO₄ puro ou irradiado por feixe elétrons.

Figura 49 - A capacidade das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de produzir biofilmes após a exposição às microfibras de policaprolactona com tungstato de prata



Os resultados obtidos se tornam relevantes, tendo em visto que α -Ag₂WO₄ e as microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ reduziram a formação de biofilme de todas as cepas avaliadas. Tendo em vista que a ação de um antibiofilme visa o controle ou destruição direto do biofilme, agindo principalmente na matriz de exopolissacarídeos, mas especificamente na estabilidade estrutural, assim como

também atua no enovelamento de cadeias vizinhas de polissacarídeos (Motta et al, 2021).

O controle na formação do biofilme se torna crucial tendo em vista que *P. aeruginosa* multicoloniza se juntando ao *S. aureus* e outras bactérias gram-negativas dificultando a sua eliminação nos diversos ambientes hospitalares (Pajon et al., 2023). Se torna ainda mais preocupante se os biofilmes entrarem nos tecidos e consequentemente causarem lesão tecidual e quadros de infecção aguda. Assim como algumas células de um aglomerado inicial podem se desprender da estrutura, invadir a corrente sanguínea e gerar novos biofilmes em tecidos saudáveis, levando a quadro de sepse generalizada (Motta et al, 2021). As nanofibras eletrofiadas se torna um material vantajoso no controle da formação e dispersão dos biofilmes nos ambientes hospitalares, tendo em vista que fibras poliméricas de tamanho sub-micron ou nanométrica podem capturar partículas pequenas abaixo de 0,2 μm , e se torna ainda mais vantajoso pois as bactérias possuem tamanhos que variam de 2 a 5 μm de comprimento, que podem ser facilmente capturadas (Assis et al., 2019; Blosi et al., 2021). Outro grande diferencial do estudo é que o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ é formado por aglomerados de nanopartículas de prata, que é acoplada a rede semicondutora de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, sendo que o semicondutor $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ tem a finalidade de atrair os microrganismos, sem ser detectado e as nanopartículas de prata na superfície tem o papel de neutralizar, impossibilitando a bactéria de se desprender e consequentemente possibilitando a morte da bactéria com mais rapidez (Assis et al., 2019; Blosi et al., 2021), isso explica os resultados obtidos no imageamento das análises de alterações celulares por microscopia eletrônica de varredura de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro, onde, observa-se as bactéria presas aos microcritais e também apresentarem uma morfologia mucóide que se envelopava e se prendia ao $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ (CAPÍTULO 2).

9.2.4. Análise de alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

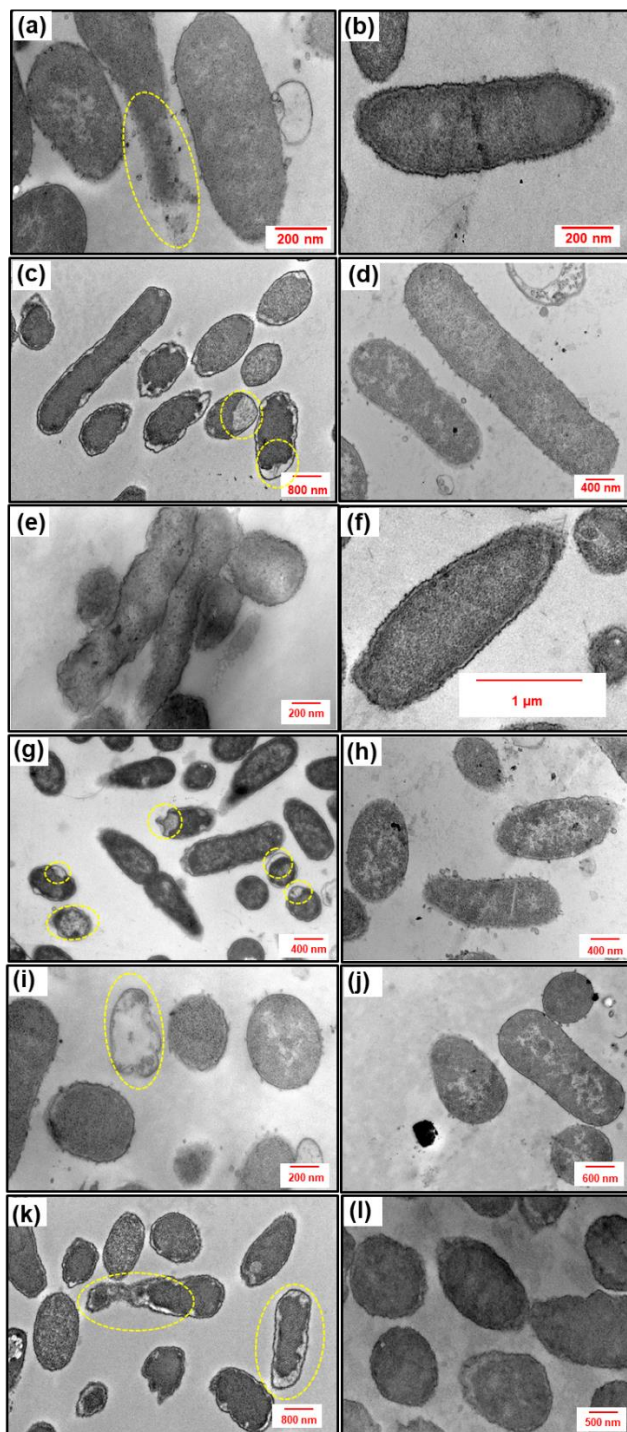
Para as análises de alterações celulares no MET foram realizados cortes ultrafinos nas bactérias tratadas com a microfibras de PCL + $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ com o objetivo de verificar as alterações celulares nas células semelhante ao observado com Ag_2WO_4 .

As células tratadas com a membrana na proporção de 1:1, exerceu um efeito semelhante nos oito patótipos de *E. coli*, igualmente observado no Ag_2WO_4 puro (CAPÍTULO 2), como estrutura interna em decomposição, fazendo com que o material citoplasmático fosse liberado para o meio extracelular (FIGURA 50a e 50e), rupturas na membrana plasmática (FIGURA 50g e 50k), desintegração da parede celular (FIGURA 50e, 50k), vacúolos (FIGURA 50c, 50k) diminuição do citoplasma (FIGURA 50i) e várias irregularidades na estrutura da parede (Alterações observadas em todas as figuras). Esses danos não foram visualizados nos controles das células não tratadas (FIGURA 50b, 50d, 50f, 50h, 50j e 50i).

Todas as imagens obtidas apresentaram alterações iguais nas células bacterianas de *E. coli*. Mas ao avaliar separadamente observou-se que houve maiores alterações nas células de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) (FIGURA 50c), *Escherichia coli* enteropatogênica típica (EPEC) (FIGURA 50e), *Escherichia coli* enteroenvasora (EIEC) (FIGURA 50g) e *Escherichia coli* não diarreiogênica tratada (FIGURA 50k). Menores alterações celulares e célula mais intacta, foram observadas em *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC) (FIGURA 50a), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (FIGURA 50i) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (imagens não mostradas) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-LT) (imagens não mostradas).

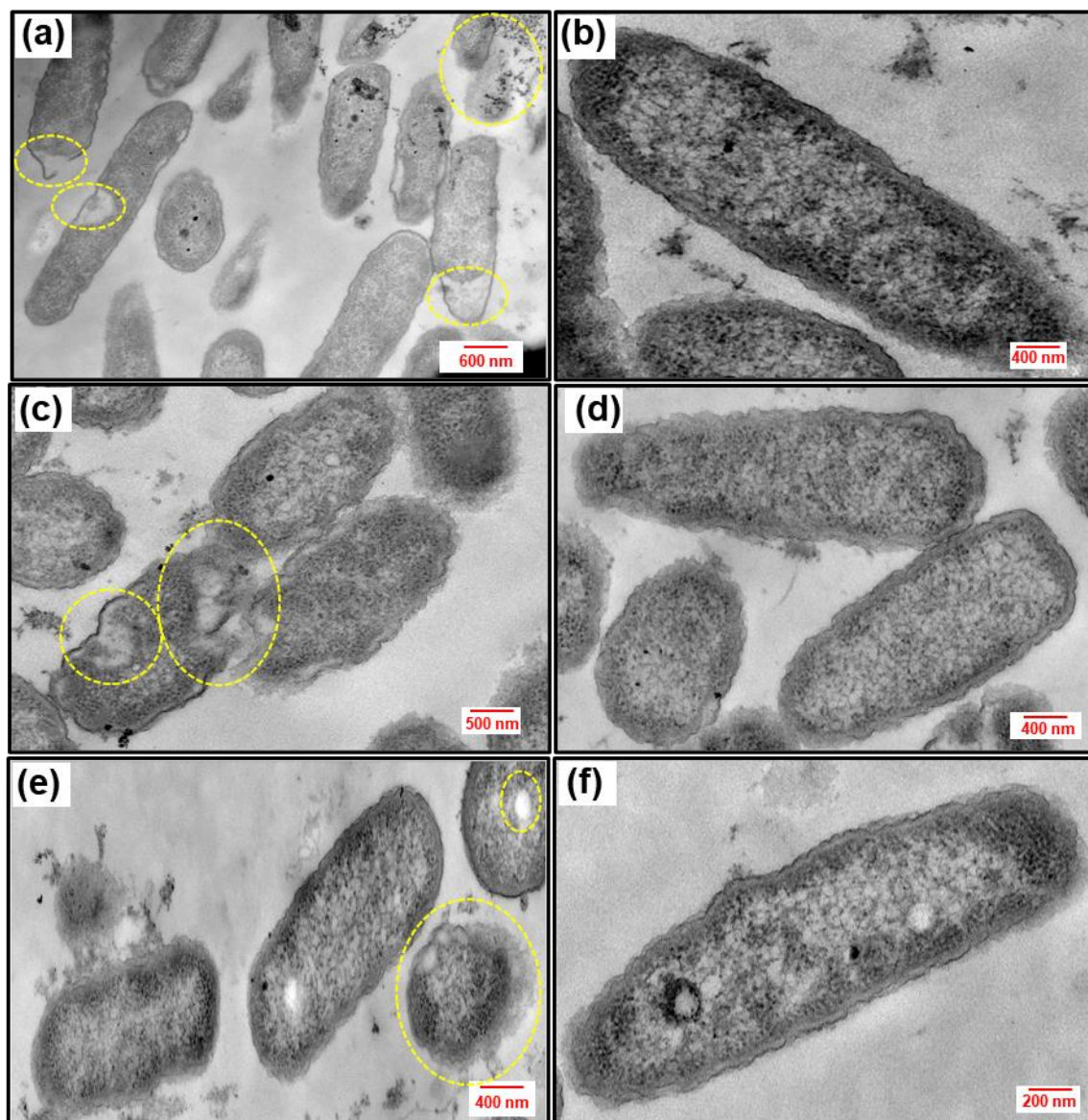
Já nas três cepas de *P. aeruginosa* não foram vistas células totalmente destruídas como observado no $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro, mas foram visualizadas com maior nitidez várias alterações morfológicas idênticas ao observado $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ puro (FIGURA 51). Nas células de *P. aeruginosa* (ATCC 15442) são visualizadas rupturas da estrutura externa, desintegração da parede celular e grandes vacúolos nas células (FIGURAS 51a). A cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00386) também foi visualizada a desintegração da parede celular, rupturas da estrutura externa e a decomposição da estrutura interna (FIGURA 51c).

Figura 50 - Micrografias eletrônicas de transmissão do efeito bacteriano da membrana na proporção de 1:1 exposta por 3 horas contra os oito patótipos de *Escherichia coli*



Nota: *Escherichia coli* aderência (DAEC) tratada **(a)** e não tratada **(b)**, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC-ST) tratada **(c)** e não tratada **(d)**, *Escherichia coli* enterotoxigênica típica (EPEC) tratada **(e)** e não tratada **(f)**, *Escherichia coli* enteroenvasora (EIEC) tratada **(g)** e não tratada **(h)**, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) tratada **(i)** e não tratada **(j)** e *Escherichia coli* não diarreio gênica tratada **(k)** e não tratada **(l)**.

Figura 51 - Alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão do efeito antibacteriano a microfibras de policaprolactona com tungstato de prata na proporção de 1:1 por 3 horas, frente às cepas de *P. aeruginosa*



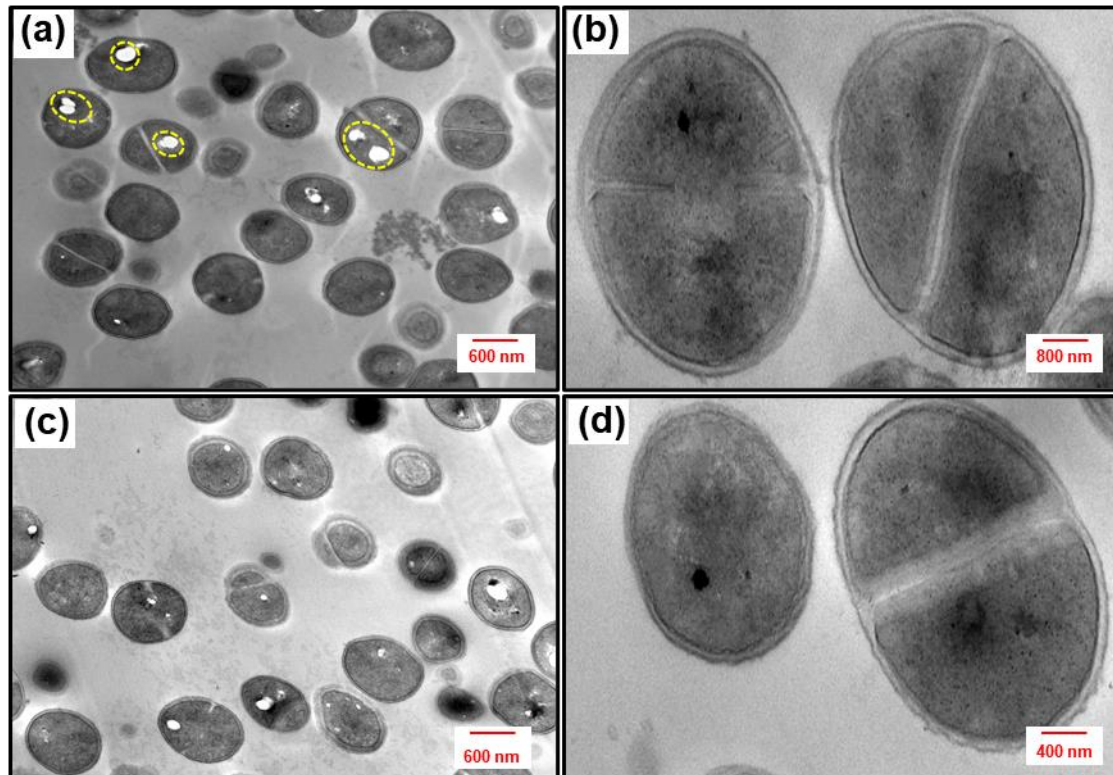
Nota: *P. aeruginosa* (ATCC 15442) tratada (a) e não tratada (b); *P. aeruginosa* (INCQS 00386) tratada (c) e não tratada (d) e *P. aeruginosa* (INCQS 00313) tratada (e) e não tratada (f).

Já em relação a cepa de *P. aeruginosa* (INCQS 00313), foram vistas células mais intactas semelhante ao observado no α -Ag₂WO₄. Conforme já relatado na (CAPÍTULO 2), essa é uma das bactérias que produz o pigmento pioverdina (verde), que é um dos isolados mais frequentemente relatados na literatura como estando relacionados aos ambientes hospitalares e o mais frequentemente associados a resistência aos tratamentos disponíveis. Os melhores resultados foram observados na cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 15442),

que também é um isolado que produz o pigmento pioverdina, considerado um fator de virulência associado a esta bactéria.

A ação das microfibras de PCL + α -Ag₂WO₄ sobre *S. aureus* e MRSA, foram similares aos danos causados pelo α -Ag₂WO₄ puro, no entanto com o α -Ag₂WO₄, observou-se células totalmente destruídas o que não foram vistas nas microfibras. Apenas foi verificado, grandes vacúolos na região do citoplasma (FIGURAS 52a e 52b). Assim como foram vistas diversas irregularidades nas formações septais e simetria, durante o processo de divisão celular, e havendo o encurtamento das células (FIGURAS 52b). Já no controle de células sem o tratamento é possível verificar a formação bem definida de septos ocorrendo no meio da célula, dividindo as células em duas células-filhas simétricas (FIGURAS 52h).

Figura 52 - Alterações celulares por microscopia eletrônica de transmissão do efeito antibacteriano à microfibra de policaprolactona com tungstato de prata na proporção de 1:1 por 3 horas, contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina



Nota: *Staphylococcus aureus* tratada (a) e não tratada (b) e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) tratada (d) e não tratada (f).

10. CONCLUSÃO

Devido ao constante aumento da disseminação associado às bactérias multirresistentes (MDRos) nos últimos anos, houve um aumento na busca de novas pesquisas que visam novas tecnologias e novos materiais estáveis e protetores que combatam e previnam as infecções causadas por microrganismos MDRos. Logo o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ se apresenta como uma substância eficiente para eliminar diversas cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Esse mesmo efeito é observado nas membranas com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, esses materiais a base de fibras poliméricas com tamanho nanométrico são materiais que apresentam características excepcionais, possibilitando camadas de nanofibras poliméricas com excelentes aplicações bacterianas em filtros de alta eficiência, máscaras faciais e roupas de proteção projetadas para proteger contra riscos biológicos e partículas transportadas pelo ar.

Nesse estudo são demonstrados que tanto o $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ como as membranas de PCL+ $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ apresentaram alta eficiência na redução da formação de antibiofilmes nos estágios planctônicos, impedindo as células de se aderirem as superfícies e causar agravamento principalmente em pessoas debilitadas.

Assim como apresenta excelente ação microbicida, principalmente atuando na fase exponencial impedindo a replicação das células bacterianas.

A toxicidade observada com as células não cancerígenas e cancerígenas direcionaram o presente estudo visando novas aplicações. Portanto, é importante ressaltar a importância de estudos futuros e mais aprofundados, acerca da toxicidade de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e membranas de PCL+ $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. Assim, como a encapsulação por precipitação pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a sua citotoxicidade.

Foram observados excelentes mecanismos de ação de $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e membranas de PCL+ $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ em todas as células bacterianas, mais ainda a necessidade de explorar de forma mais detalhada esse mecanismo e como atuam, tendo em vista que cada bactéria possui mecanismos de resistência e mecanismo de ação que se diferem de acordo com cada espécie bacteriana.

Os resultados apresentados com as membranas neste estudo, são considerados inéditos até o momento, tornando-se possível a investigação em diferentes campos da tecnologia, principalmente visando desenvolvimento de novas tecnologias baseadas na funcionalização de NFs, e posterior aplicação em tecido têxtil, como também em diversos objetos e superfícies que vise diminuir a propagação de bactérias por meio de contatos. Levando em consideração que os achados no presente estudo foram possíveis obter membranas uniforme e aleatoriamente distribuídas, que ao incorporar o α - Ag_2WO_4 no polímero de PCL os efeitos bacterianos se mantiveram em todas as proporções.

11. REFERÊNCIAS

AIRES, Ana Margarida Machado. Biodispositivos electrónicos implantáveis e biodegradáveis: nano/microfibras de poli (ϵ -caprolactona) (PCL). Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2012.

ALGAMMAL, Abdelazeem M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): one health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, p. 3255-3265, 2020.

ALSHABANAH, L. A. et al. Elastic nanofibrous membranes for medical and personal protection applications: Manufacturing, anti-COVID-19, and anti-colistin resistant bacteria evaluation. **Polymers**, v. 13, n. 22, 1 nov. 2021.

ALVAREZ-ROCA, R. et al. Selective Synthesis of α -, β -, and γ - Ag_2WO_4 : Promising Platforms for Photocatalytic and Antibacterial Materials. **Inorganic Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 1062–1079, 18 jan. 2021.

ANDRADE, Mariana Moreira et al. The history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2020, p. 1-18, 2020.

ANDREGHETTO, Flavia Maziero et al. Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e em cultura primária de queratinócitos orais. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, p. 442-448, 2011.

ANDRÉS, Juan et al. Structural and electronic analysis of the atomic scale nucleation of Ag on α - Ag_2WO_4 induced by electron irradiation. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2014.

ANITASARI, Silvia; WU, Ching-Zong; SHEN, Yung-Kang. PCL/Graphene Scaffolds for the Osteogenesis Process. **Bioengineering**, v. 10, n. 3, p. 305, 2023.

ANVISA, OPAS, OMS. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Organização Pan-Americana da saúde / Ministério da Saúde). Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde Relatório Anual 2008 Termo de Cooperação **37 (TC 37)**, Brasília, 2009.

ASSIS, M. et al. Ag Nanoparticles/ α - Ag_2WO_4 Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

AYOBAMI, O. et al. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 443–451, 31 dez. 2022.

BAS, O. et al. Biofabricated soft network composites for cartilage tissue engineering. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, p. 025014, 12 maio 2017.

BASTOS, Ivanildes dos Santos et al. Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da Região Amazônica. 2015.

BASTOS, I. S. et al. Silver tungstate microcrystals and their performance over several clinical multidrug resistant microorganisms. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 647, 20 Ago. 2022.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4_ts, p. 493-496, 1966.

BEHZADI, Payam; BARÁTH, Zoltán; GAJDÁCS, Márió. It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 42, 2021.

BERTINAT, Romina et al. Preclinical and clinical studies for sodium tungstate: application in humans. **Journal of clinical & cellular immunology**, v. 6, n. 1, 2015.

BLAIR, Jessica MA et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

BLANCO, P. et al. Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, 1 mar. 2016.

BLOSI, M. et al. Polyvinyl alcohol/silver electrospun nanofibers: Biocidal filter media capturing virus-size particles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 46, 10 dez. 2021.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.616 de 12 de maio de 1998: Dispõe sobre diretrizes e normas para a prevenção eo controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1998.

CASSINI, Alessandro et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 56-66, 2019.

ÇAY, A. et al. Crosslinking of poly (vinyl alcohol) nanofibres with polycarboxylic acids: biocompatibility with human skin keratinocyte cells. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 20, p. 12098–12108, 13 out. 2017.

CHEN, Hua-Wei; LIN, Min-Feng. Characterization, biocompatibility, and optimization of electrospun SF/PCL/CS composite nanofibers. **Polymers**, v. 12, n. 7, p. 1439, 2020.

CHIESA, Enrica et al. Graphene nanoplatelets for the development of reinforced PLA–PCL electrospun fibers as the next-generation of biomedical mats. **Polymers**, v. 12, n. 6, p. 1390, 2020.

CHONG, Yong; SHIMODA, Shinji; SHIMONO, Nobuyuki. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 185-188, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard – Ninth edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45, 23 ago. 2017.

D'AMATO, Anthony R. et al. Solvent retention in electrospun fibers affects scaffold mechanical properties. **Electrospinning**, v. 2, n. 1, p. 15-28, 2018.

DESVAUX, M. et al. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 25 set. 2020.

DIAS, Ricardo Souza; ZUCCOLI, Paola Couto. Infecção hospitalar por *S. aureus* e fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome do Choque Tóxico-Revisão. Nosocomial infection by *S. aureus* and risk factors for the development of toxic shock syndrome. NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências, v. 2, n. 03, p. 27-37, 2012.

DULNIK, J. et al. Biodegradation of bicomponent PCL/gelatin and PCL/collagen nanofibers electrospun from alternative solvent system. **Polymer Degradation and Stability**, v. 130, p. 10–21, Ago. 2016.

DZIDIC, Senka; ŠUŠKOVIĆ, JA goda; KOS, Blaženka. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.

FARIAS, Taisa Lorene Sampaio et al. Desenvolvimento e caracterização de membranas de poli (ϵ -caprolactona) eletrofiadas e modificadas com heparina e ácidos graxos essenciais para aplicação biomédica. 2021. Dissertação de mestrado.

FERREIRA, E. F. et al. Sustainable Packaging Material Based on PCL Nanofibers and Lavandula luisieri Essential Oil, to Preserve Museological Textiles. **Polymers**, v. 14, n. 3, 1 fev. 2022.

FOGGI, C. C. et al. Synthesis and evaluation of A- Ag_2WO_4 as novel antifungal Agent. **Chemical Physics Letters**, v. 674, p. 125–129, 2017.

FURTADO, D. M. F. et al. Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 10, n. 0, set. 2019.

GHOSH, S. K. et al. Electrospun gelatin nanofiber based self-powered bio-e-skin for health care monitoring. **Nano Energy**, v. 36, p. 166–175, jun. 2017.

GIULIERI, S. G.; TONG, S. Y. C.; WILLIAMSON, D. A. Using genomics to understand meticillin-and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Microbial Genomics**, v. 6, n. 1, 2020.

GOH, Ee-Been et al. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 26, p. 17025-17030, 2002.

GONG, T. et al. Design Redox-Sensitive Drug-Loaded Nanofibers for Bone Reconstruction. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 1, p. 240–247, 8 jan. 2018.

GONZALEZ, E. et al. Green electrospinning of polymer latexes: A systematic study of the effect of latex properties on fiber morphology. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 1 mar. 2021.

GORMAN, A.; GOLOVANOV, A. P. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2022.

GROVE, Donald Cooper; RANDALL, William A. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. 1955.

HABOURIA, Hajer et al. A newly identified group of P-like (PL) fimbria genes from extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) encode distinct adhesin subunits and mediate adherence to host cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 13, p. e01421-21, 2022.

HE, Liumin et al. Electrospraying and electrospinning for nanobiomaterial fabrication. **Nanobiomaterials: Classification, Fabrication and Biomedical Applications**, 2018.

HOLMES, N. E. et al. Morbidity from in-hospital complications is greater than treatment failure in patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 5 mar. 2018.

HORCAJADA, J. P. et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

HUANG, Lei et al. Urinary tract infection etiological profiles and antibiotic resistance patterns varied among different age categories: a retrospective study from a tertiary general hospital during a 12-year period. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 813145, 2022.

HUSSEIN, M. A. M. et al. Chitosan/gold hybrid nanoparticles enriched electrospun pva nanofibrous mats for the topical delivery of punica granatum l. Extract: Synthesis, characterization, biocompatibility and antibacterial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 5133–5151, 2021.

IBRAHIM, Y. S. et al. Melt Electrospinning Designs for Nanofiber Fabrication for Different Applications. **International journal of molecular sciences** NLM (Medline), 17 maio 2019.

JIANG, A. M. et al. Nosocomial infections in gastrointestinal cancer patients: Bacterial profile, antibiotic resistance pattern, and prognostic factors. **Cancer ManAgement and Research**, v. 12, p. 4969–4979, 2020.

JURADO-MARTÍN, Irene; SAINZ-MEJÍAS, Maite; MCCLEAN, Siobhán. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

KADAVIL, H. et al. Sputtering of electrospun polymer-based nanofibers for biomedical applications: A perspective. **Nanomaterials**MDPI AG, 1 jan. 2019.

KAKOULLIS, Loukas et al. Mechanisms of antibiotic resistance in important gram-positive and gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 415, 2021.

KHANZADA, H. et al. Fabrication of promising antimicrobial aloe vera/PVA electrospun nanofibers for protective clothing. **Materials**, v. 13, n. 17, 2020.

KHOSRAVI, Alireza et al. Immobilization of silk fibroin on the surface of PCL nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 37, p. 46684, 2018.

KIM, S. W. et al. Fabrication and Characterization of Cellulose Acetate/Montmorillonite Composite Nanofibers by Electrospinning. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

KRAEMER, M. U. G. et al. The effect of human mobility and control measures on the COVID-19 epidemic in China. **Science**, v. 368, n. 6490, p. 493–497, maio 2020.

KUMAR, Sanath; VARELA, Manuel F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial Agents. **Chemotherapy**, v. 14, p. 522-534, 2013.

KUNTZLER, Suelen Goettems et al. Development of a colorimetric pH indicator using nanofibers containing *Spirulina* sp. LEB 18. **Food chemistry**, v. 328, p. 126768, 2020.

LAGERQVIST, Nina et al. Outbreak of gastroenteritis highlighting the diagnostic and epidemiological challenges of enteroinvasive *Escherichia coli*, County of Halland, Sweden, November 2017. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 9, p. 1900466, 2020.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. **Clinical microbiology reviews** NLM (Medline), 1 out. 2018.

LAYER, Franziska et al. Dissemination of linezolid-dependent, linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates belonging to CC5 in German hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1181-1184, 2018.

LEE, Jun Bong; KIM, Se Kye; YOON, Jang Won. Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. **Journal of Veterinary Science**, v. 23, n. 2, 2022.

LEE, Kyung-Soo; JEONG, Yu-Jin; LEE, Moo-Seung. *Escherichia coli* Shiga toxins and gut microbiota interactions. **Toxins**, v. 13, n. 6, p. 416, 2021.

LEMOS, P. S. et al. Synthesis and characterization of metastable β - Ag_2WO_4 : An experimental and theoretical approach. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 3, p. 1185–1191, 2016.

LI, Siying et al. Electrospun antibacterial poly (vinyl alcohol)/Ag nanoparticles membrane grafted with 3, 3', 4, 4'-benzophenone tetracarboxylic acid for efficient air filtration. **Applied surface science**, v. 533, p. 147516, 2020

LI, X. Z.; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 337–418, 2015.

LIAO, Chongbing et al. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 926758, 2022.

LIU, B. et al. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. **FEMS Microbiology Reviews** Oxford University Press, 1 nov. 2020.

Liu, D. (2019). *Escherichia coli*. In *Encyclopedia of Microbiology*, p. 171–182, 2019.

LIU, Yanli et al. *Escherichia coli* causing neonatal meningitis during 2001–2020: a study in eastern China. **International Journal of General Medicine**, p. 3007-3016, 2021.

LIU, Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIU, X. Electrospinning and emerging healthcare and medicine possibilities. **APL Bioengineering** American Institute of Physics Inc., 1 set. 2020.

LOHANI, Alka et al. Interpenetrating polymer networks as innovative drug delivery systems. **Journal of drug delivery**, v. 2014, 2014.

LONGO, Elson et al. Direct in situ observation of the electron-driven synthesis of Ag filaments on α -Ag₂WO₄ crystals. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2013.

MACEDO, N. G. et al. Surfactant-Mediated Morphology and Photocatalytic Activity of α -Ag₂WO₄. Material. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 15, p. 8667–8679, 19 abr. 2018.

MACKINNON, M. C. et al. Evaluation of the health and healthcare system burden due to antimicrobial-resistant *Escherichia coli* infections in humans: a systematic

review and meta-analysis. **Antimicrobial Resistance and Infection Control** BioMed Central Ltd, 1 dez. 2020.

MERCADO COMUM DO SUL - MERCOSUL. **MERCOSUL/ GMC/RES. nº 02/12.** Regulamento técnico Mercosul sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos.

MERCANTE, L. A. et al. Electrospun nanofibers and their applications: advances in the last decade. **Química Nova** Sociedade Brasileira de Química, 2021.

MISHRA, R. K. et al. Electrospinning production of nanofibrous membranes. **Environmental Chemistry Letters** Springer, 15 jun. 2019.

MOCHANE, M. J. et al. Morphology and properties of electrospun PCL and its composites for medical applications: A mini review. **Applied Sciences (Switzerland)** MDPI AG, 1 jun. 2019.

MOHAMED, Abdellatif et al. Thermal properties of PCL/gluten bioblends characterized by TGA, DSC, SEM and infrared-PAS. **Journal of applied polymer science**, v. 110, n. 5, p. 3256-3266, 2008.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Research Foundation, 15 fev. 2017.

MORAES, João de Deus Pereira et al. **Influência da adição de surfactantes em fibras altamente alinhadas de poli (caprolactona) obtidas por eletrospinning.** Dissertação de mestrado. 2015.

MORAES, João de Deus Pereira et al. Investigação da Irradiação Ultravioleta em Filmes Blend de PS/PCL. **Revista Europeia de Pesquisa em Engenharia e Tecnologia**, v. 6, n. 2, pág. 29-33, 2021.

MORI, A. et al. 3D printing and electrospinning of composite hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. **Polymers** MDPI AG, 8 mar. 2018.

MOTTA, Jean-Paul; HAKANSSON, Anders P.; LEE, Samuel A. Microbial biofilms interacting with host mucosal surfaces. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 1049347, 2022.

MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 12 fev. 2022.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia médica. 7. ed. Elsevier Rio de Janeiro, 2014.

NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NOBRE, F. X. et al. Antimicrobial properties of α -Ag₂WO₄ rod-like microcrystals synthesized by sonochemistry and sonochemistry followed by hydrothermal conventional method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 58, 1 nov. 2019.

NOLAN, Charlotte; BEHRENDTS, Volker. Sub-inhibitory antibiotic exposure and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1393, 2021.

OLIVEIRA, David MP et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr.00181-19, 2020.

OMS – Organização Mundial da Saúde: Acessado 25 de setembro de 2023: <https://www.paho.org/pt/noticias/6-5-2022-oms-lanca-primeiro-relatorio-mundial-sobre-prevencao-e-controle-infeccoes>, 2022.

PAKBIN, Babak; BRÜCK, Wolfram M.; ROSSEN, John WA. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9922, 2021.

PEREIRA, P. F. S. et al. Inactivation of SARS-CoV-2 by a chitosan/ α -Ag₂WO₄ composite generated by femtosecond laser irradiation. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, dez. 2022.

PERMYAKOVA, Elizaveta S. et al. Electrospun Polycaprolactone/ZnO Nanocomposite Membranes with High Antipathogen Activity. **Polymers**, v. 14, n. 24, p. 5364, 2022.

PIMENTEL, B. N. A. DA S. et al. Antifungal Activity and Biocompatibility of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ Using a Three-Dimensional Coculture Model of the Oral Mucosa. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 14 fev. 2022.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANNA, P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews** American Society for Microbiology, 1 abr. 2017.

PRASAD, T. et al. Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 1, p. 28, 13 jan. 2015.

RAEISPOUR, Maryam; RANJBAR, Reza. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

RAMACHANDRAN, R. et al. Theranostic 3-Dimensional nano brain-implant for prolonged and localized treatment of recurrent glioma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 43271, 6 abr. 2017.

RAMÍREZ-CEDILLO, Erick et al. Electrospun polycaprolactone fibrous membranes containing Ag, TiO₂ and Na₂Ti₆O₁₃ particles for potential use in bone regeneration. **Membranes**, v. 9, n. 1, p. 12, 2019.

REDIGUIERI, C. F., DE BANK, P. A., ZANIN, M. H. A., LEO, P., CERIZE, N.N. P., DE OLIVEIRA, A. M., PINTO, T. J. A. - **The effect of ozone gas sterilization on the properties and cell compatibility of electrospun polycaprolactone scaffolds**. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 28, n. 16, p. 1918–1934, nov. 2017.

ROCA, R. A. et al. Uncovering the metastable γ -Ag₂WO₄ phase: A joint experimental and theoretical study. **RSC Advances**, v. 7, n. 10, p. 5610–5620, 2017.

ROSSATO, Adriana Medianeira. Análise molecular de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina com heterorresistência à vancomicina oriunda de Porto Alegre. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2021.

ROZWADOWSKI, Marcin; GAWEL, Damian. Molecular factors and mechanisms driving multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*—An update. **Genes**, v. 13, n. 8, p. 1397, 2022.

SANTOS, Adriana Oliveira dos et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277-281, 2008.

SANTOS, Roseny Dinah et al. Produção enzimática de poli (ε-caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico. 2012.

SEGUNDO, J. D. P. et al. Synthesis of gallic acid imprinted polymer and incorporation in poly (caprolactone) mat via electrospinning. **Express Polymer Letters**, v. 15, n. 7, 2021.

SILVA, F. H. DA et al. Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes. [s.l.] Latin American Publicações, 2020a.

SILVA, R. A. DA et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 607–623, set. 2020b.

SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, p. 844-855, 2006.

SIMANEK, Kayla A.; PACZKOWSKI, Jon E. Resistance is not futile: the role of quorum sensing plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* infections and its link to intrinsic mechanisms of antibiotic resistance. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1247, 2022.

SIONOV, Ronit Vogt; STEINBERG, Doron. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1239, 2022.

SOLTANI, S. et al. Recent progress in the design and synthesis of nanofibers with diverse synthetic methodologies: characterization and potential applications. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 23, p. 9581–9606, 2020.

SOUSA, Telma et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12892, 2021.

STOLL, Barbara J. et al. Early-onset neonatal sepsis 2015 to 2017, the rise of *Escherichia coli*, and the need for novel prevention strategies. **JAMA pediatrics**, v. 174, n. 7, p. e200593-e200593, 2020.

SUÁREZ, Diego Fernando et al. Uniaxial and Coaxial Nanofibers PCL/Alginate or PCL/Gelatine Transport and Release Tamoxifen and Curcumin Affecting the Viability of MCF7 Cell Line. **Nanomaterials**, v. 12, n. 19, p. 3348, 2022.

SWOLANA, Denis et al. Antibiofilm Effect of Silver Nanoparticles in Changing the Biofilm-Related Gene Expression of *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9257, 2022.

THI, Minh Tam Tran; WIBOWO, David; REHM, Bernd HA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020.

TORRES-PUIG, Sergi et al. “Omics” technologies-what have they told us about uropathogenic *Escherichia coli* fitness and virulence during urinary tract infection? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 824039, 2022.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 4. ed. Atheneu, 2004.

TUMMLER, Burkhard. Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*. **F1000Research**, v. 8, 2019.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, 1 abr. 2019.

VAN DEN BERG, A. J.; JUFFERMANS, C. A. H. The polymorphism of silver tungstate Ag_2WO_4 . **Journal of Applied Crystallography**, v. 15, n. 1, p. 114-116, 1982.

WEINER-LASTINGER, Lindsey M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 1-18, 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021b.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization, 2017.

WHO - World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data. Acessado dia 14 de setembro de 2023: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/351141>, 2022.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance (WHO) Acessado dia 22 de agosto de 2022 <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>. 2021a.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 global health issues to track in 2021. 2020. Acessado dia 14 de setembro de 2023: <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>.

WOODRUFF, Maria Ann; HUTMACHER, Dietmar Werner. The return of a forgotten Polymer-Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 1996–2011, 5 dez. 2011.

XUE, J. et al. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. **Chemical Reviews**American Chemical Society, 24 abr. 2019.

YANG, Y. et al. Tunable drug release from nanofibers coated with blank cellulose acetate layers fabricated using tri-axial electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 228–237, Jan. 2019.

YIN, Anlin et al. Electrospinning collagen/chitosan/poly (ϵ -lactic acid-co- ϵ -caprolactone) to form a vascular graft: Mechanical and biological characterization. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 101, n. 5, p. 1292-1301, 2013.

YIN, W. et al. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2 Jul. 2019.

YOON, E. J.; JEONG, S. H. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**Frontiers Media S.A., 18 fev. 2021.

YU, Y. et al. Biosafety materials: an emerging new research direction of materials science from the COVID-19 outbreak. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 4, n. 7, p. 1930–1953, 2020.

ZANETTI, M. et al. Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, p. 198–207, 1 abr. 2019.

ZHANG, D. et al. Electrospun Fibrous Membranes with Dual-Scaled Porous Structure: Super Hydrophobicity, Super Lipophilicity, Excellent Water Adhesion, and Anti-Icing for Highly Efficient Oil Adsorption/Separation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 5, p. 5073–5083, 6 fev. 2019.

ZHANG, Y. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, fev. 2018.

ZHANG, Y. et al. Thermal stability and dynamic mechanical properties of poly (ϵ -caprolactone)/chitosan composite membranes. **Materials**, v. 14, n. 19, 1 out. 2021.

ZHANG, Yucheng et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2055943, 2022.

ZOHRA, Tanzeel et al. Cracking the challenge of antimicrobial drug resistance with CRISPR/Cas9, nanotechnology and other strategies in ESKAPE pathogens. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 954, 2021.