



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUSTAVO HENRIQUE MIGLIORINI GUIDONE

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CATETER REVESTIDO
INTERNAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
CONTRA BACTÉRIAS UROPATOGÊNICAS**

Londrina
2025

GUSTAVO HENRIQUE MIGLIORINI GUIDONE

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CATETER REVESTIDO
INTERNAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
CONTRA BACTÉRIAS UROPATOGÊNICAS**

Tese de doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato
da Rocha

Londrina
2025

GUSTAVO HENRIQUE MIGLIORINI GUIDONE

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CATETER REVESTIDO
INTERNAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
CONTRA BACTÉRIAS UROPATOGÊNICAS**

Tese de doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato
da Rocha
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira
Júnior
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Eliana Carolina
Vespero
Universidade Estadual de
Londrina

Prof. Dra. Sara Scandorieiro
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 27 de fevereiro de 2025.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Guidone, Gustavo Henrique Migliorini .

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CATETER REVESTIDO INTERNAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA CONTRA BACTÉRIAS UROPATOGÊNICAS / Gustavo Henrique Migliorini Guidone. - Londrina, 2025. 75 f. : il.

Orientador: Sérgio Paulo Dejato da Rocha.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Infecções urinárias associadas a cateter - Tese. 2. Biofilme - Tese. 3. Revestimento antimicrobiano - Tese. 4. Assistência em saúde - Tese. I. da Rocha, Sérgio Paulo Dejato . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

Agradecimentos

Agradecer é o ato de reconhecer boas ações feitas por outros que tiveram impactos positivos em nossas vidas. Estar disposto a agradecer é demonstrar carinho e apreço por todos que fizeram parte da nossa trajetória.

Por este motivo, deixo aqui meus mais sinceros agradecimentos às pessoas que estiveram ao meu lado ao longo do meu caminho acadêmico, apoiando, incentivando e compartilhando momentos importantes.

Aos meus pais, Maria Cecília e Nilson e minha irmã, Mariana, por todo o incentivo, apoio e amor incondicional, que sempre me motivaram a seguir meus estudos e buscar sempre realizar meu melhor para realizar os meus sonhos.

À minha parceira de vida, Jennifer, por seu apoio, por ser minha força e minha maior incentivadora, sempre acreditando em mim e nos meus sonhos, mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha querida parceira de laboratório e amiga, Luana, pelo companheirismo e dedicação a pesquisa. Nossa amizade não termina aqui, será carregada por toda a vida.

Aos melhores parceiros de laboratório, Arthur, Bruno e Victor, por me ensinarem mais do que ensinei a vocês, pela colaboração, amizade e por tornarem o ambiente de trabalho mais leve, descontraído e produtivo, vocês foram e são incríveis.

Aos professores, que serviram como excelentes exemplos e me guiaram durante essa jornada, transmitindo seus conhecimentos e ensinamentos que marcaram minha trajetória para sempre.

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Microbiologia, em especial professora Lucy, por todo auxílio e disposição perante as necessidades de todos os alunos.

À CAPES pelo fornecimento da bolsa, que financiou a manutenção da minha vida e permitiu dedicação integral a pesquisa durante meu mestrado e doutorado.

Agradeço a cada um que, de alguma forma, fez parte desta caminhada. Meu sucesso é também reflexo do apoio e presença de todos vocês.

“A ciência é uma forma de iluminar o mundo,
de construir uma civilização baseada no
conhecimento.”

Carl Sagan

GUIDONE, Gustavo Henrique Migliorini. **ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CATETER REVESTIDO INTERNAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA CONTRA BACTÉRIAS UROPATOGÊNICAS**. 2025. 74 p. Tese – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

As infecções do trato urinário associadas a cateteres estão entre as infecções nosocomiais mais comuns. Diversas bactérias estão associadas a essas infecções, dentre elas pode-se destacar *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*. Diante disso, este estudo desenvolveu um método para revestir cateteres urinários com AgNP e polidopamina como agente de ancoragem. Para isso, foram realizados testes de concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM), ensaios de inibição da formação de biofilme e destruição de biofilme e teste dos cateteres revestidos em modelo de bexiga *in vitro*. Todos os testes foram realizados com *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703 e *P. mirabilis* ATCC 7002. As nanopartículas apresentaram CIM de 125 µM e uma CBM de 250 µM para todas as cepas testadas. Concentrações iguais ou maiores que o valor de CIM inibiram a formação de biofilme em placas de poliestireno, enquanto biofilmes pré-formados exigiram concentrações maiores. O revestimento foi aplicado na parte interna do cateter, e a presença de prata foi confirmada por EDS. Em um modelo de bexiga *in vitro*, o cateter revestido inibiu a formação de biofilme por *E. coli* em teste com densidade celular de 10⁶ UFC/mL e reduziu a formação de biofilme por *K. pneumoniae* nas densidades celulares de 10⁶ e 10⁸ UFC/mL, 98% e 99%, respectivamente. Não houve redução do biofilme formado por *P. mirabilis* mesmo com o revestimento de BioAgNP. A eficiência contra *E. coli* foi dependente da carga bacteriana inicial. Esses resultados sugerem que, embora o revestimento de nanopartículas de prata tenha o potencial de prevenir infecções associadas ao cateter urinário, sua eficácia pode variar dependendo das espécies bacterianas e das condições iniciais de colonização.

Palavras-chave: Infecções urinárias associadas a cateter. Biofilme. Revestimento antimicrobiano. Assistência em saúde.

GUIDONE, Gustavo Henrique Migliorini. **ANTIBIOFILM ACTIVITY OF CATHETER INTERNALLY COATED WITH SILVER NANOPARTICLES AGAINST UROPATHOGENIC BACTERIA**. 2025. 74 p. Thesis - State University of Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Catheter-associated urinary tract infections are among the most common nosocomial infections. Several bacteria are associated with these infections, with *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. mirabilis* being particularly notable. Given this, this study developed a method to coat urinary catheters with AgNP and polydopamine as an anchoring agent. To achieve this, tests for minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC), biofilm formation inhibition and biofilm destruction assays, and tests on coated catheters in an in vitro bladder model were performed. All tests were conducted with *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703, and *P. mirabilis* ATCC 7002. The nanoparticles exhibited an MIC of 125 μM and an MBC of 250 μM for all tested strains. Concentrations equal to or greater than the MIC value inhibited biofilm formation on polystyrene plates, whereas pre-formed biofilms required higher concentrations. The coating was applied to the inner part of the catheter, and the presence of silver was confirmed by EDS. In an in vitro bladder model, the coated catheter inhibited biofilm formation by *E. coli* in tests with a bacterial density of 10^6 CFU/mL and reduced biofilm formation by *K. pneumoniae* at bacterial densities of 10^6 and 10^8 CFU/mL by 98% and 99%, respectively. No reduction in biofilm formation by *P. mirabilis* was observed, even with the BioAgNP coating. The efficiency against *E. coli* was dependent on the initial bacterial load. These results suggest that, although the silver nanoparticle coating has the potential to prevent catheter-associated infections, its effectiveness may vary depending on the bacterial species and initial colonization conditions.

Keywords: Catheter-associated urinary tract infections. Biofilm. Antimicrobial coating. Health care.

Lista de figuras

Figura 1 – Genes codificantes de fimbrias mrk de <i>K. pneumoniae</i> e estrutura da fímbria do tipo 3.....	20
Figura 2 - Biofilme cristalino em cateter urinário formado por <i>P. mirabilis</i>	22
Figura 3 - Montagem da estrutura para realização do revestimento interno do cateter.	31
Figura 4 - Seções do cateter urinário usados para inoculação e avaliação do biofilme.	33
Figura 5 - Resultados de inibição da formação de biofilme das cepas testadas.	36
Figura 6 - Curva do tempo de morte realizado com as cepas avaliadas.	37
Figura 7 - Avaliação da destruição de biofilme pré-formado com diferentes concentrações de AgNP.....	38
Figura 8 - Representação do revestimento interno do cateter urinário.....	39
Figura 9 - Micrografia eletrônica de varredura associada a EDS demonstrando prata na superfície interna no cateter urinário.	40
Figura 10 - Teste em bexiga <i>in vitro</i> . Inóculo inicial com densidade celular a 10^6 UFC.	42
Figura 11 - Teste em bexiga <i>in vitro</i> . Inóculo inicial com densidade celular a 10^8 UFC.	43

Lista de tabelas

Tabela 1- Reagentes utilizados no preparo de urina artificial formulada..... 33

Tabela 2- Presença de elementos nos cateteres pela análise EDS. Comparação entre a presença de prata no cateter pristino e no cateter revestido com AgNP..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AgNP – Nanopartícula de prata
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- CBM – Concentração bactericida mínima
- CIM - Concentração inibitória mínima
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- cm - centímetro
- DO – Densidade Ótica
- EDS – Espectroscopia de raio-X por energia dispersiva
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- ESBL – Beta-lactamases de espectro estendido
- ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extraintestinal
- ITU – Infecções do trato urinário
- ITU-AC – Infecções do trato urinário associadas a cateter
- mg - miligrama
- MHB – Mueller Hinton Broth
- mL - mililitro
- MRK – *Mannose-Resistant Klebsiella*
- MTT - (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo)
- nm – nanômetro
- PAI -Ilhas de patogenicidade
- PBS – Solução salina tamponada com fosfato
- UFC – Unidades formadoras de colônias
- UPEC – *E. coli* uropatogênica
- µL - microlitro
- µM - micromolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1.	Avanços na medicina.....	16
2.2.	Dispositivos médicos.....	16
2.3.	Infecções relacionadas a cateteres urinários	17
2.4.	Principais patógenos relacionados a infecções urinárias	18
2.4.1.	<i>Escherichia coli</i>	18
2.4.2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
2.4.3.	<i>Proteus mirabilis</i>	21
2.5.	Biofilme microbiano em dispositivos médicos	23
2.6.	Nanopartículas de prata	24
2.7.	Revestimento de dispositivos médicos	25
3	OBJETIVOS	27
3.1.	Objetivo geral	27
3.2.	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1.	Amostragem bacteriana	28
4.2.	Determinação concentração inibitória e bactericida mínima	28
4.3.	Curva de tempo de morte.....	28
4.4.	Ensaio de inibição da formação de biofilme	29
4.5.	Atividade de destruição de biofilme	29
4.6.	Determinação da viabilidade celular por MTT	30
4.7.	Revestimento do cateter urinário.....	30
4.8.	Microscopia eletrônica de varredura e análise de composição.....	31
4.9.	Teste em modelo de bexiga <i>in vitro</i>	32
4.9.1.	Urina artificial	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1.	Concentração inibitória mínima e bactericida mínima.....	35
5.2.	Inibição da formação de biofilme	35
5.3.	Curva de tempo de morte.....	36
5.4.	Destruição de biofilme.....	37
5.5.	Revestimento do cateter urinário	38
5.6.	Caracterização da superfície do cateter urinário	39
5.7.	Teste em modelo de bexiga <i>in vitro</i>	40
6	Discussão.....	44
7	Conclusão	47
	REFERÊNCIAS.....	49

APÊNDICE A – PEDIDO DE PATENTE BR 10 2024 016343 5	56
APÊNDICE B - Artigo submetido a revista Current Microbiology (Fator de impacto 2.3).....	57
ANEXO A - Sanches <i>et al.</i>, 2021.....	71
ANEXO B – Sanches <i>et al.</i>, 2023.	71
ANEXO C – Santos <i>et al.</i>, 2023.....	72
ANEXO D – Silva <i>et al.</i>, 2023.....	72
ANEXO E – Guidone <i>et al.</i>, 2023.....	73
ANEXO F – Saikawa <i>et al.</i>, 2024.....	73
ANEXO G – Oliva <i>et al.</i>, 2024.	74
ANEXO H - Almeida <i>et al.</i>, 2024.....	74
ANEXO I – Rocha <i>et al.</i>, 2024a.....	75
ANEXO J – Rocha <i>et al.</i>, 2024b.	75

1. INTRODUÇÃO

Cateteres são dispositivos médicos amplamente utilizados em procedimentos clínicos para drenar fluidos corporais, administrar medicamentos ou facilitar procedimentos cirúrgicos (LAMIN; NEWMAN, 2016; THOMSEN *et al.*, 2011). Entre os diversos tipos de cateteres, os cateteres urinários são particularmente comuns em ambientes hospitalares, sendo empregados para monitorar a produção de urina, aliviar possíveis obstruções ou drenar a bexiga em pacientes hospitalizados ou em cuidado intensivo. Apesar de sua importância clínica, o uso prolongado de cateteres urinários pode levar a complicações significativas, especialmente infecções associadas a esses dispositivos (NICOLLE, 2014; RICARDO *et al.*, 2020).

Infecções relacionadas a cateteres urinários, conhecidas como infecções do trato urinário associadas a cateteres (ITU-AC), são uma das complicações mais frequentes e graves em pacientes hospitalizados (YU *et al.*, 2021). Essas infecções são geralmente causadas por bactérias que colonizam a superfície do cateter e formam biofilmes, estruturas que protegem os microrganismos da ação dos antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro (ASSADI, 2018; SABIR *et al.*, 2017). A formação de biofilmes não apenas dificulta o tratamento das infecções, mas também contribui para a persistência e recorrência das mesmas, tornando o manejo clínico desses pacientes um grande desafio (NICOLLE, 2014; SABIR *et al.*, 2017).

Buscando reduzir o risco de infecções associadas ao uso de cateteres e outros dispositivos médicos, há um crescente interesse no desenvolvimento de dispositivos revestidos com materiais antimicrobianos (SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015). Dispositivos médicos revestidos com nanopartículas de prata têm emergido como uma solução promissora devido às propriedades antimicrobianas da prata. As nanopartículas de prata são eficazes contra uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias resistentes a múltiplas drogas, e têm o potencial de prevenir a formação de biofilmes, reduzindo assim a incidência de infecções associadas a dispositivos médicos (GODA *et al.*, 2022; SAIKAWA *et al.*, 2024).

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi elaborar uma metodologia de revestimento para cateteres urinários, utilizando nanopartículas de prata como agente antimicrobiano e avaliar a capacidade deste revestimento em

reduzir o biofilme formado por microrganismos uropatogênicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Avanços na medicina

Em 2002, Anderson fez um dos primeiros relatos de uma fratura tibial em um homem adulto na era do bronze. Fraturas simples como a descrita, facilmente tornavam um homem adulto na era pré-histórica incapaz de atividades diárias simples. Entretanto, o relato demonstra uma fratura cicatrizada, o que demonstra cuidado e compaixão de pessoas próximas ao indivíduo, permitindo sua sobrevivência (ANDERSON, 2002).

Com o passar dos séculos, a medicina evoluiu significativamente, transformando como o cuidado à saúde é abordado. No século XX, a introdução dos antimicrobianos marcou um dos maiores avanços, salvando milhões de vidas ao combater infecções bacterianas antes fatais. Esse avanço foi o início de uma série de inovações que permitiram não apenas tratar doenças, mas também melhorar a qualidade de vida dos pacientes (GAYNES, 2017)

Além dos avanços farmacológicos e genéticos, o desenvolvimento e a utilização de dispositivos médicos, como cateteres, têm desempenhado um papel essencial na melhoria do cuidado à saúde. Cateteres venosos centrais, por exemplo, são amplamente utilizados para a administração de medicamentos, nutrição parenteral e monitoramento hemodinâmico em pacientes críticos, oferecendo uma via de acesso segura e eficiente. O uso de cateteres urinários, por outro lado, tem permitido o manejo adequado de retenção urinária e incontinência, além de serem cruciais em procedimentos cirúrgicos prolongados (LAMIN; NEWMAN, 2016; RICARDO *et al.*, 2020).

No entanto, o uso prolongado de cateteres exige cuidado rigoroso para evitar complicações, como infecções associadas ao cateter, que são um sério risco à saúde dos pacientes, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade (NICOLLE, 2014). Desta forma, esses dispositivos são fundamentais para o manejo de pacientes em situações críticas, o que destaca a importância do desenvolvimento de tecnologias que melhorem a segurança e a eficácia no uso destas ferramentas.

2.2. Dispositivos médicos

Dispositivos médicos são instrumentos, aparelhos, implantes ou materiais que são utilizados na prática clínica para diagnóstico, monitoramento, tratamento ou prevenção de doenças em pacientes. Eles variam desde equipamentos complexos, como máquinas de ressonância magnética, até dispositivos simples, como termômetros e bandagens (ARONSON; HENEGHAN; FERNER, 2020).

Cateteres urinários são um tipo específico de dispositivo médico, essencial para o manejo de pacientes que não conseguem urinar espontaneamente. Eles são tubos flexíveis inseridos na uretra para drenar a urina diretamente da bexiga para um saco coletor, sendo amplamente utilizados em situações pós-operatórias, em pacientes acamados ou com distúrbios neurológicos que afetam a micção (CHENOWETH, 2021; MARKLEW, 2004). A importância dos cateteres urinários no cuidado médico é inegável, pois eles garantem que a função urinária seja mantida, prevenindo complicações como a retenção urinária e suas consequências.

O uso de cateteres urinários está associado a um risco significativo de infecções, conhecidas como infecções do trato urinário associadas a cateteres (ITU-AC) (SHUMAN; CHENOWETH, 2018). Essas infecções são causadas pela colonização de microrganismos, que formam biofilmes no interior e na superfície do cateter. Esses biofilmes são altamente resistentes à antimicrobianos, tornando as infecções difíceis de tratamento. Além disso, as ITU-AC estão entre as infecções nosocomiais mais comuns, contribuindo para o aumento da morbidade, prolongamento do tempo de hospitalização e aumento dos custos de saúde. A prevenção dessas infecções é um grande desafio e também crucial no manejo de pacientes cateterizados (SHUMAN; CHENOWETH, 2018; VENKATARAMAN; YADAV, 2023).

2.3. Infecções relacionadas a cateteres urinários

O uso de cateteres urinários é realizado em uma grande variedade de contextos clínicos, sendo essencial para o manejo de diversas condições médicas. Esses dispositivos são frequentemente necessários para pacientes que não conseguem urinar espontaneamente, como resultado de cirurgias, traumas, ou doenças crônicas. Apesar de sua utilidade, o uso de cateteres está associado a um risco significativo de infecções do trato urinário, conhecidas como ITU-AC (RUBI;

MUDEY; KUNJALWAR, 2022).

ITU-AC são uma das doenças mais comuns relacionadas à assistência médica em todo o mundo. As ITU-AC são responsáveis por 40% de todas as infecções hospitalares e 80% de todas as infecções nosocomiais do trato urinário (ITU). O cateter urinário é implantado em uma grande porcentagem de pacientes internados em algum momento durante sua hospitalização (RUBI; MUDEY; KUNJALWAR, 2022; VENKATARAMAN; YADAV, 2023).

Cateteres urinários inibem os mecanismos naturais de defesa do trato urinário e aumentam a colonização bacteriana ou a formação de biofilme na superfície do cateter, o que pode causar ITU-AC. Isso está associado ao aumento de infecções, tempo de internação, custos hospitalares e mortalidade (CLARKE *et al.*, 2020). Portanto, para prevenir essas infecções, serão necessárias inovações tecnológicas em materiais e no desenvolvimento de cateter que impeçam ou minimizem a formação de biofilme (RUBI; MUDEY; KUNJALWAR, 2022).

Os biofilmes formados em cateteres urinários permitem que os microrganismos escapem das defesas naturais do hospedeiro, resultando em permanência e persistência a longo prazo, principalmente se a infecção for assintomática. Isso torna as infecções associadas a cateteres particularmente difíceis de tratar, pois os biofilmes protegem as bactérias da ação de antimicrobianos e das respostas imunológicas (MANCUSO *et al.*, 2024; NICOLLE, 2014).

2.4. Principais patógenos relacionados a infecções urinárias

Diversos patógenos são associados a infecções em cateteres urinários, destacando-se entre eles *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Esses patógenos representam desafios significativos no manejo das ITU, especialmente em pacientes cateterizados, devido à sua capacidade de persistir e resistir aos tratamentos convencionais utilizados (YAO *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2023).

2.4.1. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, comumente encontrada na microbiota gastrointestinal de humanos e outros animais homeotérmicos. Embora muitos isolados de *E. coli* sejam

comensais, outras são patogênicas e podem causar diversas infecções, incluindo infecções do trato urinário (ITU) (ARAFI *et al.*, 2023). Entre suas variantes patogênicas, *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) é particularmente problemática, sendo *E. coli* uropatogênica (UPEC) a principal causa de ITU devido à sua capacidade de formar biofilmes, facilitando sua persistência no trato urinário (GOVINDARAJAN *et al.*, 2020; SORA *et al.*, 2021).

Esses microrganismos são responsáveis por até 90% da ITUs adquiridas na comunidade e 50% das ITU nosocomiais. Além disso, geralmente carregam uma série de fatores de virulência, que são codificados em ilhas de patogenicidade (PAI), incluindo adesinas, toxinas e sideróforos que lhes permitem invadir, colonizar e sobreviver no trato urinário. Sua patogênese se inicia pela colonização da bexiga, levando à cistite. Em seguida, de forma ascendente, podem se mover para o rim, causando pielonefrite aguda ou disseminar-se para o sangue, levando à urosepse (EL-MAHDY; MAHMOUD; SHRIEF, 2021; MALEKZADEGAN *et al.*, 2018).

Outro problema quando se aborda o tratamento das infecções causadas por *E. coli* é a crescente resistência antimicrobiana, que dificulta o controle desse microrganismo, e torna as infecções mais persistentes e perigosas. A produção de carbapenemasas, enzimas que inativam carbapenêmicos, agrava esse problema, já que esses antimicrobianos são de última linha no tratamento de infecções graves. A resistência a carbapenêmicos em *E. coli* reduz significativamente as opções terapêuticas, podendo aumentar o risco de falha no tratamento e a disseminação de organismos multirresistentes (CHEN *et al.*, 2023).

2.4.2. *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, não móvel, encapsulada, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Ela é comumente encontrada no trato intestinal humano, como parte da microbiota. No entanto, em ambientes hospitalares e em indivíduos imunocomprometidos, *K. pneumoniae* pode se tornar um patógeno oportunista, responsável por infecções graves, como pneumonia, infecções do trato urinário e sepse (ADEOLU *et al.*, 2016; BENGOCHEA; SA PESSOA, 2019; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

A cápsula polissacarídica que envolve *K. pneumoniae* é uma das

suas principais características, contribuindo para sua resistência à fagocitose e ao ataque do sistema imunológico (LI *et al.*, 2014). Além da cápsula, os fatores de virulência de *K. pneumoniae* são diversos e incluem a presença de fímbrias extremamente importantes para a formação de biofilmes. Dentre as fímbrias que *K. pneumoniae* possui, pode-se destacar as fímbrias do tipo 3 codificadas pelo *cluster* de genes *mrk* (Figura 1). Essas fímbrias tem um importante papel na adesão de *K. pneumoniae* a dispositivos médicos, como cateteres (MURPHY *et al.*, 2013; MURPHY; CLEGG, 2012).

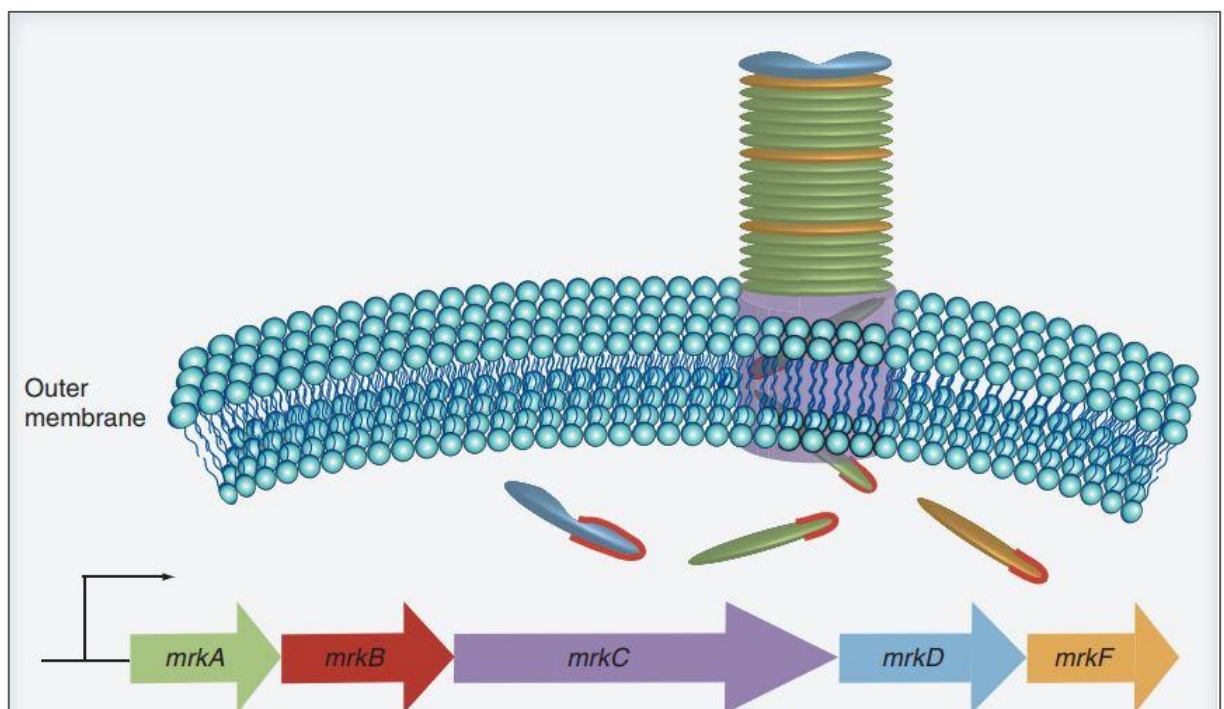


Figura 1– Genes codificantes de fímbrias *mrk* de *K. pneumoniae* e estrutura da fímbria do tipo 3.

Fonte: Murphy; Clegg (2012).

Além disso, essa bactéria possui sistemas de secreção de toxinas que danificam tecidos hospedeiros, sideróforos que capturam ferro necessário ao seu metabolismo, além de enzimas como a urease, que contribuem para a patogênese em infecções do trato urinário. Esses fatores aumentam sua capacidade de colonizar e infectar diferentes nichos no hospedeiro humano. (ABBAS *et al.*, 2024; HOLDEN *et al.*, 2016)

A resistência antimicrobiana é uma característica preocupante de *K. pneumoniae*. Esse microrganismo é conhecido por adquirir genes de resistência através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, que

podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias. Entre os mecanismos de resistência mais críticos estão a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases, que inativam a maioria dos antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, que são frequentemente usados como último recurso no tratamento de infecções multirresistentes (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

As infecções causadas por *K. pneumoniae* variam de infecções do trato urinário, pneumonias e infecções sistêmicas severas, como a sepse. Além disso, essa bactéria é uma das principais causas de infecções hospitalares, especialmente em unidades de terapia intensiva, onde pacientes estão mais suscetíveis devido ao uso prolongado de dispositivos médicos invasivos (PACZOSA; MECSAS, 2016).

Uma das complicações relacionadas ao uso de cateter urinário é a formação de biofilme por *K. pneumoniae*. Este biofilme não só protege a bactéria do sistema imunológico do hospedeiro, como também a torna significativamente mais resistente a antimicrobianos. Essa resistência dificulta o tratamento e frequentemente resulta em ITU recorrentes, além de aumentar o risco de infecções sistêmicas, como a bacteremia (MARTIN; BACHMAN, 2018; VUOTTO *et al.*, 2014).

2.4.3. *Proteus mirabilis*

P. mirabilis é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, móvel e pertence à família Morganellaceae (ADEOLU *et al.*, 2016; ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012b). Os habitats dessa espécie podem ser tanto ambientais, como em solos e águas (DRZEWIECKA, 2016), quanto o trato gastrointestinal de diversos animais como répteis, mamíferos e aves, onde vive comensalmente (MANOS; BELAS, 2006). Apesar disso, *P. mirabilis* apresenta potencial patogênico, e é responsável por múltiplas infecções em seres humanos. (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018). Os locais mais comuns de infecções incluem: mucosas, feridas, queimaduras e principalmente trato urinário (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012a). *P. mirabilis* pode ser, de acordo com a região, a segunda maior causa de ITU, atrás apenas de *E. coli* (FOX-MOON; SHIRTLIFF, 2015; REU *et al.*, 2018). Essas características são justificadas perante a quantidade de fatores de

virulência que este microrganismo possui, sendo a urease um dos mais conhecidos (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

A urease produzida por *P. mirabilis* apresenta uma grande capacidade hidrolítica e atua entre 6 e 25 vezes mais rápido que enzimas similares de outros microrganismos causadores de infecções urinárias (JONES; MOBLEY, 1987). Este fato, junto com sua resistência, e a vasta presença de fímbrias, tornam essa espécie potencialmente perigosa quando relacionada a infecções mais duradouras (FOX-MOON; SHIRTLIFF, 2015; ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007; SANCHES *et al.*, 2019, 2023). *P. mirabilis* é um importante patógeno quando está associado a ITUs complicadas, levando à necessidade de hospitalização e cateterização (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

Durante cateterizações, sua extensa quantidade de fímbrias permitem uma adesão inicial eficiente (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007; ZUNINO *et al.*, 2003), e sua capacidade de transformar ureia em amônia rapidamente através de sua potente urease, leva ao rápido aumento do pH e à formação de cristais de carbonato de fosfato de cálcio e estruvita (PRYWER; SADOWSKI; TORZEWSKA, 2015; SCHAFFER; PEARSON, 2017).



Figura 2 - Biofilme cristalino formado por *P. mirabilis* em cateter urinário.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

Esses cristais tornam-se parte de uma estrutura conhecida como

biofilme cristalino (Figura 2), que além de aumentar sua resistência aos antimicrobianos é de difícil remoção mecânica. Além disso, a formação do biofilme pode obstruir a luz de cateteres, necessitando de uma troca, gerando prejuízos à saúde dos pacientes e aos hospitais (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011; STICKLER, 2014). Dependendo da região, *P. mirabilis* está associada à piora de até metade das ITU-AC (SCHAFFER; PEARSON, 2017).

2.5. Biofilme microbiano em dispositivos médicos

Biofilmes microbianos são agregados de microrganismos que se aderem a superfícies, formando uma matriz extracelular protetora. Essa matriz é composta por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, que conferem resistência significativa aos microrganismos aderidos, protegendo-os contra a ação do sistema imunológico do hospedeiro e de antimicrobianos (SAUER *et al.*, 2022). Em dispositivos médicos, a formação de biofilmes é um problema crítico, pois esses agregados são altamente resistentes às terapias convencionais, tornando as infecções associadas a esses dispositivos persistentes e difíceis de tratar (RICARDO *et al.*, 2020).

A formação de biofilmes em dispositivos médicos é um processo dinâmico que começa com a adesão inicial de microrganismos à superfície do dispositivo, seguida pela proliferação e produção de matriz extracelular, culminando na maturação do biofilme (RICARDO *et al.*, 2020). Uma vez estabelecido, o biofilme pode servir como fonte contínua de infecção, liberando células microbianas para colonizar outros tecidos ou dispositivos no corpo do paciente. Dispositivos médicos comumente utilizados são frequentemente suscetíveis à colonização por biofilmes, o que pode resultar em complicações graves, incluindo a falha do dispositivo e infecções sistêmicas (NICOLLE, 2014; RICARDO *et al.*, 2020; SAUER *et al.*, 2022).

No caso dos cateteres urinários, o problema dos biofilmes é particularmente grave. Esses dispositivos, que permanecem no trato urinário por períodos prolongados, são um ambiente ideal para a formação de biofilmes devido ao contato constante com a urina, que contém nutrientes essenciais para o crescimento microbiano (CLARKE *et al.*, 2020). Os biofilmes formados em cateteres urinários podem bloquear o fluxo de urina, causar irritação e inflamação na mucosa urinária, além de serem extremamente resistentes aos tratamentos antimicrobianos.

Isso resulta em infecções recorrentes e crônicas do trato urinário, que são difíceis de erradicar e podem levar a complicações sérias, como pielonefrite e sepse. A prevenção e o manejo das infecções associadas a biofilmes em cateteres urinários continuam sendo um desafio significativo na prática clínica (STICKLER, 2014; WERNEBURG, 2022).

2.6. Nanopartículas de prata

Nanopartículas são partículas que variam entre 1 e 100 nanômetros. Devido ao seu tamanho reduzido, possuem uma grande área de superfície em relação ao volume (JAMKHANDI *et al.*, 2019). Nanopartículas de prata (AgNP) possui ação antimicrobiana e atuam através de múltiplos mecanismos, como a interação com as membranas celulares dos microrganismos, que resulta na destruição da estrutura celular, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que induzem danos oxidativos ao DNA e às proteínas, e a inibição da replicação microbiana (TRIPATHI; GOSHISHT, 2022).

Além de sua ação direta contra patógenos, as AgNP são particularmente eficazes na prevenção da formação de biofilmes. Sendo estes, uma das principais causas de infecções persistentes, especialmente em dispositivos médicos, pois tornam os microrganismos mais resistentes ao tratamento convencional (CHEN *et al.*, 2023; SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015).

As AgNP podem ser incorporadas em dispositivos médicos, como cateteres, atuando como uma barreira antimicrobiana que impede a colonização e formação de biofilmes na superfície desses dispositivos. Essa aplicação reduz significativamente o risco de infecções associadas ao uso prolongado de dispositivos médicos, um dos maiores desafios na prática clínica (SAIKAWA *et al.*, 2024).

A utilização de AgNP também traz o benefício de uma menor tendência ao desenvolvimento de resistência microbiana, em comparação com os antimicrobianos comumente utilizados. Os diversos mecanismos de ação das AgNP contra os patógenos dificultam o surgimento de mecanismos de resistência, tornando-as uma opção promissora no combate às infecções, especialmente em um cenário onde a resistência antimicrobiana se torna uma crescente ameaça à saúde global. Apesar de suas vantagens, é importante continuar a pesquisa sobre a toxicidade e os impactos ambientais das nanopartículas de prata, para assegurar que

seu uso seja seguro e sustentável (TRIPATHI; GOSHISHT, 2022).

A síntese de AgNP pode ser realizada por diferentes métodos, que geralmente são classificados em físicos, químicos e biológicos. Embora eficientes, os métodos químicos podem resultar em subprodutos tóxicos que precisam ser cuidadosamente gerenciados, o que levanta preocupações ambientais e de segurança (BEYENE *et al.*, 2017).

Em contraste, a síntese verde de nanopartículas de prata é uma abordagem ecológica que utiliza agentes redutores e estabilizadores de origem biológica, como extratos de plantas, microrganismos ou enzimas, para promover a formação de AgNP (ALHARBI; ALSUBHI; FELIMBAN, 2022; GHAFARI-MOGHADDAM *et al.*, 2014). Este método é chamado de "verde" porque evita o uso de substâncias químicas tóxicas e solventes perigosos, o que o torna mais seguro para o ambiente e para a saúde humana. Além disso, a síntese verde pode ser realizada em condições mais brandas de temperatura e pressão, o que a torna energeticamente mais eficiente. Os extratos de plantas, por exemplo, contêm compostos como polifenóis, flavonoides e alcaloides, que podem atuar tanto como agentes redutores quanto como estabilizadores, facilitando a síntese das AgNP e conferindo-lhes propriedades biológicas adicionais (ALHARBI; ALSUBHI; FELIMBAN, 2022).

A síntese biológica de nanopartículas de prata tem atraído grande interesse devido às suas vantagens em termos de sustentabilidade e compatibilidade biológica. Além de ser menos agressiva ao meio ambiente, as AgNP produzidas por síntese biológica tendem a ter menor toxicidade para células humanas, o que é crucial para aplicações biomédicas.

2.7. Revestimento de dispositivos médicos

Estudos sugerem que AgNP podem ser usadas como revestimentos para dispositivos médicos para adicionar atividade antimicrobiana a estes materiais, prevenir a formação de biofilme e reduzir a incidência de infecções (LETHONGKAM *et al.*, 2022; SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015).

AgNP são cada vez mais exploradas como revestimentos para dispositivos médicos devido às suas propriedades antimicrobianas. Estudos mostram que esses revestimentos podem prevenir a formação de biofilmes, uma das principais

causas de infecções em dispositivos como cateteres e próteses (LETHONGKAM *et al.*, 2022; SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015).

Além disso, as AgNP podem ser abordagem eficaz para reduzir infecções hospitalares, que são frequentemente difíceis de tratar devido à resistência antimicrobiana. O revestimento de dispositivos médicos com essas nanopartículas pode atuar como uma barreira adicional, aumentando a proteção contra infecções e melhorando os resultados clínicos (BURDUŞEL *et al.*, 2018).

Tendo em vista a problemática abordada, pode-se dizer que as infecções do trato urinário associadas ao uso de cateteres são um problema de saúde pública, contribuindo para o aumento da morbidade, custos hospitalares e resistência bacteriana. O revestimento de cateteres com nanopartículas de prata pode ser uma solução promissora devido às suas propriedades antimicrobianas, prevenindo a formação de biofilmes. Desta forma, esta pesquisa buscou elaborar uma metodologia de revestimento de cateteres urinários com nanopartículas de prata.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia de revestimento de cateteres urinários com AgNP atuando como agente antimicrobiano e verificar sua atividade contra cepas bacterianas uropatogênicas em modelo de bexiga *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar as concentrações inibitória e bactericida mínima das AgNP contra cepas bacterianas uropatogênicas;
- Construir curva de cinética de tempo de morte das cepas bacterianas avaliadas;
- Avaliar a atividade antibiofilme das AgNP;
- Avaliar a capacidade das AgNP em destruir biofilmes pré-formados;
- Revestir cateteres urinários do tipo Foley com AgNP;
- Caracterizar a superfície do cateter revestido com AgNP;
- Avaliar a capacidade antibiofilme dos cateteres revestidos na prevenção de colonização de uropatógenos em modelo de bexiga *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem bacteriana

Neste estudo, para realização dos ensaios, foram utilizadas as cepas bacterianas *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703 e *P. mirabilis* ATCC 7002.

4.2. Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por meio do método de microdiluição em caldo, em placa de 96 poços de poliestireno e volume final de 100 μL , seguindo as orientações preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram testadas oito concentrações (1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM , 15,625 μM) em triplicatas. O preparo inicial foi realizado em 50 μL de Mueller Hinton Broth (MHB) com o dobro das concentrações finais de AgNP. Em seguida foi inoculado, em cada poço, 50 μL de cada cepa bacteriana testada com densidade celular de $1,5 \times 10^6$ UFC/ml em cada poço, resultando na concentração final desejada.

A CIM foi determinada visualmente, sendo considerada a menor concentração de AgNP capaz de inibir completamente o crescimento dos microrganismos.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida a partir da menor concentração de AgNP necessária para matar pelo menos 99,9% de bactérias no tempo de tratamento (NCCLS, 1999). Os ensaios foram realizados em triplicata. Para isto, 10 μL de concentrações que apresentaram inibição de crescimento foram inoculados em MHA. As placas inoculadas foram incubadas a 37° C, durante 24 horas.

4.3. Curva de tempo de morte

A curva de tempo de morte foi realizada de acordo com as orientações preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 1999). O teste foi realizado em intervalos de 0', 15', 30', 60', 2h, 4h, 8h, 12h, e 24h de incubação, em microtubos contendo 1 mL de MHB + inóculo para o controle

positivo do crescimento e o tratamento contendo volume final de 1 mL, sendo, MHB + inóculo + CBM de AgNP para cada cepa testada. Em cada pedrio de tempo estabelecido, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e diluições seriadas foram realizadas, e foram inoculadas em MHA. As colônias foram contadas para a construção de um gráfico de log 10 UFC/mL x tempo.

4.4. Ensaio de inibição da formação de biofilme

O ensaio de inibição da formação de biofilme foi realizado baseado no protocolo descrito anteriormente, e foi feito em placa de poliestireno com 96 poços e volume final de 200µL. Colônias cultivadas em Mueller Hinton Agar (MHA) foram suspensas e ajustadas para a escala 0,5 de MacFarland. 10 µL foi inoculado em 990µL de MHB. Em seguida, em sextuplicata, 100 µL da solução contendo o inóculo foi adicionado à 100 µL de MHB contendo diferentes concentrações de AgNP (1000 µM; 500 µM; 250 µM; 125 µM, 62,5 µM e 31,25 µM). Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 24h (KWIECINSKA-PIRÓG *et al.*, 2014).

O conteúdo dos poços foi retirado e o biofilme foi fixado em temperatura ambiente. A leitura da formação de biofilme foi realizada segundo a metodologia descrita por (KWIECINSKA-PIRÓG *et al.*, 2014) e utilizando cristal violeta a 0,1% com leitura da densidade óptica (DO) das cepas em espectrofotômetro ELX 800 (BioTek™) à 570 nm de comprimento de luz. 200 µL de metanol foi adicionado 10 minutos antes da leitura em cada poço.

A atividade de inibição de biofilme pelas AgNP foi calculada utilizando a fórmula 1:

Fórmula 1:

$$\text{Inibição de biofilme} = \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right) - 1$$

4.5. Atividade de destruição de biofilme

O cultivo dos microrganismos foi realizado em MHA por 18-24h a 37°C. O crescimento foi suspensas em MHB para a turvação padrão 0,5 da escala de McFarland, densidade celular de 1,5x10⁸ UFC/mL. Em seguida, o inóculo foi

diluído em MHB para, aproximadamente $1,5 \times 10^5$ UFC/ml. Posteriormente, 200 μ L foram transferidos para poços em microplacas de poliestireno. A placa foi incubada a 37°C por 24 horas para a formação do biofilme. Somente meio de cultura foi utilizado como controle negativo. Controle positivo consistiu de MHB + inóculo. Depois desse período, os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ L de PBS (Na_2HPO_4 0,115%, KH_2PO_4 0,02%, NaCl 0,8%, KCl 0,02%, pH 7,4) para remoção das células não aderidas.

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas as concentrações de 32,25 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 62,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 1000 $\mu\text{M}/\text{mL}$. As suspensões foram preparadas em MHB e 200 μ L foram aplicadas sobre o biofilme formado. A placa foi incubada novamente por 24h a 37 °C. O teste foi realizado em sextuplicata.

4.6. Determinação da viabilidade celular por MTT do biofilme

Após o período de tratamento do biofilme, o conteúdo em suspensão dos poços foi retirado e foi realizada a lavagem dos poços três vezes com 100 μ L de PBS. A solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) foi preparada em PBS em concentração de 0,5 mg/mL, esterilizada por filtração e armazenada a -20 °C. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L da solução de MTT em cada poço e a placa foi incubada por 4h a 37 °C com ausência de luz. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm.

Para o cálculo de porcentagem da viabilidade celular dos biofilmes, a seguinte fórmula foi utilizada:

Fórmula 2:

$$\% \text{ Viabilidade do biofilme} = \frac{DO \text{ tratamento} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \times 100$$

4.7. Revestimento do cateter urinário

O revestimento de cateteres urinários do tipo Foley de látex siliconizado de três vias (SOLIDOR®, N° 24) foi baseado no descrito por Wang e

colaboradores (2015). O revestimento foi realizado por meio da perfusão das substâncias formuladas internamente ao cateter. O cloridrato de dopamina possui a capacidade de autopolimerizar, formando a polidopamina. A polidopamina pode atuar como ponto de ancoragem para diversos materiais, permitindo desta maneira a modificação de superfícies.

Desta forma, a metodologia de revestimento do cateter urinário ocorreu pela passagem das substâncias pela superfície interna do cateter (Figura 3). Sendo assim, 20 mL de solução de dopamina (2 mg/mL em Tris-base 10 mM, pH 8,5) foi passada internamente no cateter com fluxo de 30mL por minuto durante 24 horas. Em seguida, 20 mL de uma solução de AgNP 5mM foi passada internamente ao cateter com fluxo de 30mL/min durante 24h. As passagens foram realizadas até que se obtivesse um cateter com três camadas alternadas de polidopamina e AgNP, sendo a última camada composta de AgNP. A metodologia descrita está com pedido de patente realizado - BR 10 2024 016343 5 (APÊNDICE 1).

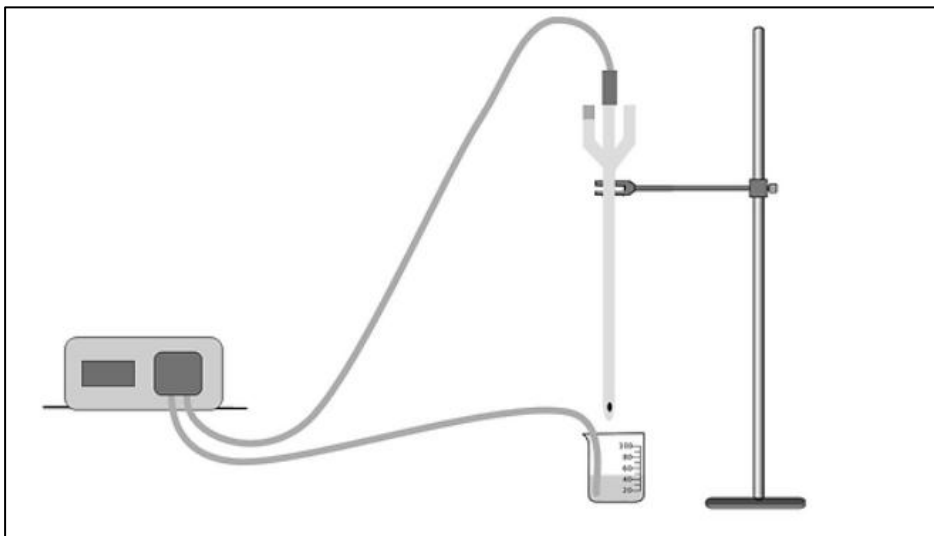


Figura 3- Montagem da estrutura para realização do revestimento interno do cateter.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

4.8. Microscopia eletrônica de varredura e análise de composição

Segmentos de cateter de 0,5 cm (prístino e impregnado) foram metalizados com carbono em evaporador de carbono BAL-TEC SCD 050 e posteriormente foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura

TESCAN VEGA (Tescan) utilizando sensor de elétrons secundários (topologia) e espectroscopia de raio-X por energia dispersiva (EDS) para análise de composição elementar.

4.9. Teste de eficácia antibacteriana em modelo de bexiga *in vitro*

O teste em modelo de bexiga *in vitro* foi realizado com baseado em trabalhos anteriores, como modificações (IMANI RAD *et al.*, 2019). O modelo para teste de bexiga *in vitro* foi construído baseado no descrito por (STICKLER; MORRIS; WINTERS, 1999). Para o teste, foi realizada esterilização dos materiais por autoclavação. Após, foi realizado a fixação da bexiga em suporte universal dentro de um fluxo laminar.

Antes de cada teste, 20 µL do inóculo bacteriano foi inserido na ponta do cateter do tipo Foley de látex siliconizado de três vias (SOLIDOR®, N° 24) (Seção 1, Figura 4) e deixado 30 minutos em repouso para adesão bacteriana. Para *K. pneumoniae* ATCC 700603, o tempo de adesão foi de 1 hora. Foram realizados testes com duas densidades celulares de inóculo bacteriano: $1,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O teste no modelo de bexiga *in vitro* teve duração de 72h. Amostras foram coletadas na saída do cateter (100 µL) em períodos determinados (tempos: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 60 e 72h) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e medição do pH. O teste foi realizado com o cateter sem revestimento (Controle) e com o cateter revestido (Tratamento) para cada cepa de microrganismo testada.

O cateter urinário foi inserido assepticamente na câmara dentro da bexiga e o balão de retenção do cateter foi inflado com água deionizada (30 mL). Um *Erlenmeyer* foi colocado logo abaixo do cateter para coleta da urina drenada. A urina artificial foi constantemente bombeada para a câmara interna do cateter durante o teste a 0,5 mL por minuto. Conforme o volume de urina aumentava, o excesso foi drenado através do cateter para o recipiente esterilizado de coleta.

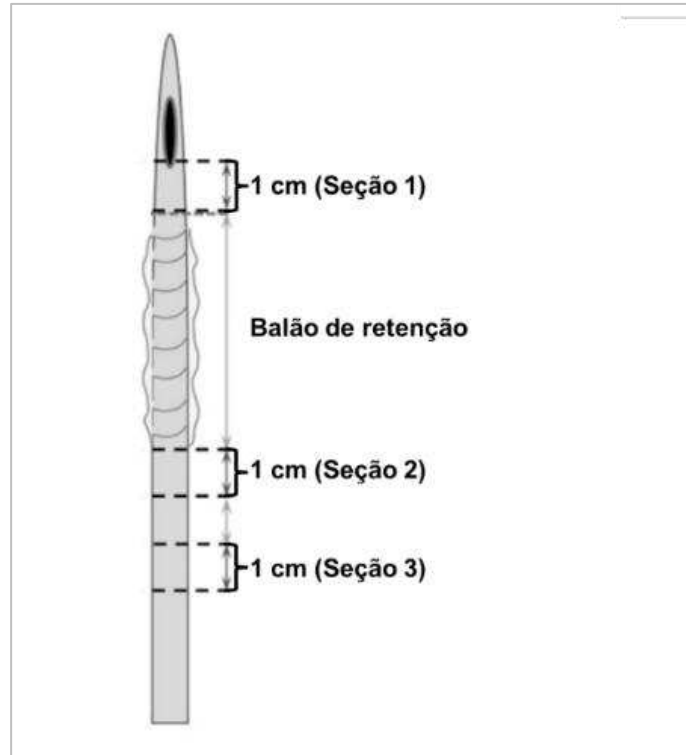


Figura 4- Seções do cateter urinário usados para inoculação e avaliação do biofilme.

Fonte: Adaptado de (NZAKIZWANAYO *et al.*, 2019).

Após o tempo determinado, o cateter foi removido e um seguimento de 1 cm logo abaixo do balão de retenção foi cortado assepticamente (seção 2, Figura 4), lavado duas vezes em solução salina tamponada e sonicado durante 10 minutos para a remoção do biofilme. Após a sonicação, foi realizada diluição seriada para possibilitar a contagem das células viáveis que formaram o biofilme em UFC. O número de UFC foi contado por meio da técnica de microgota para determinar o número de UFC por cm do cateter.

4.9.1. Urina artificial

A urina artificial foi utilizada nos testes envolvendo o modelo de bexiga *in vitro*. A composição da urina artificial é fornecida na Tabela 1.

Tabela 1- Reagentes utilizados no preparo de urina artificial formulada.

Composição	Quantidade (g/L)
Cloreto de magnésio hexahidratado	0,65
Cloreto de sódio	4,6

Sulfato dissódico	2,3
Citrato trissódico dihidratado	0,65
Oxalato dissódico	0,02
Dihidrogenofosfato de potássio	2,8
Cloreto de potássio	1,6
Cloreto de amônio	1,0
Caldo de soja trípico	5,0
Gelatina	5,0
Ureia	25,0
Cloreto de cálcio	0,49

Para o preparo da urina artificial, os componentes foram separados em duas soluções. A solução 1 foi preparada com todos os reagentes listados, exceto ureia e cloreto de cálcio. Esta solução foi diluída em 800 mL de água destilada e esterilizada por autoclavação. A solução 2 é composta por ureia e cloreto de cálcio nas quantidades listadas. Esta solução foi diluída em 200 mL de água destilada e esterilizada por filtração utilizando membranas com poro de 22 μm .

5 RESULTADOS

5.1. Concentração inibitória mínima e bactericida mínima

Para *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703 e *P. mirabilis* ATCC 7002, a CIM foi de 125 μM e a CBM foi de 250 μM .

5.2. Inibição da formação de biofilme

Diversas concentrações de AgNP foram testadas, concentrações subinibitórias (31,25 μM e 62,5 μM) e concentrações inibitórias e bactericidas (125 μM a 1000 μM). Os resultados são apresentados na Figura 5.

A atividade de AgNP de inibição da formação de biofilme po *E. coli* já é notável a partir de 62,5 e 125 μM , resultando em redução de aproximadamente 60% do biofilme. Concentrações acima de 250 μM são capazes de inibir a formação de biofilme em aproximadamente 99%.

Para *K. pneumoniae*, 31,25 μM inibiu o biofilme em 17%, 62,5 μM em 93%. Concentrações superiores a 125 μM inibiram o biofilme em aproximadamente 99%.

Para *P. mirabilis*, concentrações subinibitórias não são capazes de reduzir a formação de biofilme. Além de não conseguir inibir a formação de biofilme, concentrações subinibitórias parecem induzir a formação de biofilme formado, quando comparado com o controle sem tratamento. Aumento de aproximadamente 18% na formação de biofilme na concentração de 31,25 μM e de 23% na concentração de 62,5 μM . Concentrações superiores a 125 μM foram capazes de reduzir a formação de biofilme.

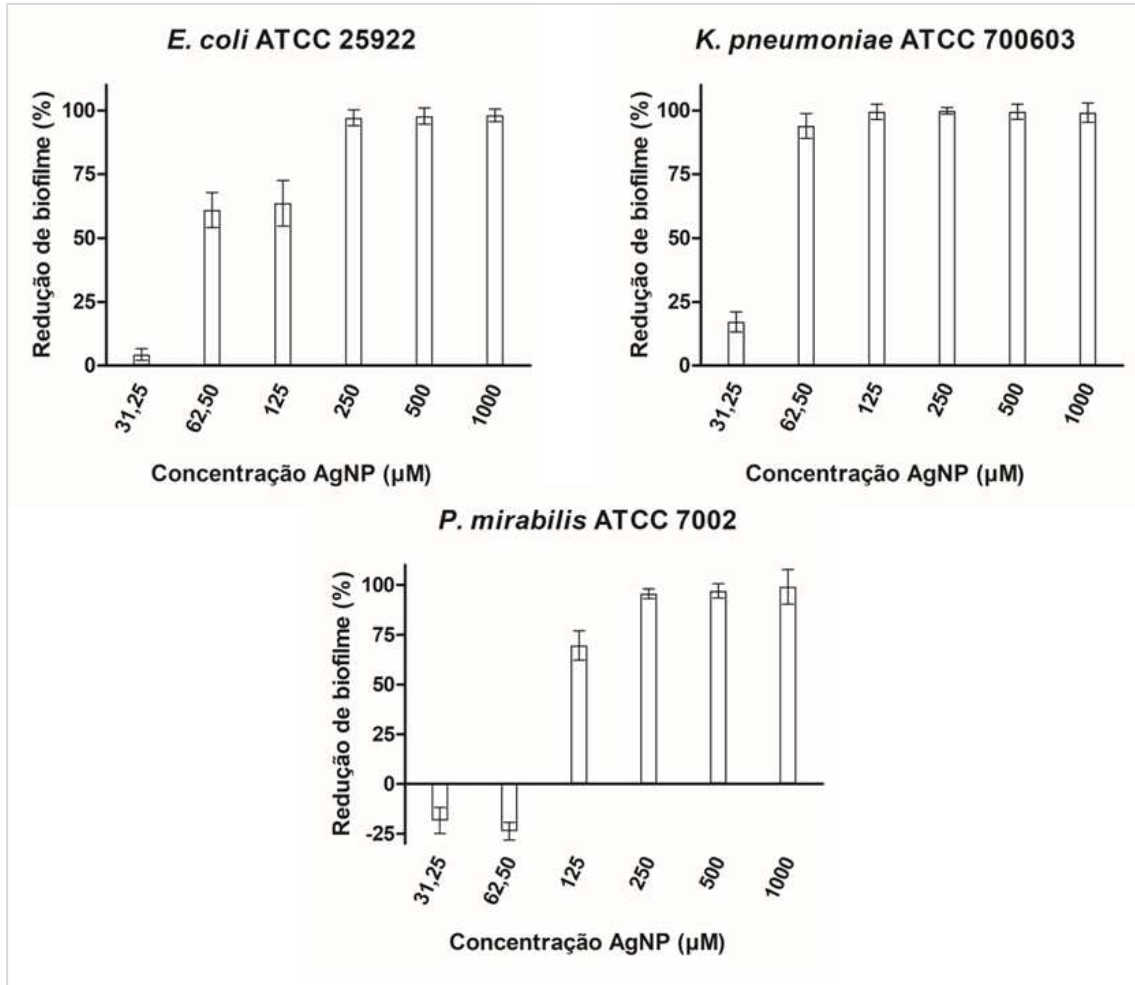


Figura 5- Resultados de inibição da formação de biofilme pelas cepas testadas.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

5.3. Curva de tempo de morte

O ensaio de curva de morte foi realizado com a concentração bactericida de AgNP para as cepas testadas. A redução da viabilidade celular de todas as cepas já pôde ser observada nos primeiros 15 minutos em contato com as nanopartículas. A redução da viabilidade total das células ocorre em aproximadamente 1 h após o início do teste para *P. mirabilis* ATCC 7002 e *K. pneumoniae* ATCC 700603, enquanto para *E. coli* ATCC 25922 a perda total de viabilidade celular ocorreu em aproximadamente 2 horas. A curva do tempo de morte pode ser observada na Figura 6 para todas as bactérias.

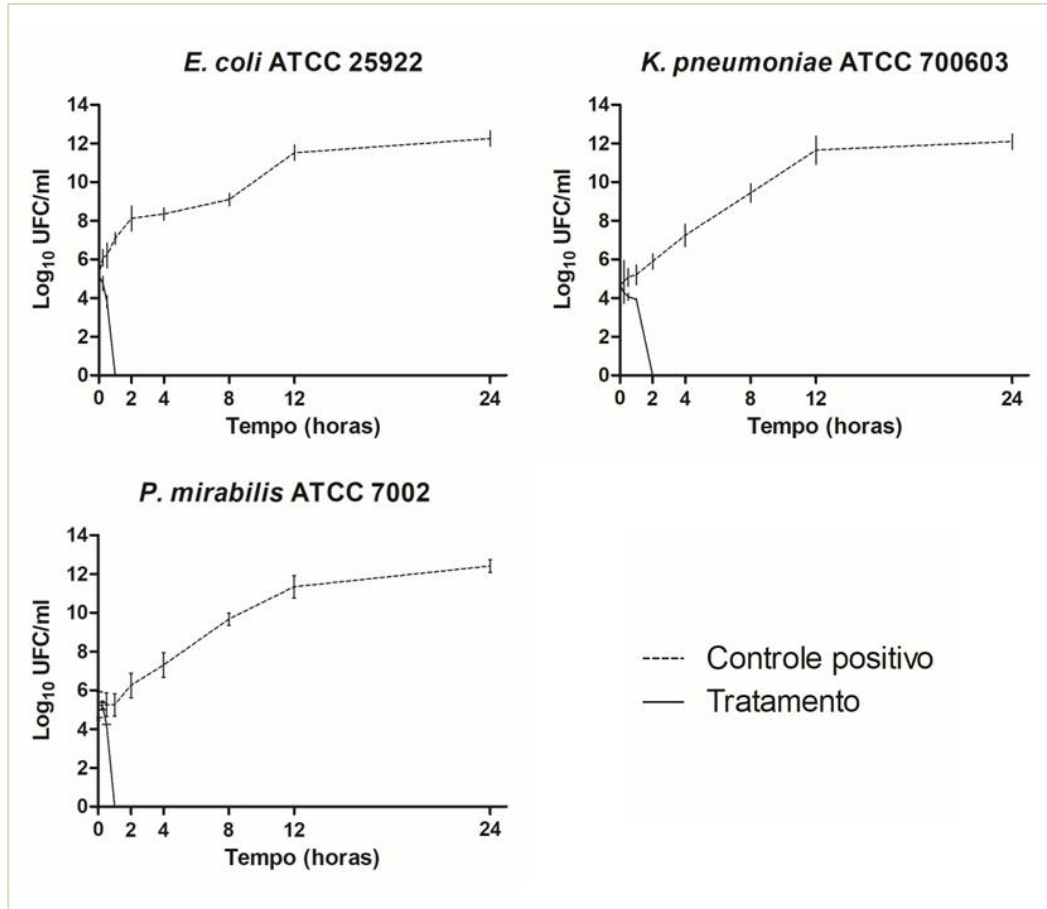


Figura 6- Curva do tempo de morte realizado com as cepas avaliadas.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

5.4. Destruição de biofilme

Os biofilmes previamente formados foram tratados com concentrações subinibitórias, inibitórias e bactericidas (31,25 μ M a 1000 μ M). O biofilme de *E. coli* apresentou reduções de viabilidade celular com tratamentos a partir de doses subinibitórias de nanopartículas. Além disso, conforme as concentrações foram aumentadas, a viabilidade do biofilme foi reduzida. Para *K. pneumoniae*, a concentração subinibitória de 31,25 μ M não apresentou redução de viabilidade do biofilme, o biofilme apresentou aumento da viabilidade quando comparado ao controle. Nas concentrações seguintes, o biofilme apresentou reduções de viabilidades conforme as concentrações de nanopartículas foram aumentando. O biofilme de *P. mirabilis* apresentou aumento da atividade metabólica em concentrações de 31,25 μ M a 250 μ M quando comparado ao controle. Nas concentrações de 500 μ M e 1000 μ M, a viabilidade celular do biofilme apresentou

redução. Os resultados do teste de destruição de biofilme podem ser observados na Figura 7.

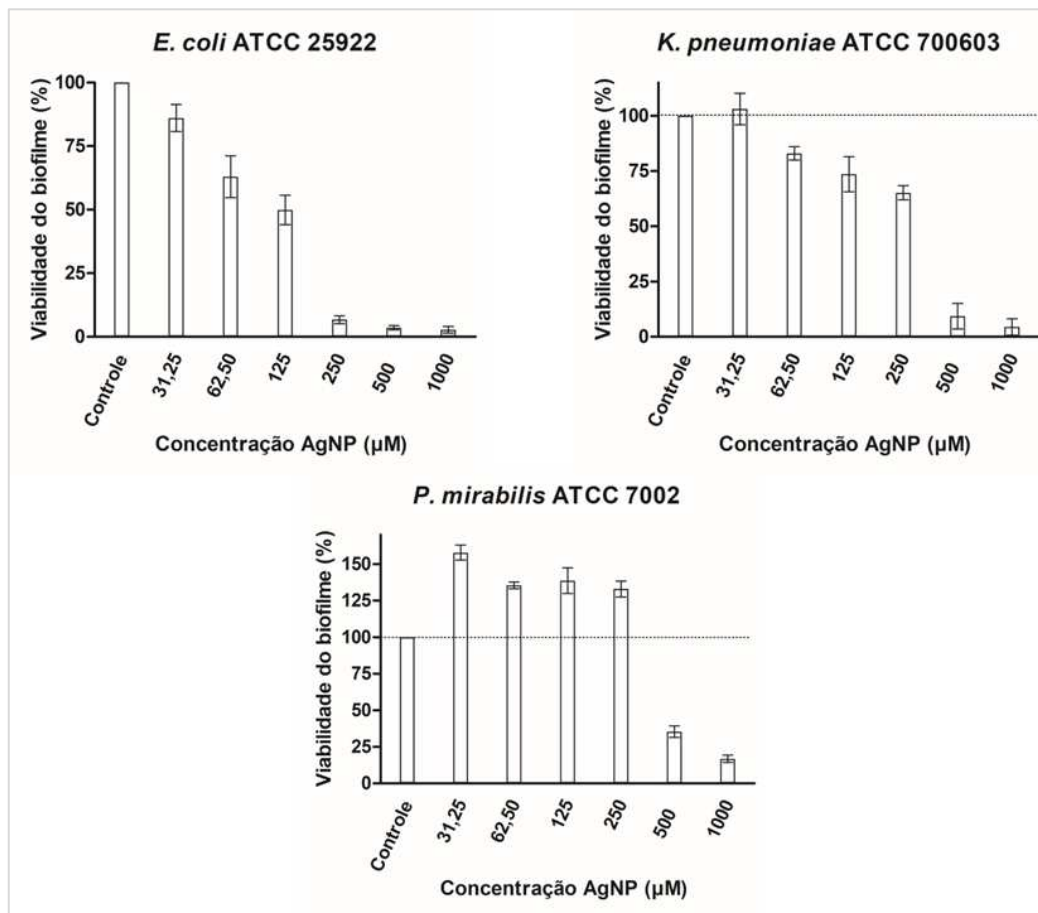


Figura 7- Avaliação da destruição de biofilme pré-formado com diferentes concentrações de AgNP.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

5.5. Revestimento do cateter urinário

O revestimento da superfície interna do cateter foi realizado utilizando polidopamina como agente de ancoragem das nanopartículas. A solução de polidopamina foi perfundida internamente ao cateter com fluxo de 30 mL/min durante aproximadamente 24 h. A solução de polidopamina, quando em condições adequadas, tem a capacidade de autopolimerizar e aderir a superfícies, esse processo modifica sua coloração, inicialmente incolor para amarronzada. A Figura 8 ilustra a diferença entre o cateter pristino (sem revestimento) e o revestido com três camadas alternadas de polidopamina e AgNP, sendo a última camada composta por AgNP. A coloração escura (Figura 8 B) indica que o revestimento

ocorreu pela polimerização de dopamina e as subseqüentes camadas foram adicionadas com sucesso.

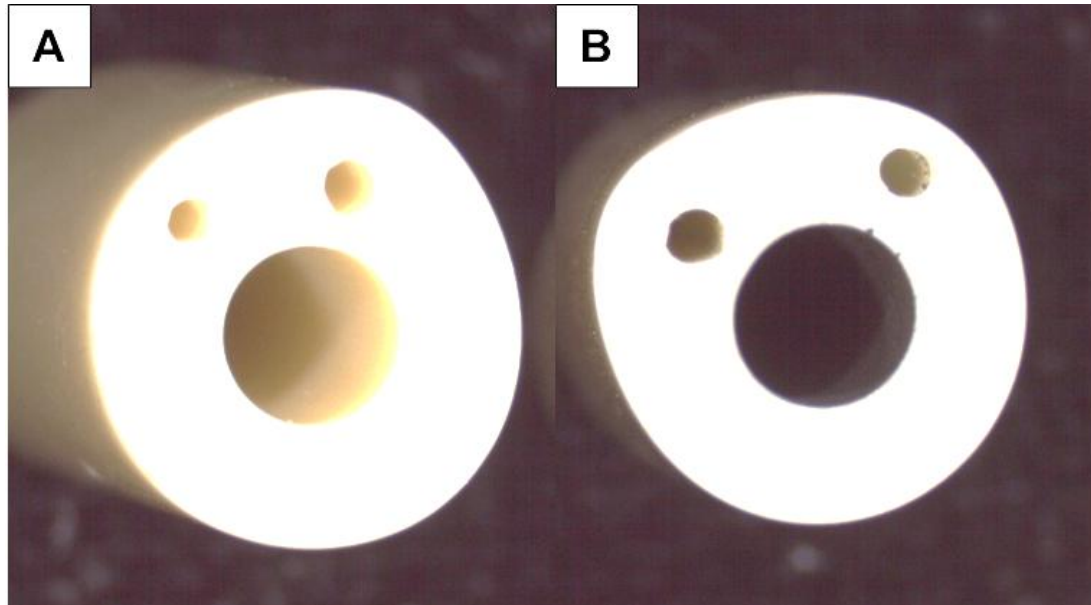


Figura 8- Representação do revestimento interno do cateter urinário.

Legenda: A – Cateter sem revestimento. B- Cateter revestido internamente.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

5.6. Caracterização da superfície do cateter urinário

A caracterização da superfície interna do cateter revestido foi realizada por EDS. Os fragmentos de cateter (pristino e revestido) foram submetidos a análise para identificação dos elementos componentes de suas superfícies.

Tabela 2- Presença de elementos nos cateteres pela análise EDS. Comparação entre a presença de prata no cateter pristino e no cateter revestido com AgNP.

ELEMENTO	PRÍSTINO (P/P)	REVESTIDO (P/P)
Carbono	81,51	66,56
Oxigênio	10,2	18,71
Prata	-	4,86
Enxofre	3,7	3,37
Silício	0,64	0,57
Cloro	1,87	0,63
Cálcio	1,17	0,15

Zinco	-	1,87
Sódio	0,91	-

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

Os resultados comprovaram a presença de prata (AgNP) na superfície interna do cateter revestido com AgNP, além da ausência no cateter sem revestimento. Isso demonstrou a eficácia da imobilização de prata no revestimento realizado. A Tabela 2 evidencia, além de prata, outros elementos identificados pelo EDS na composição do revestimento do cateter.

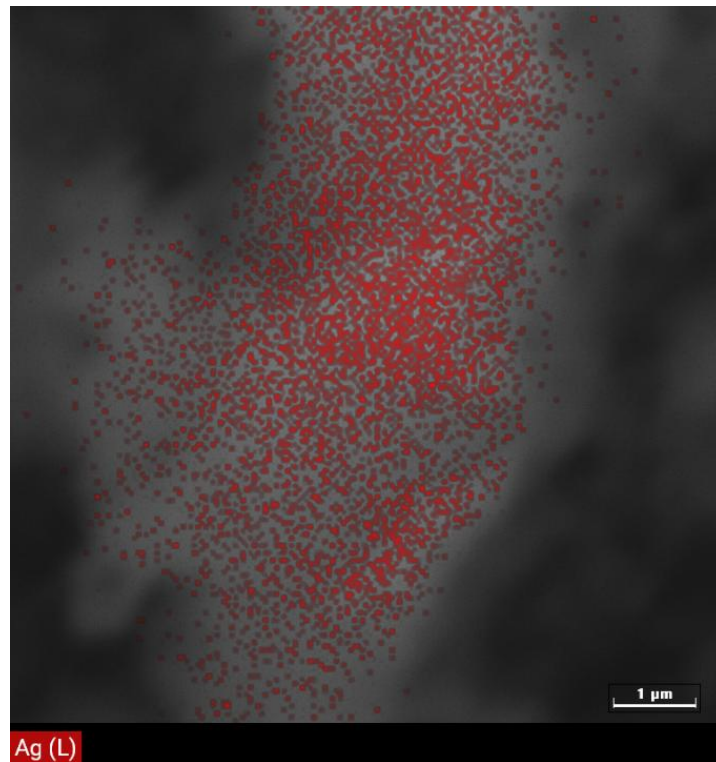


Figura 9- Micrografia eletrônica de varredura associada a EDS demonstrando prata na superfície interna no cateter urinário.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

A Figura 9 é uma imagem obtida através da microscopia eletrônica de varredura em associação com a análise EDS, demonstrando a presença da prata na superfície interna do cateter. Além disso, é possível observar a característica esférica ilustrada na figura, possivelmente pertencente as nanopartículas de prata aderidas na superfície.

5.7. Teste de atividade antibacteriana em modelo de bexiga *in vitro*

O teste em modelo de bexiga *in vitro* foi realizado com os cateteres pristino (controle, sem revestimento) e com o cateter revestido (tratamento). O teste para todas as cepas foi realizado com duas concentrações de inóculo inicial $1,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC).

O teste realizado com *E. coli* pode ser observado na Figura 10 A, com inóculo inicial com densidade celular a $1,5 \times 10^6$, pode-se notar a redução do número de UFC/mL liberadas na urina durante a primeira hora do teste para o tratamento (cateter revestido), enquanto o controle positivo demonstra o crescimento do número de células liberadas na urina durante o teste.

O biofilme formado no cateter foi avaliado pela contagem direta das células viáveis presente, Figura 10 B. O controle apresentou o número de células de $\text{Log}_{10} 6,83$, enquanto não houve formação de biofilme no cateter revestido.

As duas avaliações ilustram o processo que ocorre durante a adesão e colonização do cateter. O cateter revestido impediu a aderência das células de *E. coli* e isso impediu sua multiplicação dentro do cateter, podendo ser observada pela ausência de células liberadas na urina durante o teste. Além disso, não houve adesão no cateter revestido, impedido a colonização e formação do biofilme.

Para *K. pneumoniae*, no teste com inóculo inicial com densidade celular a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, a avaliação de liberação de células na urina artificial, o controle positivo apresentou liberação maior de células, quando comparado ao tratamento, possivelmente pela redução de número de células bacterianas após o contato com o cateter revestido (Figura 10C). O biofilme formado por *K. pneumoniae* no cateter revestido foi menor, $\text{Log}_{10} 3,56$ para o cateter com revestimento e $\text{Log}_{10} 5,52$ para o controle positivo (Figura 10D).

A avaliação do cateter também foi realizada com *P. mirabilis*. No teste realizado com inóculo inicial a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, houve poucas diferenças entre o controle positivo e o tratamento. A liberação de células viáveis no tratamento foi semelhante ao contabilizado durante o teste controle Figura 10E. O biofilme avaliado após 72 horas foi $\text{Log}_{10} 6,90$ para o controle positivo e de $\text{Log}_{10} 7,05$ para o tratamento Figura 10F.

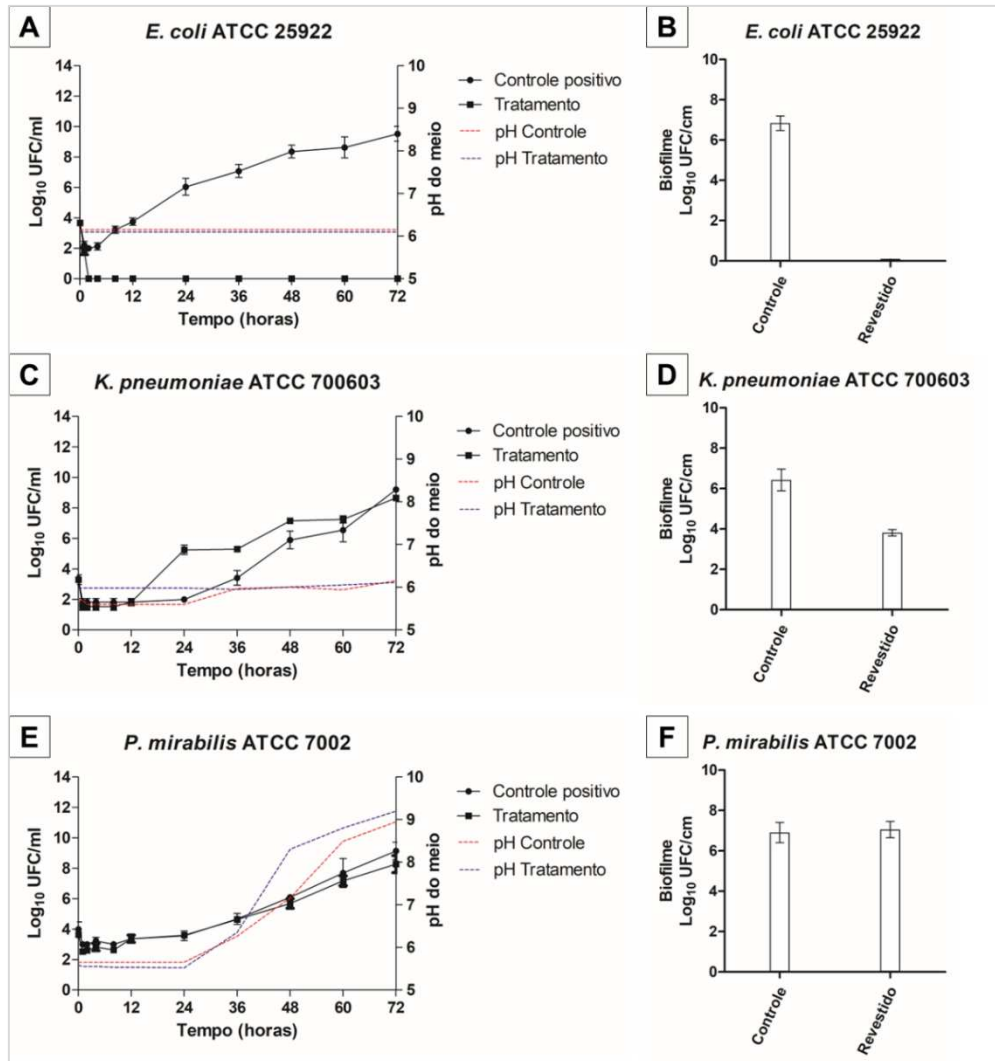


Figura 10- Teste em bexiga *in vitro*. Inóculo inicial com densidade celular a 10^6 UFC.

Legenda: A – Número de células de *E. coli* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. B – Avaliação do biofilme formado por *E. coli* após 72 horas. C – Número de células de *K. pneumoniae* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. D – Avaliação do biofilme formado por *K. pneumoniae* após 72 horas. E – Número de células de *P. mirabilis* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. F – Avaliação do biofilme formado por *P. mirabilis* após 72 horas.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

O teste com *E. coli* também foi realizado com densidade celular de inóculo $1,5 \times 10^8$, porém os resultados obtidos foram diferentes. Na Figura 11A, pode-se observar o aumento do número de células bacterianas liberadas na urina em ambas condições (controle positivo e tratamento). Na Figura 11 B, pode-se observar que há formação de biofilme no controle positivo, porém o biofilme também é formado no cateter revestido.

Para *K. pneumoniae*, no teste com inóculo inicial com densidade celular a $1,5 \times 10^8$, a avaliação de liberação de células na urina artificial, o cateter

revestido apresentou liberação menor de células, quando comparado ao controle (Figura 11 C). O biofilme formado no cateter revestido foi menor, Log_{10} 3,81 para o cateter com revestimento e Log_{10} 6,42 para o controle (Figura 11 D).

O teste com *P. mirabilis* realizado com inóculo inicial a $1,5 \times 10^8$ UFC apresentou pequenas diferenças entre o controle positivo e o tratamento. A liberação de células viáveis no tratamento foi ligeiramente menor quando comparada ao controle (Figura 11 E). O biofilme avaliado após 72 horas foi Log_{10} 7,45 para o controle positivo e de Log_{10} 7,42 para o tratamento (Figura 11 F).

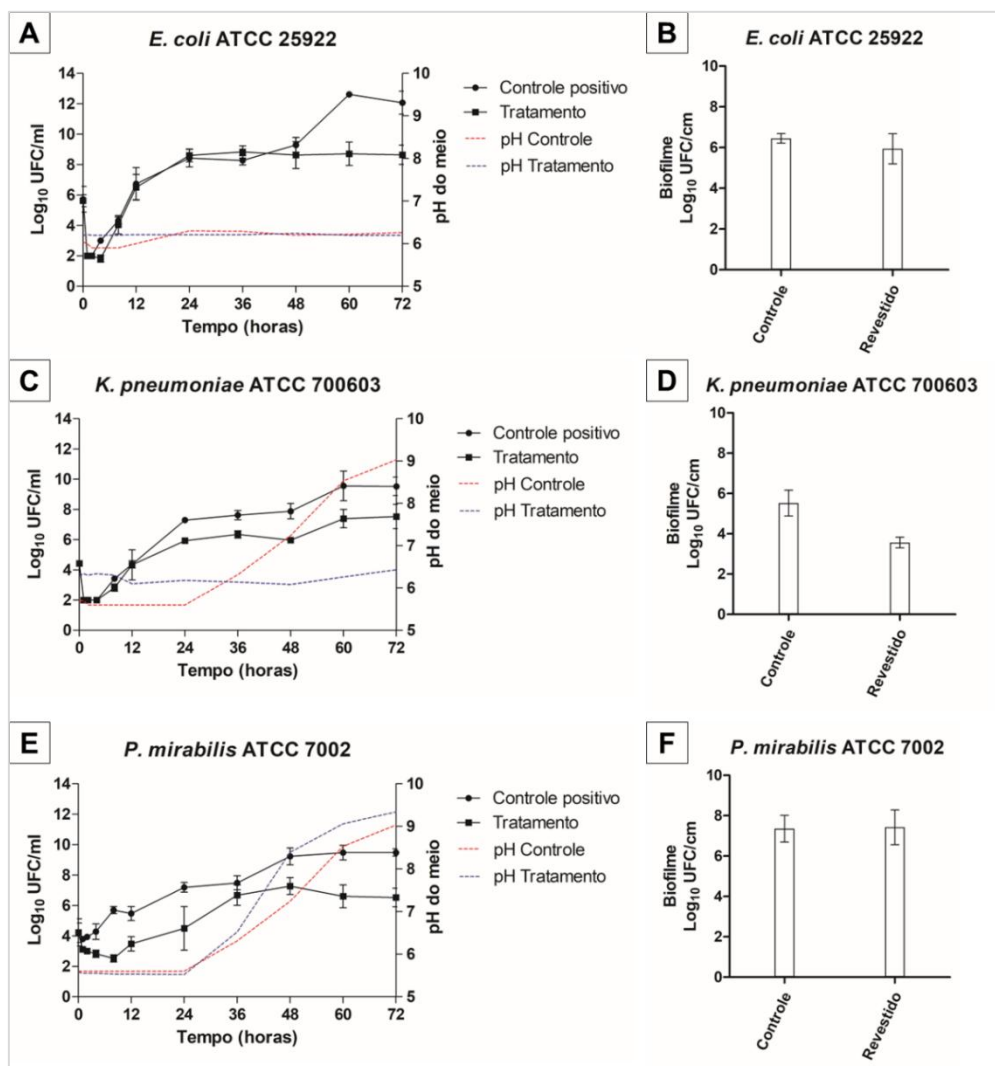


Figura 11- Teste em bexiga *in vitro*. Inóculo inicial com densidade celular a 10^8 UFC.

Legenda: A – Número de células de *E. coli* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. B – Avaliação do biofilme formado por *E. coli* após 72 horas. C – Número de células de *K. pneumoniae* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. D – Avaliação do biofilme formado por *K. pneumoniae* após 72 horas. E – Número de células de *P. mirabilis* liberadas na urina artificial no decorrer do teste. F – Avaliação do biofilme formado por *P. mirabilis* após 72 horas.

Fonte: Autor do trabalho, 2025.

6 Discussão

A atividade antibacteriana de AgNP é extensamente relatada na literatura e está relacionada à liberação de íons de prata (Ag^+), gerando radicais livres e estresse oxidativo (DAKAL *et al.*, 2016; LE OUAY; STELLACCI, 2015). A eficácia antimicrobiana das AgNPs, incluindo suas concentrações inibitória e bactericida mínimas, depende diretamente de características específicas das nanopartículas utilizadas, como tamanho, forma, método de síntese e concentração (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014; LOO *et al.*, 2018).

Estudos avaliando a atividade de AgNP contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* demonstram sua eficácia contra essas bactérias. O estudo de Scandorieiro *et al.* (2016) avaliou a CIM para *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603. Seus resultados foram de 62,25 e 125 μM , respectivamente, semelhantes aos encontrados no presente estudo, sendo 125 μM para todas as cepas testadas (SCANDORIEIRO *et al.*, 2016). Saikawa *et al.*, (2024) avaliou a CIM de bio-AgNP em isolado clínico de *P. mirabilis* e obteve a concentração de 62,25 μM , resultado também próximo ao encontrado no presente estudo (SAIKAWA *et al.*, 2024).

Além da CIM, a CBM também foi avaliada. A CBM obtida por Scandorieiro *et al.* (2016) e Saikawa *et al.*, (2024) foram iguais as CIMs. Em nosso estudo, diferentemente, a CBM foi o dobro da CIM para todas as cepas testadas, ou seja 250 μM . Wypij *et al.*, (2021) também encontrou a CBM contra *K. pneumoniae* sendo o dobro da CIM encontrada (SAIKAWA *et al.*, 2024; SCANDORIEIRO *et al.*, 2016; WYPIJ *et al.*, 2021).

De forma semelhante a CIM e CBM, o tempo obtido na curva de morte depende das características específicas das AgNP. Além disso, o tempo de morte em bactérias expostas a nanopartículas de prata é causado por vários fatores, como, o dano físico à membrana celular, a penetração e absorção de nanopartículas, a extensão da fase de latência bacteriana e a morte exponencial de células bacterianas (KRCE *et al.*, 2020; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). Esses efeitos combinados interrompem o crescimento bacteriano e levam à inativação e decaimento da viabilidade celular bacteriana (HAQUE *et al.*, 2017; MOHAMED *et al.*, 2020).

Em relação a atividade antibiofilme e destruição de biofilme, os testes realizados demonstram a necessidade de um tratamento que impeça a formação inicial de biofilme. Caso o tratamento seja realizado em um biofilme previamente formado ou maduro, as concentrações necessárias de AgNP para sua destruição são muito elevadas. Em contraponto, as concentrações necessárias para evitar sua formação são relativamente mais baixas (ELHARIRY *et al.*, 2018; YANG; ALVAREZ, 2015). Desta forma, embora as AgNP sejam eficazes na prevenção da formação de biofilmes, sua capacidade em destruir biofilmes estabelecidos é limitada, com apenas remoção parcial observada em concentrações mais altas. Outro ponto importante, é que a exposição a doses subletais de AgNP pode estimular a formação de biofilme, sendo o oposto do objetivo inicial (ELHARIRY *et al.*, 2018; YANG; ALVAREZ, 2015).

As CAUTIs são uma preocupação significativa devido à formação de biofilmes, que podem dificultar o tratamento e aumentar a resistência antimicrobiana. Diante desta problemática, estudos anteriores revestiram fragmentos de cateter com AgNP, tanto na parte externa quanto interna de cateteres, buscando evitar a formação de biofilme (LETHONGKAM *et al.*, 2022; SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015). As nanopartículas de prata, apesar de serem promissores agentes antimicrobianos, como sugerem estudos (LIAO; LI; TJONG, 2019), podem apresentar toxicidade a células humanas em concentrações elevadas (RECORDATI *et al.*, 2015). Desta maneira, revestir um dispositivo como o cateter urinário com altas concentrações de AgNP não parece uma solução promissora, dado o possível efeito citotóxico que elas podem possuir. Tendo em vista essas questões, buscamos elaborar uma metodologia de revestimento interno, onde o contato com a nanopartículas não acontece com seu usuário, somente com a urina e os possíveis patógenos que poderiam se aderir ao cateter (SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015).

Metodologias de revestimentos utilizando PDA já são exploradas e demonstram a capacidade de fixar prata em cateteres urinários (GODA *et al.*, 2022; SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015). Nossos resultados demonstram a eficácia da metodologia de revestimento utilizada com base na presença de prata encontrada no cateter revestido. A PDA possui capacidade de se autopolimerizar em pH alcalino, formando redes de macromoléculas que permitem a adesão das AgNP (GAO *et al.*, 2024). Isso permite a fixação das AgNP em diversos dispositivos

médicos, como os cateteres urinários utilizados neste estudo.

Os resultados nos testes realizados no modelo de bexiga *in vitro* demonstraram que o cateter revestido foi eficaz para prevenir a formação de biofilme e a liberação de células de *E. coli* com inóculos com baixa densidade celular ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). No entanto, com inóculos mais elevados ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), houve formação de biofilme mesmo no cateter revestido. Esse resultado sugere que, embora promissor, o revestimento com AgNP pode ter limitações, especialmente em casos de altas cargas bacterianas.

Para *K. pneumoniae*, o cateter revestido possibilitou a redução do número de células formadores de biofilme nas duas concentrações celulares testadas. Isso demonstra que o revestimento pode ser efetivo na diminuição do biofilme (GODA *et al.*, 2022).

Estudos anteriores realizaram o ensaio de incrustação para avaliar a capacidade de redução de biofilme. Esses estudos demonstraram que fragmentos de cateter urinário revestidos com AgNP possuíam a capacidade de reduzir a formação de biofilme e evitar a incrustação de *P. mirabilis* (SAIKAWA *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2015). No entanto, os trabalhos citados apresentaram resultados preliminares e não realizaram o ensaio de modelo de bexiga *in vitro*. Nossos resultados não corroboram com a perspectiva dos achados anteriores, sendo que não houve diferença entre os testes em modelo de bexiga *in vitro* com o cateter revestido e o controle para *P. mirabilis*.

Nossa hipótese inicial era de que o cateter revestido com AgNP seria eficaz na inibição da formação de biofilmes e incrustações por *P. mirabilis*. No entanto, os testes realizados em modelo de bexiga *in vitro* demonstraram que não houve diferença entre o cateter revestido e o controle. Esses resultados sugerem que a infecção por *P. mirabilis* em cateteres pode ser mais complexa e multifatorial do que se imaginava, demandando investigações adicionais para compreender os mecanismos envolvidos.

Os resultados obtidos no teste em modelo de bexiga *in vitro* demonstram que a capacidade de produção do biofilme no cateter pode ser relacionado a densidade celular bacteriana e a produção de urease pelas bactérias, observado em *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, possibilitando produção de biofilme no tanto no cateter pristino quanto no cateter revestido.

A atividade da urease de *P. mirabilis* eleva o pH da urina, isso

ocasiona a formação de cristais de apatita a estruvita, podendo ter um efeito protetor, não permitindo o contato do microrganismo com as nanopartículas de prata, impedindo desta forma sua ação. Em *K. pneumoniae*, a atividade da urease pode atuar de maneira semelhante à de *P. mirabilis*, formando cristais e impedindo a ação das AgNP. No entanto, a urease de *K. pneumoniae* não apresenta a mesma eficiência enzimática que a de *P. mirabilis* (BROOMFIELD *et al.*, 2009).

Estudos anteriores têm buscado desenvolver estratégias que visem evitar a formação de biofilme em cateteres urinários por uropatógenos. Estudos como o de Rani *et al.*, (2016) e Burns *et al.*, (2021), usam estratégias que consistem no tratamento da urina artificial com compostos visando evitar a adesão, colonização e formação de biofilme nestes dispositivos (BURNS; MCCOY; IRWIN, 2021; RANI *et al.*, 2016). Os testes realizados desta forma demonstram-se resultados positivos e são considerados promissores no tratamento de infecções relacionadas a cateter. Porém, abordagens semelhantes em pacientes podem ser mais complexas devido a diversos fatores, inclusive respostas imunológicas. Além disso, fatores clínicos, como o tempo de uso do cateter, a frequência de substituição e a suscetibilidade individual do paciente, podem influenciar significativamente a eficácia dessas estratégias. Contudo, para implementação clínica, futuros estudos em modelos *in vivo* são necessários, incluindo a avaliação da toxicidade prolongada das AgNP e sua potencial liberação no organismo.

7 Conclusão

O presente estudo demonstrou a excelente capacidade bactericida que AgNP possuem contra as cepas analisadas. Ademais, esse antimicrobiano possui excelente atividade antibiofilme nos testes realizados, porém atividade das AgNP é limitada quando se trata de destruir um biofilme pré-formado.

É importante ressaltar que o cateter urinário revestido com AgNP provou ser notavelmente eficaz na prevenção da formação de biofilme por *E. coli*, um agente etiológico comum de infecções do trato urinário. A presença de AgNP no revestimento do cateter inibiu significativamente a adesão e proliferação de *E. coli*, reduzindo assim o risco de infecções associadas ao cateter. Para *K. pneumoniae*, o cateter revestido reduziu a formação de biofilme em ambas as concentrações testadas. A eficácia do revestimento foi dependente da densidade

do inóculo bacteriano e das espécies bacterianas, sugerindo que o nível de proteção pode variar dependendo da carga bacteriana e das espécies presentes.

Por outro lado, o cateter revestido com nanopartículas de prata não demonstrou a mesma eficiência contra *P. mirabilis*. A falta de eficácia contra esse patógeno específico não indica a falta de ação contra outros uropatógenos. Futuras investigações devem explorar modificações no design, métodos de revestimento interno e composição das nanopartículas, bem como a otimização das condições de aplicação, para ampliar o espectro de ação do revestimento e melhorar a proteção contra uma gama mais ampla de patógenos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. *et al.* General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. **Biology**, v. 13, n. 2, p. 78, fev. 2024.
- ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 1 dez. 2016.
- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.
- ALHARBI, N. S.; ALSUBHI, N. S.; FELIMBAN, A. I. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 15, n. 3, p. 109–124, 1 set. 2022.
- ANDERSON, T. Healed trauma in an early Bronze Age human skeleton from Buckinghamshire, England. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 12, n. 3, p. 220–225, maio 2002.
- ARAFI, V. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* endeavors: an insight into the characteristic features, resistance mechanism, and treatment choice. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 6, p. 226, jun. 2023.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, 2012a.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, nov. 2012b.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.
- ARONSON, J. K.; HENEGHAN, C.; FERNER, R. E. Medical Devices: Definition, Classification, and Regulatory Implications. **Drug Safety**, v. 43, n. 2, p. 83–93, 1 fev. 2020.
- ASSADI, F. Strategies for preventing catheter-associated urinary tract infections. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 9, n. 1, p. 50, 2018.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, p. 123–144, 1 mar. 2019.
- BEYENE, H. D. *et al.* Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles

(AgNP), a review. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 13, p. 18–23, 1 set. 2017.

BROOMFIELD, R. J. *et al.* Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 1367–1375, 2009.

BURDUŞEL, A.-C. *et al.* Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 681, 31 ago. 2018.

BURNS, J.; MCCOY, C. P.; IRWIN, N. J. Synergistic activity of weak organic acids against uropathogens. **Journal of Hospital Infection**, v. 111, p. 78–88, 1 maio 2021.

CHEN, R. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* from urinary tract infections in Shandong, China. **International Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 1157–1166, 5 maio 2023.

CHENOWETH, C. E. Urinary Tract Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 857–870, dez. 2021.

CLARKE, K. *et al.* Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Adults: Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Hospital Medicine**, v. 15, n. 9, p. 552–556, 1 set. 2020.

DAKAL, T. C. *et al.* Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 16 nov. 2016.

DRZEWIECKA, D. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. **Microbial ecology**, v. 72, p. 741–758, 2016.

ELHARIRY, H. *et al.* Antibiofilm potential of biogenic silver nanoparticles against *Kocuria rosea* And *Kocuria rhizophila*. **Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 9–20, jan. 2018.

EL-MAHDY, R.; MAHMOUD, R.; SHRIEF, R. Characterization of *E. coli* Phylogroups Causing Catheter-Associated Urinary Tract Infection. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 3183–3193, 16 ago. 2021.

FOX-MOON, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. Urinary tract infections caused by *Proteus mirabilis*. Em: **Molecular Medical Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1389–1400.

GAO, S. *et al.* Advances and opportunities of polydopamine coating in biosensing: Preparation, functionality, and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 501, p. 215564, 15 fev. 2024.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, maio 2017.

GHAFFARI-MOGHADDAM, M. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 548–557, 1 abr. 2014.

GODA, R. M. *et al.* Combating Bacterial Biofilm Formation in Urinary Catheter by

Green Silver Nanoparticle. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 495, 8 abr. 2022.

GOVINDARAJAN, D. K. *et al.* Adherence patterns of *Escherichia coli* in the intestine and its role in pathogenesis. **Medicine in Microecology**, v. 5, p. 100025, 1 set. 2020.

HAQUE, M. A. *et al.* An experiment-based model quantifying antimicrobial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **RSC Advances**, v. 7, n. 89, p. 56173–56182, 2017.

HOLDEN, V. I. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during Pneumonia. **mBio**, v. 7, n. 5, p. 10.1128/mbio.01397-16, 13 set. 2016.

IMANI RAD, H. *et al.* Allicin prevents the formation of *Proteus*-induced urinary crystals and the blockage of catheter in a bladder model *in vitro*. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 293–301, 1 jul. 2019.

JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460–465, 2011.

JAMKHANDE, P. G. *et al.* Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, p. 101174, 1 out. 2019.

JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 55, n. 9, p. 2198–2203, 1987.

KRCE, L. *et al.* Bacteria Exposed to Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Water: Modelling *E. coli* Growth and Inactivation. **Materials**, v. 13, n. 3, p. 653, 1 fev. 2020.

KWIECINSKA-PIRÓG, J. *et al.* *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1423–1431, dez. 2014.

LAMIN, E.; NEWMAN, D. K. Clean intermittent catheterization revisited. **International Urology and Nephrology**, v. 48, n. 6, p. 931–939, jun. 2016.

LE OUAY, B.; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p. 339–354, jun. 2015.

LETHONGKAM, S. *et al.* Eucalyptus-Mediated Synthesized Silver Nanoparticles-Coated Urinary Catheter Inhibits Microbial Migration and Biofilm Formation. **Nanomaterials**, v. 12, n. 22, p. 4059, 18 nov. 2022.

LI, B. *et al.* Molecular Pathogenesis of *Klebsiella Pneumoniae*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1071–1081, set. 2014.

LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 449, 21 jan. 2019.

- LOO, Y. Y. *et al.* In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1555, 16 jul. 2018.
- MALEKZADEGAN, Y. *et al.* Distribution of virulence genes and their association with antimicrobial resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Iranian patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 572, 15 nov. 2018.
- MANCUSO, G. *et al.* Novel Antimicrobial Approaches to Combat Bacterial Biofilms Associated with Urinary Tract Infections. **Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 154, 4 fev. 2024.
- MANOS, J.; BELAS, R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **The Prokaryotes**, p. 245–269, 2006.
- MARKLEW, A. Urinary catheter care in the intensive care unit. **Nursing in Critical Care**, v. 9, n. 1, p. 21–27, jan. 2004.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 4, 22 jan. 2018.
- MOHAMED, D. S. *et al.* Antimicrobial Activity of Silver-Treated Bacteria against other Multi-Drug Resistant Pathogens in Their Environment. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 181, 15 abr. 2020.
- MURPHY, C. N. *et al.* Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 8, p. 3009–3017, ago. 2013.
- MURPHY, C. N.; CLEGG, S. *Klebsiella pneumoniae* and Type 3 Fimbriae: Nosocomial Infection, Regulation and Biofilm Formation. **Future Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 991–1002, ago. 2012.
- NICOLLE, L. E. Catheter associated urinary tract infections. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 3, n. 1, p. 23, 25 jul. 2014.
- NZAKIZWANAYO, J. *et al.* An In Vitro Bladder Model for Studying Catheter-Associated Urinary Tract Infection and Associated Analysis of Biofilms. Em: PEARSON, M. M. (Ed.). **Proteus mirabilis: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer, 2019. p. 139–158.
- PACZOSA, M. K.; MECASAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, set. 2016.
- PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, out. 2015.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical**

Microbiology Reviews, v. 11, n. 4, p. 589–603, out. 1998.

PRYWER, J.; SADOWSKI, R. R.; TORZEWSKA, A. Aggregation of Struvite, Carbonate Apatite, and *Proteus mirabilis* as a Key Factor of Infectious Urinary Stone Formation. **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 3, p. 1446–1451, 4 mar. 2015.

RANI, S. A. *et al.* Irrigation with N,N-dichloro-2,2-dimethyltaurine (NVC-422) in a citrate buffer maintains urinary catheter patency in vitro and prevents encrustation by *Proteus mirabilis*. **Urolithiasis**, v. 44, n. 3, p. 247–256, jun. 2016.

RECORDATI, C. *et al.* Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 12, dez. 2015.

REU, C. E. *et al.* Epidemiology of pathogens causing urinary tract infections in an urban community in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 505–507, 2018.

RICARDO, S. I. C. *et al.* A Glance at Antimicrobial Strategies to Prevent Catheter-Associated Medical Infections. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 12, p. 3109–3130, 11 dez. 2020.

ROCHA, S. P. D.; PELAYO, J. S.; ELIAS, W. P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 1–7, 2007.

RUBI, H.; MUDEY, G.; KUNJALWAR, R. Catheter-Associated Urinary Tract Infection (CAUTI). **Cureus**, 17 out. 2022.

SABIR, N. *et al.* Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 10, p. 1101–1105, out. 2017.

SAIKAWA, G. I. A. *et al.* Green-Synthesized Silver Nanoparticles in the Prevention of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Infection and Incrustation of Urinary Catheters BioAgNP Against *P. mirabilis* Infection. **Current Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 100, abr. 2024.

SANCHES, M. S. *et al.* Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 685–694, 2019.

SANCHES, M. S. *et al.* Prevalence of Antimicrobial Resistance and Clonal Relationship in ESBL/AmpC-Producing *Proteus mirabilis* Isolated from Meat Products and Community-Acquired Urinary Tract Infection (UTI-CA) in Southern Brazil. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, 2023.

SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, out. 2022.

SCANDORIEIRO, S. *et al.* Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 23 maio 2016.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. **Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management**, p. 383–433, 2017.

SHUMAN, E. K.; CHENOWETH, C. E. Urinary Catheter-Associated Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 885–897, dez. 2018.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, jul. 2004.

SORA, V. M. *et al.* Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1355, nov. 2021.

STICKLER, D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **Journal of internal medicine**, v. 276, n. 2, p. 120–129, 2014.

STICKLER, D. J.; MORRIS, N. S.; WINTERS, C. Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. Em: **Methods in Enzymology**. Biofilms. [s.l.] Academic Press, 1999. v. 310p. 494–501.

THOMSEN, T. R. *et al.* The Role of Bacterial Biofilms in Infections of Catheters and Shunts. Em: BJARNSHOLT, T. *et al.* (Eds.). **Biofilm Infections**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 91–109.

TRIPATHI, N.; GOSHISHT, M. K. Recent Advances and Mechanistic Insights into Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 4, p. 1391–1463, 18 abr. 2022.

VENKATARAMAN, R.; YADAV, U. Catheter-associated urinary tract infection: an overview. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 5–10, 16 jan. 2023.

VUOTTO, C. *et al.* Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743–758, 5 set. 2014.

WANG, R. *et al.* Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 3, p. 519–528, abr. 2015.

WERNEBURG, G. T. Catheter-Associated Urinary Tract Infections: Current Challenges and Future Prospects. **Research and Reports in Urology**, v. 14, p. 109–133, 4 abr. 2022.

WYPIJ, M. *et al.* Green Synthesized Silver Nanoparticles: Antibacterial and Anticancer Activities, Biocompatibility, and Analyses of Surface-Attached Proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 632505, 22 abr. 2021.

YANG, Y.; ALVAREZ, P. J. J. Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 2,

n. 8, p. 221–226, 11 ago. 2015.

YAO, Q. *et al.* Current material engineering strategies to prevent catheter encrustation in urinary tracts. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100413, dez. 2022.

YU, Y. *et al.* Urethral Catheter Biofilms Reveal Plasticity in Bacterial Composition and Metabolism and Withstand Host Immune Defenses in Hypoxic Environment. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 667462, 23 jun. 2021.

ZHOU, Y. *et al.* Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 10537, 23 jun. 2023.

ZUNINO, P. *et al.* *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, v. 149, n. 11, p. 3231–3237, 2003.

APÊNDICE A – PEDIDO DE PATENTE BR 10 2024 016343 5**DECLARAÇÃO DO INVENTOR – CRIADOR**

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): **MÉTODO DE REVESTIMENTO INTERNO PARA CATETERES URINÁRIOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Resumo: A presente invenção descreve um cateter com um revestimento interno de nanopartículas de prata. O revestimento é composto por camadas alternadas de polidopamina e nanopartículas de prata, onde a polidopamina atua como agente de fixação das nanopartículas. O processo de revestimento é realizado através da passagem das soluções contendo polidopamina e nanopartículas de prata internamente ao cateter. Este revestimento proporciona atividade antimicrobiana, oferecendo proteção eficaz contra uropatógenos. Além disso, impede a formação de biofilme, que é um fator comum em infecções relacionadas a cateteres. Esta invenção melhora significativamente a segurança e a eficácia dos cateteres, reduzindo o risco de infecções e aumentando a durabilidade e a funcionalidade do dispositivo.

Figura a publicar: fig2

APÊNDICE B - Artigo submetido a revista Current Microbiology (Fator de impacto 2.3)

Antibiofilm activity of silver nanoparticle-coated urinary catheter against CAUTIs pathogens: an in vitro study

Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹, Victor Hugo Montini², Jennifer Germiniani Cardozo², Luana Carvalho Silva¹, Bruno Dias de Oliva¹, Arthur Bossi Nascimento¹, Gerson Nakazato², Admilton Gonçalves de Oliveira Junior³, Sergio Paulo Dejato Rocha^{1*}.

¹Laboratory of Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

²Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

³Laboratory of Microbial Biotechnology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil

*Corresponding author: Prof. Dr. Sergio Paulo Dejato Rocha Department of Microbiology, Center of Biological Science, State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid PO-BOX 6001, 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil. Tel/Fax: 55 43 33714494. E-mail: rochaspd@uel.br

Abstract

Catheter-associated urinary tract infections (CAUTI) are among the most common nosocomial infections. Therefore, this study developed a method for coating urinary catheters with BioAgNP using polydopamine as an anchoring agent. The nanoparticles presented a minimum inhibitory concentration (MIC) of 125 μ M and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 250 μ M for all strains tested. Concentrations equal to or greater than the MIC inhibited biofilm formation on polystyrene plates, while preformed biofilms required higher concentrations. The coating was applied to the internal part of the catheter, and the presence of silver was confirmed. In an in vitro bladder model, the coated catheter inhibited *E. coli* biofilm formation and reduced biofilm formation by *K. pneumoniae*, but not by *P. mirabilis*. The efficiency against *E. coli* and *K. pneumoniae* was dependent on the initial bacterial load. These results suggest that although silver nanoparticle coating has the potential to prevent urinary

catheter-associated infections, its efficacy varies depending on the bacterial species and initial colonization conditions.

Keywords: Antimicrobial coating; CAUTI; Infection control; *In vitro* bladder model.

Introduction

Catheter-associated urinary tract infections (CAUTIs) represent a significant global healthcare challenge, ranking among the most prevalent healthcare-associated infections [1]. A variety of pathogens can cause these infections, with *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* being frequently implicated [2]. The ability of these pathogens to establish persistent infections and develop resistance to standard antimicrobial therapies creates a considerable obstacle in the effective management of UTIs, particularly in patients with indwelling urinary catheters [3, 4].

Biofilm formation on the surface of urinary catheters is a key factor in the development of CAUTIs. Biofilms protect bacterial pathogens from the host's immune defenses and enhance their resistance to various antimicrobial treatments. Additionally, biofilms can serve as reservoirs, facilitating the reinfection of the urinary tract and compromising treatment effectiveness due to recurrent infections [5].

The prevention of biofilm formation on catheters has become a major focus of research, with strategies aimed at inhibiting pathogen adhesion and subsequent biofilm development [5]. One promising approach involves coating urinary catheters with silver nanoparticles (AgNP), including biogenic AgNP, which have demonstrated potential for preventing biofilm formation on these medical devices [6, 7].

The use of polydopamine (PDA) to anchor antimicrobial substances onto medical device surfaces has emerged as a promising approach for preventing device-associated infections. PDA exhibits unique adhesive properties, enabling its attachment to a wide range of materials, including AgNP [6–8].

Therefore, this study aimed to develop a coating methodology for urinary catheters using AgNP as an antimicrobial agent and to evaluate the efficacy of this coating in reducing biofilm formation by uropathogenic bacteria in an *in vitro* bladder model.

Materials and methods

Bacterial strains

This study utilized the bacterial strains *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703, and *P. mirabilis* ATCC 7002. Cultures were maintained in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) supplemented with 25% glycerol at -20 °C.

Biogenic Silver Nanoparticles

Biogenic silver nanoparticles (BioAgNP), marketed as NanoVerdeAg™, (GRAL Bioativos™, Brazil). These BioAgNP were synthesized using *Trichilia catigua* extract and had an average diameter of 82.73 nm, a zeta potential of -23.27 mV, and a polydispersity index (PI) of 0.17.

Determination of Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method in a 96-well plate with a final volume of 100 µL, following the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Eight concentrations (1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM, 31.25 µM, and 15.625 µM) were tested in triplicate. The initial preparation was conducted in 50 µL of Mueller-Hinton Broth (MHB) (BD DIFCO™, USA) with twice the final concentrations of AgNP. Subsequently, 50 µL of each bacterial strain, adjusted to a cell density of 1.5×10^6 CFU/mL, was inoculated into each well, achieving the desired final concentration.

The MIC was determined visually and defined as the lowest concentration of AgNP capable of completely inhibiting microbial growth. The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest concentration of AgNP required to eliminate at least 99.9% of bacteria during the treatment period (NCCLS, 1999). All tests were performed in triplicate.

Time-kill curve

The time-kill curve assay was conducted in accordance with the guidelines established by the CLSI (CLSI, 1999). The assessment involved evaluating bacterial viability at specific time intervals: 0, 15, and 30 minutes, as well as 1, 2, 4, 8, 12, and 24 hours post-incubation. The experiment included both a positive growth control (bacteria without treatment) and

samples treated with the MBC previously determined for each bacterial strain. Colony counts were performed at each time point, and the data were used to generate a graph illustrating the relationship between log₁₀ CFU/mL (colony-forming units per milliliter) and time.

Biofilm formation inhibition assay

The biofilm formation inhibition assay was conducted following the methodology described by [9]. The assay was performed in 96-well polystyrene plates, with each well containing a final volume of 200 μ L. Colonies cultivated on Mueller-Hinton Agar (MHA) (BD DIFCO™, USA) were suspended and adjusted to a 0.5 McFarland standard (equivalent to 1.5×10^8 CFU/mL). Subsequently, 10 μ L of this adjusted suspension was inoculated into 990 μ L of MHB. Aliquots of 100 μ L of this inoculum-containing solution were then added, in sextuplicate, to 100 μ L of sterile MHB supplemented with varying concentrations of AgNP (1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62.5 μ M, and 31.25 μ M). The plates were then incubated at 37°C for 24 hours.

The biofilm inhibition activity of AgNP was calculated using the formula:

$$\text{Biofilm inhibition} = \left(\frac{OD \text{ sample} - OD \text{ negative control}}{OD \text{ positive control} - OD \text{ negative control}} \right) - 1$$

Biofilm destruction activity

The microorganisms were cultivated on MHA for 18-24 hours at 37°C to allow for colony formation. The resulting colonies were then suspended in MHB broth to achieve a standard turbidity of 0.5 on the McFarland scale, equivalent to a cell density of 1.5×10^8 CFU/mL. This suspension was subsequently diluted in MHB to yield an inoculum of approximately 1.5×10^5 CFU/mL. Following this, 200 μ L of the diluted inoculum were transferred to individual wells of polystyrene microplates. The microplates were incubated at 37°C for 24 hours to facilitate biofilm formation. After the incubation period, the wells were washed three times with 200 μ L of PBS (containing 0.115% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄, 0.8% NaCl, and 0.02% KCl at pH 7.4) to effectively remove any non-adhered cells.

The following concentrations were evaluated: 32.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 μ M. Solutions were prepared in MHB, and 200 μ L of each concentration were applied to the

established biofilm. The plates were then incubated for an additional 24 hours at 37°C. All tests were performed in sextuplicate.

Following the incubation period, the well contents were aspirated, and the wells were washed three times with 100 µL of PBS. An MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (Roche™, Germany) was prepared in PBS at a concentration of 0.5 mg/mL, filter-sterilized, and stored at -20°C. Subsequently, 100 µL of the MTT solution were added to each well, and the plate was incubated for 4 hours at 37°C in the dark. Absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer.

To calculate the percentage of cell viability of biofilms, the following formula was used:

$$\% \text{ of biofilm destruction} = \frac{OD \text{ Sample} - OD \text{ negative control}}{OD \text{ positive control} - OD \text{ negative control}} \times 100$$

Urinary catheter coating

Three-way, size 24, siliconized latex Foley catheters (Solidor™, Brazil) were coated following a previously described protocol [6]. Briefly, the coating was applied by internally perfusing the catheter with the formulated substances. Dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich™, Germany) served as the anchoring agent, and BioAgNP were used as the antimicrobial substance.

Thus, the urinary catheter coating was applied by internally perfusing the catheter with the formulated substances (ESM Fig. S1). Briefly, 20 mL of a dopamine hydrochloride solution (2 mg/mL in 10 mM Tris-base, pH 8.5) was passed through the catheter lumen at a flow rate of 30 mL/min for 24 hours. Subsequently, 20 mL of a 5 mM AgNP solution was passed through the catheter lumen at the same flow rate and duration. This process was repeated until a catheter with three alternating layers of polydopamine and AgNP was obtained, with the final layer consisting of AgNP.

Scanning electron microscopy and composition analysis

Catheter segments (both pristine and coated) were sputter-coated with carbon using a BAL-TEC SCD 050 (Bal-tec™, USA) carbon evaporator. Subsequently, the samples were examined using a TESCAN VEGA scanning electron microscope (Tescan™, Czech).

Secondary electron imaging was used to assess surface topography, and energy-dispersive spectroscopy was employed to analyze elemental composition.

Artificial urine

Synthetic urine (SU) was prepared with the following components: CaCl₂ (0.49 g/L), NaCl (4.6 g/L), MgCl₂·6H₂O (0.65 g/L), Na₂SO₄ (2.3 g/L), trisodium citrate (0.65 g/L), KH₂PO₄ (2.8 g/L), sodium oxalate (0.02 g/L), KCl (1.6 g/L), NH₄Cl (1.0 g/L), urea (25.0 g/L), gelatin (5.0 g/L), and tryptic soy broth (5.0 g/L). The basal medium, excluding urea and calcium chloride, was sterilized by autoclaving. Urea and calcium chloride solutions were prepared separately, sterilized by filtration using a 0.22 μm membrane, and then added to the sterile basal medium.

In vitro bladder model assay

The *in vitro* bladder model was constructed based on a previously described method [10], with modifications as outlined in [11]. The bladder was secured to a universal support within a laminar flow hood. A size 24, three-way, siliconized latex Foley catheter was aseptically inserted into the bladder chamber, and the retention balloon was inflated with 30 mL of sterile, deionized water. A sterile Erlenmeyer flask was positioned below the catheter to collect drained urine. Artificial urine was continuously infused into the catheter's inner chamber at a rate of 0.5 mL/min. As the bladder filled, excess urine drained through the catheter into the collection flask.

Prior to testing, 20 μL of the bacterial inoculum was introduced into the catheter tip (Section 1, ESM Fig. S2, adapted from [12]) and allowed to rest for 30 minutes to facilitate bacterial adhesion. Experiments were conducted using two bacterial inoculum densities: 1.5 x 10⁶ and 1.5 x 10⁸ CFU/mL. The *in vitro* bladder model test lasted 72 hours. Samples were collected at various time points (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 60, and 72 h) for CFU enumeration and pH measurement. Each bacterial strain was tested with both an uncoated catheter (control) and a coated catheter (treatment).

At each predetermined time point, the catheter was removed, and a 1 cm segment immediately below the retention balloon was aseptically excised (Section 2, ESM Fig. S2, adapted from [12]). This segment was washed twice in buffered saline and then sonicated for 10 minutes to dislodge the biofilm. Following sonication, serial dilutions were performed to enumerate viable biofilm cells in CFU. The number of CFU was determined to calculate the CFU per cm of catheter length.

Statistical analysis

All tests were performed in triplicate. The results obtained were demonstrated by the mean driven by the standard deviation. The R package statmod (<https://cran.r-project.org/web/packages/statmod/statmod.pdf>) was used to compare the death and test curves in the in vitro model using permutation tests. The p-values were calculated by simulation, and values less than $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration

The minimum inhibitory and bactericidal concentrations were determined for the tested strains. The MICs for *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 600703 and *P. mirabilis* ATCC 7002 were 125 μM and the MBC was 250 μM .

Inhibition of biofilm formation

A range of AgNP concentrations was tested, including sub-inhibitory concentrations (31.25 μM and 62.5 μM) and inhibitory concentrations (125 μM to 1000 μM). The results are presented in Figure 1.

Time kill curve

A kill curve assay was performed using the bactericidal concentration of AgNP for the tested strains. A reduction in cell viability was observed for all strains within the first 15 minutes of contact with the nanoparticles. *P. mirabilis* ATCC 7002 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 exhibited complete loss of cell viability approximately 1 hour after the start of the assay, while *E. coli* ATCC 25922 demonstrated complete loss of viability in approximately 2 hours. The time-kill curves for all bacteria are presented in Figure 2.

Biofilm destruction

Pre-formed biofilms were treated with AgNP concentrations ranging from 31.25 μM to 1000 μM . *E. coli* biofilms exhibited reduced cell viability after treatment with sub-inhibitory concentrations. Increasing AgNP concentrations further reduced biofilm viability. For *K. pneumoniae*, the sub-inhibitory concentration of 31.25 μM did not reduce biofilm

viability; instead, viability increased compared to the control. Subsequent increases in AgNP concentration correlated with reductions in biofilm viability. *P. mirabilis* biofilms showed increased metabolic activity at concentrations from 31.25 μM to 250 μM compared to the control. At 500 μM and 1000 μM , however, *P. mirabilis* biofilm viability decreased. The results of the biofilm disruption assay are presented in Figure 3.

Urinary catheter coating

The inner surface of the urinary catheter was coated using polydopamine as an anchoring agent for the AgNP. A polydopamine solution was perfused through the catheter lumen at a flow rate of 30 mL/min for approximately 24 hours. Under appropriate conditions, polydopamine self-polymerizes and adheres to surfaces, undergoing a color change from colorless to brownish during this process. Figure 4 illustrates the difference between a pristine (uncoated) catheter and a coated catheter with three alternating layers of polydopamine and AgNP, with the outermost layer consisting of AgNP. The dark coloration (Figure 4B) confirms the successful coating, indicating both dopamine polymerization and the subsequent deposition of AgNP layers.

Characterization of the internal surface of the urinary catheter

The inner surface of both pristine and coated catheters was characterized using EDS. Catheter fragments were analyzed to identify the elemental composition of their surfaces.

EDS analysis confirmed the presence of silver on the inner surface of the coated catheter and its absence in the pristine catheter, demonstrating the effectiveness of silver immobilization in the coating process. Table 1 presents the other elements identified by EDS in the catheter coating, in addition to silver.

Figure 5 is an image obtained through scanning electron microscopy in association with EDS analysis. The image demonstrates the presence of silver adhered to the internal surface of the catheter.

In vitro bladder model assay

The *in vitro* bladder model assay was conducted using both pristine (uncoated) catheters as controls and coated catheters as the treatment group. For all tested bacterial

strains, the assay was performed using two initial inoculum concentrations: 1.5×10^6 and 1.5×10^8 CFU.

The assay performed with *E. coli* is shown in Figure 6A. With an initial inoculum concentration of 1.5×10^6 cells/mL, a reduction in the number of bacterial cells released in the urine was observed within the first hour for the coated catheter (treatment group). In contrast, the uncoated catheter (positive control group) showed an increase in the number of cells released throughout the assay.

Biofilm formation on the catheters was quantified by direct viable cell counts (Figure 6B). The control catheter (uncoated) exhibited a bacterial load of Log_{10} 6.83, while no biofilm formation was observed on the coated catheter.

These two evaluations illustrate the process of catheter-associated adhesion and colonization. The coated catheter effectively prevented *E. coli* cell adhesion, thereby inhibiting bacterial multiplication within the catheter lumen. This inhibitory effect is evidenced by the absence of bacterial cells released into the urine during the assay. Furthermore, the coating prevented cell adhesion to the catheter surface, thus averting colonization and subsequent biofilm formation.

For *K. pneumoniae*, in the assay with an initial inoculum of 1.5×10^6 cells/mL, evaluation of cell release in artificial urine showed a greater release of cells in the positive control. This difference is likely attributed to the reduced number of bacterial cells adhering to the coated catheter (Figure 6C). The biofilm formed by *K. pneumoniae* on the coated catheter was significantly smaller (Log_{10} 3.56) compared to the positive control (Log_{10} 5.52) (Figure 6D).

Evaluation of the catheters was also performed with *P. mirabilis*. In the assay using an initial inoculum of 1.5×10^6 CFU, minimal differences were observed between the positive control and the coated catheter. The release of viable cells in the coated catheter was similar to that observed in the control (Figure 6E). Biofilm formation after 72 hours was Log_{10} 6.90 for the positive control and Log_{10} 7.05 for the coated catheter (Figure 6F).

The assay with *E. coli* was also performed with an initial inoculum concentration of 1.5×10^8 cells/mL, yielding different results. Figure 7A shows an increase in the number of bacterial cells released into the urine in both the positive control and coated catheter groups. Biofilm formation was observed on both the positive control and coated catheters, although the biofilm on the coated catheter appeared to be less extensive (Figure 7B).

For *K. pneumoniae*, in the assay with an initial inoculum of 1.5×10^8 cells/mL, evaluation of cell release in artificial urine demonstrated lower cell release in the coated

catheter group compared to the control group (Figure 7C). The biofilm formed on the coated catheter was also smaller (Log_{10} 3.81) compared to the control (Log_{10} 6.42) (Figure 7D).

The assay with *P. mirabilis*, using an initial inoculum of 1.5×10^8 CFU, showed minimal differences between the positive control and the coated catheter. The release of viable cells from the coated catheter was slightly lower compared to the control (Figure 7E). After 72 hours, biofilm formation was Log_{10} 7.45 on the positive control and Log_{10} 7.42 on the coated catheter (Figure 7F)

Discussion

The antibacterial activity of AgNP is well documented in the literature and is attributed to the release of silver ions (Ag^+), which induce the formation of free radicals and oxidative stress [13, 14]. Both minimum inhibitory and bactericidal activity are directly influenced by the specific characteristics of the AgNP employed, including size, shape, synthesis method, and concentration [15, 16].

Studies evaluating the activity of AgNP against *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. mirabilis* have demonstrated their efficacy against these bacteria. The study by Scandorieiro *et al.* (2016) evaluated the MIC for *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603, reporting values of 62.25 μM and 125 μM , respectively. These results are consistent with those obtained in the present study, where the MIC was 125 μM for all tested strains [17]. Saikawa *et al.* (2024) evaluated the MIC of bio-AgNP in a clinical isolate of *P. mirabilis* and obtained a value of 62.25 μM , which is also similar to the findings of the present study [7].

In addition to the MIC, the MBC was also evaluated. Scandorieiro *et al.* (2016) and Saikawa *et al.* (2024) reported MBC values equivalent to their respective MICs. In the present study, however, the MBC was twofold the MIC for all tested strains, i.e., 250 μM . Similarly, Wypij *et al.* (2021) also observed the MBC of *K. pneumoniae* to be twice the inhibitory concentration [7, 17, 18].

Similar to MIC and MBC, the time required for bacterial inactivation in the time-kill assay is influenced by the specific characteristics of the AgNP. Furthermore, the bactericidal effect of silver nanoparticles is attributed to a combination of factors, including physical damage to the cell membrane, nanoparticle penetration and accumulation, the duration of the bacterial latency phase, and the subsequent exponential death of bacterial cells [19, 20]. These combined effects disrupt bacterial growth, ultimately leading to cell inactivation and loss of viability [21, 22].

Regarding antibiofilm activity and biofilm disruption, the present study highlights the

importance of preventative treatment strategies targeting initial biofilm formation. Treatment of pre-formed or mature biofilms requires significantly higher AgNP concentrations for effective disruption [23, 24]. Conversely, lower concentrations are sufficient to prevent initial biofilm formation. While AgNP demonstrate efficacy in preventing biofilm development, their capacity to eradicate established biofilms is limited, with only partial removal observed even at higher concentrations. Furthermore, exposure to sub-lethal AgNP doses can paradoxically stimulate biofilm formation, counteracting the intended effect [23, 24].

CAUTIs pose a significant challenge due to biofilm formation, which complicates treatment and contributes to increased antimicrobial resistance. Consequently, previous studies have explored coating catheter fragments with AgNP on both the external and internal surfaces to prevent biofilm development [6, 7, 25]. While AgNP exhibit promising antimicrobial properties [26], high concentrations can exhibit toxicity to human cells [27]. Therefore, coating urinary catheters with high AgNP concentrations may not be a viable solution due to potential cytotoxic effects. To address these concerns, we developed a methodology for internal catheter coating, limiting AgNP contact to the urine and potential pathogens, thus minimizing exposure to the user [6, 7].

Coating methodologies employing PDA have demonstrated their ability to immobilize silver on urinary catheters [6, 7, 28]. Our results confirm the effectiveness of the coating methodology used, as evidenced by the presence of silver on the coated catheters. PDA exhibits self-polymerization at alkaline pH, forming macromolecular networks that facilitate AgNP adhesion [6]. This property enables the immobilization of AgNP on various medical devices, including the urinary catheters used in this study.

The *in vitro* bladder model assays demonstrated that the coated catheter effectively prevented biofilm formation and *E. coli* cell release with a low initial inoculum (1.5×10^6 CFU). However, with a higher inoculum (1.5×10^8 CFU), biofilm formation was observed even on the coated catheter. These results suggest that, while promising, the AgNP coating may have limitations, particularly in cases of high bacterial loads.

For *K. pneumoniae*, the coated catheter reduced the number of biofilm-forming cells at both concentrations tested. This demonstrates the coating's effectiveness in mitigating biofilm formation [28].

Previous studies employing fouling assays to evaluate biofilm reduction have demonstrated that AgNP-coated urinary catheter fragments can reduce biofilm formation and prevent *P. mirabilis* fouling [6, 7]. However, these studies presented preliminary findings and did not utilize the *in vitro* bladder model. Our results, using this model, do not align with

these prior observations, as we found no significant difference between the coated catheter and the control for *P. mirabilis*.

Our initial hypothesis was that the AgNP-coated catheter would effectively inhibit *P. mirabilis* biofilm formation and encrustation. However, *in vitro* bladder model assays demonstrated no significant difference between the coated catheter and the control. These results suggest that *P. mirabilis* catheter-associated infection may be more complex and multifactorial than previously understood, warranting further investigation into the underlying mechanisms.

The results obtained from the *in vitro* bladder model assays suggest that biofilm production on the catheter is influenced by both bacterial cell density and urease production. This was observed for *K. pneumoniae* and *P. mirabilis*, where biofilm formation occurred on both pristine and coated catheters. The urease activity of *P. mirabilis* elevates urine pH, leading to the formation of apatite and struvite crystals. These crystals may provide a protective effect, hindering the microorganism's contact with, and thus the efficacy of, silver nanoparticles.

Prior studies have explored strategies to prevent uropathogen biofilm formation on urinary catheters. For example, Rani *et al.* (2016) and Burns *et al.* (2021) investigated treating artificial urine with compounds to inhibit adhesion, colonization, and biofilm formation on these devices [29, 30]. Such *in vitro* approaches have yielded promising results for combating catheter-related infections. However, *in vivo* application in patients may be more complex due to factors such as individual immunological responses, catheter indwelling time, replacement frequency, and patient-specific susceptibility. Therefore, future studies employing *in vivo* models, including assessments of prolonged AgNP toxicity and potential release within the organism, are crucial for clinical translation.

Conclusion

This study demonstrated the potent bactericidal activity of AgNP against the tested bacterial strains. Furthermore, while this antimicrobial agent exhibited significant antibiofilm activity *in vitro*, its efficacy against mature biofilms was limited.

Importantly, the AgNP-coated urinary catheter proved remarkably effective in preventing *E. coli* biofilm formation, a common etiological agent of urinary tract infections. The presence of AgNP in the catheter coating significantly inhibited *E. coli* adhesion and proliferation, thereby reducing the risk of catheter-associated infections. For *K. pneumoniae*,

the coated catheter reduced biofilm formation at both tested concentrations. However, the coating's effectiveness was dependent on both bacterial inoculum density and bacterial species, suggesting that the level of protection may vary depending on the bacterial load and species present. Conversely, the coated catheter did not demonstrate comparable efficacy against *P. mirabilis*. This lack of activity against *P. mirabilis* does not preclude its effectiveness against other uropathogens.

Future research should investigate modifications to the coating design, internal coating methods, and nanoparticle composition, as well as optimization of application parameters, to broaden the coating's spectrum of activity and enhance protection against a wider range of uropathogens.

References


1. Venkataraman R, Yadav U (2023) Catheter-associated urinary tract infection: an overview. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 34:5–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2022-0152>.
2. Werneburg GT (2022) Catheter-Associated Urinary Tract Infections: Current Challenges and Future Prospects. *Research and Reports in Urology* 14:109–133. <https://doi.org/10.2147/RRU.S273663>
3. Yao Q, Wu C, Yu X, *et al* (2022) Current material engineering strategies to prevent catheter encrustation in urinary tracts. *Materials Today Bio* 16:100413. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100413>.
4. Zhou J, Sun D, Wei W (2023) Necessity to Pay Attention to the Effects of Low Fluoride on Human Health: an Overview of Skeletal and Non-skeletal Damages in Epidemiologic Investigations and Laboratory Studies. *Biol Trace Elem Res* 201:1627–1638. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03302-7>.
5. Chadha J, Thakur N, Chhibber S, Harjai K (2024) A comprehensive status update on modification of foley catheter to combat catheter-associated urinary tract infections and microbial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* 50:168–195. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2023.2167593>.
6. Wang R, Neoh KG, Kang E, *et al* (2015) Antifouling coating with controllable and sustained silver release for long-term inhibition of infection and encrustation in urinary catheters. *J Biomed Mater Res* 103:519–528. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33230>.
7. Saikawa GIA, Guidone GHM, Noriler SA, *et al* (2024) Green-Synthesized Silver Nanoparticles in the Prevention of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Infection and Incrustation of Urinary Catheters BioAgNP Against *P. mirabilis* Infection. *Curr Microbiol* 81:100. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03616-w>.
8. Singh I, Dhawan G, Gupta S, Kumar P (2021) Recent Advances in a Polydopamine-Mediated Antimicrobial Adhesion System. *Front Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607099>.
9. Kwiecinska-Piróg J, Bogiel T, Skowron K, *et al* (2014) *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Braz J Microbiol* 45:1423–1431. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400037>.
10. Stickler DJ, Morris NS, Winters C (1999) [35] Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 494–501.
11. Imani Rad H, Peeri H, Amani M, *et al* (2019) Allicin prevents the formation of *Proteus*-induced urinary crystals and the blockage of catheter in a bladder model in vitro. *Microbial Pathogenesis* 132:293–301. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.016>.
12. Nzakizwanayo J, Pelling H, Milo S, Jones BV (2019) An In Vitro Bladder Model for Studying Catheter-Associated Urinary Tract Infection and Associated Analysis of Biofilms. In: Pearson MM (ed)

Proteus mirabilis: Methods and Protocols. Springer, New York, NY, pp 139–158.

13. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V (2016) Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol* 7: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>.
14. Le Ouay B, Stellacci F (2015) Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 10:339–354. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>.
15. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 4:3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>.
16. Loo YY, Rukayadi Y, Nor-Khaizura M-A-R, *et al* (2018) In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. *Front Microbiol* 9:1555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01555>.
17. Scandorieiro S, de Camargo LC, Lancheros CAC, *et al* (2016) Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Front Microbiol* 7: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>.
18. Wypij M, Jędrzejewski T, Trzcińska-Wencel J, *et al* (2021) Green Synthesized Silver Nanoparticles: Antibacterial and Anticancer Activities, Biocompatibility, and Analyses of Surface-Attached Proteins. *Front Microbiol* 12:632505. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632505>.
19. Krce L, Šprung M, Maravić A, *et al* (2020) Bacteria Exposed to Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Water: Modelling *E. coli* Growth and Inactivation. *Materials* 13:653. <https://doi.org/10.3390/ma13030653>.
20. Sondi I, Salopek-Sondi B (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275:177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
21. Haque MA, Imamura R, Brown GA, *et al* (2017) An experiment-based model quantifying antimicrobial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *RSC Adv* 7:56173–56182. <https://doi.org/10.1039/C7RA10495B>.
22. Mohamed DS, Abd El-Baky RM, Sandle T, *et al* (2020) Antimicrobial Activity of Silver-Treated Bacteria against other Multi-Drug Resistant Pathogens in Their Environment. *Antibiotics* 9:181. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040181>.
23. Elhariry H, Gado E, El-Deeb B, Altalhi A (2018) Antibiofilm potential of biogenic silver nanoparticles against *Kocuria rosea* And *Kocuria rhizophila*. *Microbiology* 87:9–20. <https://doi.org/10.1134/S0026261718010071>.
24. Yang Y, Alvarez PJJ (2015) Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environ Sci Technol Lett* 2:221–226. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.5b00159>.
25. Lethongkam S, Paosen S, Bilhman S, *et al* (2022) Eucalyptus-Mediated Synthesized Silver Nanoparticles-Coated Urinary Catheter Inhibits Microbial Migration and Biofilm Formation. *Nanomaterials* 12:4059. <https://doi.org/10.3390/nano12224059>.
26. Liao C, Li Y, Tjong SC (2019) Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *IJMS* 20:449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>.
27. Recordati C, De Maglie M, Bianchessi S, *et al* (2015) Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol* 13:12. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0124-x>.
28. Goda RM, El-Baz AM, Khalaf EM, *et al* (2022) Combating Bacterial Biofilm Formation in Urinary Catheter by Green Silver Nanoparticle. *Antibiotics* 11:495. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040495>.
29. Burns J, McCoy CP, Irwin NJ (2021) Synergistic activity of weak organic acids against uropathogens. *Journal of Hospital Infection* 111:78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.01.024>.
30. Rani SA, Celeri C, Najafi R, *et al* (2016) Irrigation with N,N-dichloro-2,2-dimethyltaurine (NVC-422) in a citrate buffer maintains urinary catheter patency in vitro and prevents encrustation by *Proteus mirabilis*. *Urolithiasis* 44:247–256. <https://doi.org/10.1007/s00240-015-0811-3>.

ANEXO A - Sanches et al., 2021.

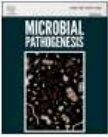
Microbial Pathogenesis 158 (2021) 105098



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Microbial Pathogenesis


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



***Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat**

Matheus Silva Sanches ^a, Caroline Rodrigues da Silva ^b, Luana Carvalho Silva ^a, Victor Hugo Montini ^a, Mario Gabriel Lopes Barboza ^a, Gustavo Henrique Migliorini Guidone ^a, Bruno Henrique Dias de Oliveira ^a, Erick Kenji Nishio ^c, Ligia Carla Faccin Galhardi ^d, Eliana Carolina Vespero ^e, Mara Corrêa Lelles Nogueira ^d, Sergio Paulo Dejato Rocha ^{a,*}

^a Laboratory of Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil
^b Microorganism Research Center, Department of Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases, Health Sciences Center, Medical School of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil
^c Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil
^d Virology Laboratory, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil
^e Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, University Hospital of Londrina, State University of Londrina, Paraná, Brazil




ARTICLE INFO

Keywords:
 Aggregative adhesion
 Biofilm
 Cytotoxicity
 Virulence genes
 Zoonotic risk


ABSTRACT

Proteus mirabilis is an opportunistic pathogen associated with a variety of infections in humans, especially those in the urinary tract. The isolation of this pathogen in foods of animal origin such as meat is poorly documented and should not be neglected, in view of the zoonotic risk that this can pose to human health. Thus, the objective of this study was to evaluate the prevalence, virulence profile, and similarity between *P. mirabilis* strains isolated from chicken, beef, and pork meat and those causing community-acquired urinary tract infections (UTI-CA), in order to better understand the role of this bacterium as a zoonotic pathogen. *P. mirabilis* was isolated from the

ANEXO B – Sanches et al., 2023.



antibiotics




Article

Prevalence of Antimicrobial Resistance and Clonal Relationship in ESBL/AmpC-Producing *Proteus mirabilis* Isolated from Meat Products and Community-Acquired Urinary Tract Infection (UTI-CA) in Southern Brazil

Matheus Silva Sanches ¹, Luana Carvalho Silva ¹, Caroline Rodrigues da Silva ², Victor Hugo Montini ¹, Bruno Henrique Dias de Oliveira ¹, Gustavo Henrique Migliorini Guidone ¹, Mara Corrêa Lelles Nogueira ², Maisa Fabiana Menck-Costa ³, Renata Katsuko Takayama Kobayashi ³, Eliana Carolina Vespero ⁴ and Sergio Paulo Dejato Rocha ^{1,*}


¹ Laboratory of Bacteriology, Center of Biological Sciences, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina P.O. Box 10.011, Brazil
² Microorganism Research Center, Health Sciences Center, Department of Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases, Medical School of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto P.O. Box 15.090, Brazil
³ Laboratory of Basic and Applied Bacteriology, Center of Biological Sciences, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina P.O. Box 10.011, Brazil
⁴ Department of Pathology, Health Sciences Center, Clinical and Toxicological Analysis, University Hospital of Londrina, State University of Londrina, Londrina P.O. Box 10.011, Brazil
* Correspondence: rochaspd@uel.br; Tel.: +55-43-3371-4494

Abstract: The present study aimed to evaluate the prevalence of antimicrobial resistance and clonal relationships in *Proteus mirabilis* isolated from chicken meat, beef, pork, and community-acquired urinary tract infections (UTI-CA). Chicken meat isolates showed the highest multidrug resistance (MDR), followed by those from pork and UTI-CA, whereas beef had relatively few MDR strains. All sources had strains that carried *bla*_{CTX-M-65}, whereas *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CMY-2} were only detected in chicken meat and UTI-CA isolates. This indicates that chicken meat should be considered an important risk factor for the spread of *P. mirabilis* carrying ESBL and AmpC. Furthermore, ESBL/AmpC

 **check for updates**


Citation: Sanches, M.S.; Silva, L.C.; Silva, C.R.d.; Montini, V.H.; Oliva, B.H.D.d.; Guidone, G.H.M.; Nogueira, M.C.L.; Menck-Costa, M.F.; Kobayashi, R.K.T.; Vespero, E.C.; et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Clonal Relationship in ESBL/AmpC-Producing *Proteus mirabilis* Isolated from Meat Products and Community-Acquired Urinary Tract Infection (UTI-CA) in Southern Brazil. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1234. [DOI: 10.3390/antib12121234](#)

ANEXO C – Santos *et al.*, 2023.


Journal of Water & Health 

© 2023 The Authors Journal of Water and Health Vol 21 No 10, 1550 doi: 10.2166/wh.2023.182

Water quality monitoring in southern Brazil and the assessment of risk factors related to contamination by coliforms and *Escherichia coli*

Nathalia Geovana Nascimento Santos^a, Luana Carvalho Silva^a, Gustavo Henrique Migliorini Guidone^a, Victor Hugo Montini^a, Bruno Henrique Dias Oliva^a, Arthur Bossi Nascimento^a, Diana Nara Ribeiro de Sousa^b, Emília Kiyomi Kuroda^c and Sergio Paulo Dejato Rocha ^{a,*}

^aLaboratory of Bacteriology, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil
^bDepartment of Chemistry, Center of Exact Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil
^cDepartment of Civil Construction, Center of Technology and Urbanization, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil
^{*}Corresponding author. E-mail: rochaspd@uel.br

 SPDR, 0000-0001-8510-536X

ABSTRACT

The potability of water, including underground sources, is constantly affected by human activities. To assess water quality and water security in rural and urban areas of southern Brazil, a quantitative, retrospective analysis of water samples collected monthly by the Brazilian health authorities (19,687 samples from 2013 to 2021) was performed. In rural areas, 5,979 water samples (77.54%) were found to be contaminated by coliform bacteria and 3,431 (44.50%) by *Escherichia coli*. In addition, 1,616 (20.95%) of the contaminated samples were significantly correlated with rainfall amount. In urban areas, 1,268 (10.95%) of the samples contained coliform bacteria and 293 (2.53%) of these samples contained *E. coli*, with the factor of rainfall associated with 1,081 samples (9.33%) with bacterial contamination. In terms of physicochemical parameters, turbidity exceeded the national standard (5 uT) in 448 (2.32%) samples and fluoride fell below the required level (0.8 mg/L) in 106 samples (0.54%). The presence of free residual chlorine (0.2–2.0 mg/L) was verified in 846 samples (14.38%) in rural areas and in 10,825 samples (56.13%) in urban areas. These results suggest a strong association between rainfall factors and physicochemical alterations, as well as the risk of greater microbial contamination of water for human consumption.

ANEXO D – Silva *et al.*, 2023.

International Microbiology (2024) 27:411–422
<https://doi.org/10.1007/s10123-023-00400-x>

RESEARCH 

Clonal relationship, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Morganella morganii* isolated from community-acquired infections and hospitalized patients: a neglected opportunistic pathogen

Luana Carvalho Silva¹ · Matheus Silva Sanches¹ · Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹ · Victor Hugo Montini¹ · Bruno Henrique Dias de Oliva¹ · Arthur Bossi do Nascimento¹ · Lígia Carla Faccin Galhardi² · Renata Katsuko Takayama Kobayashi³ · Eliana Carolina Vespero⁴ · Sergio Paulo Dejato Rocha¹

Received: 10 May 2023 / Revised: 6 July 2023 / Accepted: 10 July 2023 / Published online: 21 July 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

Abstract

Morganella morganii is a bacterium belonging to the normal intestinal microbiota and the environment; however, in immunocompromised individuals, this bacterium can become an opportunistic pathogen, causing a series of diseases, both in hospitals and in the community, being urinary tract infections more prevalent. Therefore, the objective of this study was to evaluate the prevalence, virulence profile, and resistance to antimicrobials and the clonal relationship of isolates of urinary tract infections (UTI) caused by *M. morganii*, both in the hospital environment and in the community of the municipality of Londrina-PR, in southern Brazil, in order to better understand the mechanisms for the establishment of the disease caused by this bacterium. Our study showed that *M. morganii* presents a variety of virulence factors in the studied isolates. Hospital strains showed a higher prevalence for the virulence genes *zapA*, *iutA*, and *fimH*, while community strains showed a higher prevalence for the *ireA* and *iutA* genes. Hospital isolates showed greater resistance compared to community isolates, as well as a higher prevalence of multidrug-resistant (MDR) and extended-spectrum beta lactamase (ESBL)-producing isolates.

ANEXO E – Guidone et al., 2023.

ACCESS MICROBIOLOGY
an open research platform

RESEARCH ARTICLE
Guidone et al., *Access Microbiology* 2023;5:000652.v4
DOI 10.1099/acmi.0.000652.v4

MICROBIOLOGY SOCIETY
OPEN DATA OPEN ACCESS

Epidemiology and characterization of *Providencia stuartii* isolated from hospitalized patients in southern Brazil: a possible emerging pathogen

Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹, Jennifer Germiniani Cardozo², Luana Carvalho Silva¹, Matheus Silva Sanches¹, Ligia Carla Faccin Galhardi³, Renata Katsuko Takayama Kobayashi², Eliana Carolina Vespero⁴ and Sergio Paulo Dejato Rocha^{1,*}

Abstract


This study aimed to characterize the virulence factors and antimicrobial resistance of *Providencia stuartii*, an opportunistic pathogen that causes human infections. We examined 45 isolates of *P. stuartii* both genotypically and phenotypically by studying their adherence to HeLa cells, biofilm formation, cytotoxicity and antimicrobial resistance, and analysed their genomes for putative virulence and resistance genes. This study found that most isolates possessed multiple virulence genes, including *fimA*, *mrkA*, *fptA*, *iutA*, *ireA* and *hlyA*, and were cytotoxic to Vero cells. All the isolates were resistant to amoxicillin plus clavulanic acid, levofloxacin and sulfamethoxazole plus trimethoprim, and most were resistant to ceftriaxone and cefepime. All isolates harboured extended-spectrum beta-lactamase coding genes such as *bla*_{CTX-M-2} and 23/45(51.11%) of them also harboured *bla*_{CTX-M-9}. The gene KPC-2 (carbapenemase) was detected in 8/45(17.77%) isolates. This study also found clonality among the isolates, indicating the possible spread of the pathogen among patients at the hospital. These results have significant clinical and epidemiological implications and emphasize the importance of a continued understanding of the virulence and antimicrobial resistance of this pathogen for the prevention and treatment of future infections.

ANEXO F – Saikawa et al., 2024.

Current Microbiology (2024) 81:100
<https://doi.org/10.1007/s00284-024-03616-w>

Check for updates

Green-Synthesized Silver Nanoparticles in the Prevention of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Infection and Incrustation of Urinary Catheters BioAgNPs Against *P. mirabilis* Infection

Gustavo Issamu Asai Saikawa¹ · Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹ · Sandriele Aparecida Noriler² · Guilherme Fonseca Reis² · Admilton Gonçalves de Oliveira^{2,3} · Gerson Nakazato⁴ · Sergio Paulo Dejato Rocha¹ 

Received: 31 January 2023 / Accepted: 10 January 2024 / Published online: 19 February 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

This study aimed to assess the activity of AgNPs biosynthesized by *Fusarium oxysporum* (bio-AgNPs) against multidrug-resistant uropathogenic *Proteus mirabilis*, and to assess the antibacterial activity of catheters coated with bio-AgNPs. Broth microdilution and time-kill kinetics assays were used to determine the antibacterial activity of bio-AgNPs. Catheters were coated with two (2C) and three (3C) bio-AgNPs layers using polydopamine as crosslinker. Catheters were challenged with urine inoculated with *P. mirabilis* to assess the anti-incrustation activity. MIC was found to be 62.5 µmol l⁻¹, causing total loss of viability after 4 h and bio-AgNPs inhibited biofilm formation by 76.4%. Catheters 2C and 3C avoided incrustation for 13 and 20 days, respectively, and reduced biofilm formation by more than 98%, while the pristine catheter was encrusted on the first day. These results provide evidence for the use of bio-AgNPs as a potential alternative to combat of multidrug-resistant *P. mirabilis* infections.

ANEXO G – Oliva *et al.*, 2024.


Brazilian Journal of Microbiology (2024) 55:4157–4166
<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01508-6>

SBM SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VETERINARY AND ANIMAL PRODUCTION - RESEARCH PAPER

Check for updates

Genomic insights into a *Proteus mirabilis* strain inducing avian cellulitis

Bruno Henrique Dias de Oliva¹ · Arthur Bossi do Nascimento¹ · João Paulo de Oliveira² · Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹ · Beatriz Leric Schoeps¹ · Luana Carvalho Silva¹ · Mario Gabriel Lopes Barbosa¹ · Victor Hugo Montini¹ · Admilton Gonçalves de Oliveira Junior² · Sérgio Paulo Dejato Rocha¹ 

Received: 16 May 2024 / Accepted: 28 August 2024 / Published online: 5 September 2024
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2024

Abstract
Proteus mirabilis, a microorganism distributed in soil, water, and animals, is clinically known for causing urinary tract infections in humans. However, recent studies have linked it to skin infections in broiler chickens, termed avian cellulitis, which poses a threat to animal welfare. While Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is the primary cause of avian cellulitis, few cases of *P. mirabilis* involvement are reported, raising questions about the factors facilitating such occurrences. This study employed a pan-genomic approach to investigate whether unique genes exist in *P. mirabilis* strains causing avian cellulitis. The genome of LBUEL-A33, a *P. mirabilis* strain known to cause this infection, was assembled, and compared with other *P. mirabilis* strains isolated from poultry and other sources. Additionally, *in silico* serogroup analysis was conducted. Results revealed numerous genes unique to the LBUEL-A33 strain. No function in cellulitis was identified for these genes, and *in silico* investigation of the virulence potential of LBUEL-A33's exclusive proteins proved inconclusive. These findings support that multiple factors are necessary for *P. mirabilis* to cause avian cellulitis. Furthermore, this species likely employs its own unique arsenal of virulence factors, as many identified mechanisms are analogous to those of *E. coli*. While antigenic gene clusters responsible for serogroups were identified, no clear trend was

ANEXO H - Almeida *et al.*, 2024.









Brazilian Journal of Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s42770-024-01568-8>

SBM SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

MEDICINE AND PUBLIC HEALTH - RESEARCH PAPER

Check for updates

Impact of COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* in a Brazilian hospital

Luana Karolyne Salomão de Almeida¹  · Luana Carvalho Silva¹  · Gustavo Henrique Migliorini Guidone¹  · Bruno Henrique Dias de Oliva¹  · Arthur Bossi do Nascimento¹  · Gabriela Faustino¹  · Julia da Silva Pimenta² · Eliana Carolina Vespero²  · Sergio Paulo Dejato Rocha¹ 

Received: 29 April 2024 / Accepted: 7 November 2024
 © The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2024

Abstract
 This study analyzes the resistance and virulence profiles of *Proteus mirabilis* isolates obtained from patients admitted to the University Hospital of Londrina, Paraná, between 2019 and 2022. We evaluated the antimicrobial resistance phenotypes, genes associated with resistance, biofilm formation through a phenotypic assay, and the presence of specific virulence genes. When comparing the “pre-pandemic” (2019) and “pandemic” (2020–2022) periods, we observed an increase in resistance rates to all tested antimicrobials. Multidrug-resistant (MDR) pathogens producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) phenotypes were isolated in both periods, but their occurrence was significantly higher during the pandemic. We also observed an increase in the frequency of nearly all studied resistance genes. The virulence profiles remained largely unchanged. Analysis of patients' clinical and demographic data revealed that those hospitalized during the pandemic were older, required longer hospital stays, and had a higher usage of invasive devices. These findings suggest that the recent COVID-19 pandemic has impacted the antimicrobial resistance of *P. mirabilis*, a bacterium of significant clinical interest associated with urinary tract infections (UTIs) and healthcare-associated infections (HAIs).

ANEXO I – Rocha et al., 2024a.

CAPÍTULO 7

OS GÊNEROS *PROTEUS*, *MORGANELLA* E *PROVIDENCIA*: IMPORTÂNCIA E IMPLICAÇÕES DAS INFECÇÕES BACTERIANAS EM HUMANOS E ANIMAIS

DATA DE SUBMISSÃO: 08/06/2024

Data de aceitação: 01/07/2024

Sergio Paulo Dejato Rocha
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0000-0001-8510-536X>

Beatriz Leric Schoeps
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0009-0009-3923-8036>

Bruno Henrique Dias de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0000-0001-5324-4621>

Luana Carvalho Silva
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0000-0001-7313-0840>

Arthur Bossi do Nascimento
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0009-0003-6205-0943>

Gustavo Henrique Miglitorini Guidone
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
<https://orcid.org/0000-0002-6045-5387>

Luana Karolyne Salomão de Almeida
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR

RESUMO: Os gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* são compostos por bacilos Gram-negativos com flagelos peritricios, frequentemente agrupados na tribo *Proteae*. Embora muitas espécies dessa tribo sejam comensais, várias têm relevância clínica tanto na medicina humana quanto veterinária. O gênero *Proteus* é o mais estudado, especialmente devido à sua associação predominante com infecções do trato urinário (ITU) em humanos, notadamente as espécies *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. penneri*. *Providencia* e *Morganella* também são agentes causadores dessas infecções. No entanto, várias espécies têm papel pouco explorado ou desconhecido como patógenos, dado que novas espécies têm sido descobertas recentemente. A partir desse contexto, esta

ANEXO J – Rocha et al., 2024b.

CAPÍTULO 10

QUALIDADE DA ÁGUA: UM ENFOQUE NA AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA PARA A SAÚDE PÚBLICA

Data de submissão: 05/06/2024

Data de aceitação: 01/08/2024

Sergio Paulo Dejato Rocha
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
ORCID: 0000-0001-8510-536X

Arthur Bossi do Nascimento
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
ORCID: 0009-0003-6205-0943

Gustavo Henrique Miglitorini Guidone
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
ORCID: 0000-0002-6045-5387

Bruno Henrique Dias de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
ORCID: 0000-0001-5324-4621

Luana Carvalho Silva
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR
ORCID: 0000-0001-7313-0840

RESUMO: A água é um recurso vital para a vida na Terra, desempenhando um papel essencial em diversos aspectos, desde a manutenção da saúde humana até o suporte aos ecossistemas. Sua importância é inquestionável, pois é necessária para a sobrevivência de todas as formas de vida conhecidas. A qualidade da água pode ser afetada por fatores físico-químicos, (como temperatura, pH, turbidez, cloro e fluoretos), e microbiológicos (como presença de coliformes e *Escherichia coli*). No entanto, a qualidade microbiológica da água é de particular preocupação, pois a presença de microrganismos patogênicos pode representar uma ameaça significativa à saúde pública. A análise microbiológica da água é uma ferramenta fundamental para avaliar a qualidade microbiológica e garantir que a água seja segura para consumo. Existem métodos tradicionais e