



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Maria Luiza Francisconi Lubanco Thomé

**Obtenção, Purificação, Caracterização e Atividade
Antibiofilme de Vesículas de Membrana Externa de *Burkholderia
thailandensis***

Londrina

2025

MARIA LUIZA FRANCISCONI LUBANCO THOMÉ

**Obtenção, Purificação, Caracterização e Atividade
Antibiofilme de Vesículas de Membrana Externa de *Burkholderia
thailandensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi

Londrina
2025

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

- T465 Thomé, Maria Luiza Francisconi Lubanco .
Obtenção, Purificação, Caracterização e Atividade Antibiofilme de Vesículas de Membrana Externa de *Burkholderia thailandensis* / Maria Luiza Francisconi Lubanco Thomé. - Londrina, 2025.
95 f. : il.
- Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2025.
Inclui bibliografia.
1. Ultracentrifugação - Tese. 2. Método de Obtenção - Tese. 3. *Escherichia coli* Enterogregativa - Tese. 4. Compostos antibacterianos. - Tese. I. Katsuko Takayama Kobayashi, Renata . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

MARIA LUIZA FRANCISCONI LUBANCO THOMÉ

Obtenção, Purificação, Caracterização e Atividade Antibiofilme de Vesículas de Membrana Externa de *Burkholderia thailandensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Paula Signolfi Cyoia
Universidade Anhanguera Unopar Pitágoras de Londrina

Londrina, 20 de fevereiro de 2025

DEDICATÓRIA

Com todo o meu coração, dedico este trabalho à
minha família, amigos e profissionais que, de
alguma forma, participaram dessa trajetória e me
inspiraram a ser resiliente.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, amigos e colegas de trabalho, deixo registrada minha profunda admiração. Cada um de vocês contribui para quem eu sou e é com o apoio de todos que encontro forças para lutar pelos meus sonhos.

Dedico este trabalho e todas as minhas conquistas aos meus pais Luiz Antonio Lubanco Thomé e Marcia Francisconi, meus irmãos João Antonio Francisconi Lubanco Thomé e Marcelo Francisconi Lubanco Thomé, à minha cunhada Deborah Proença Francisconi Lubanco Thomé, e à minha amada avó Maria Augusta Francisconi. Agradeço por lutarem minhas batalhas, celebrarem minhas vitórias e, acima de tudo, por serem o meu porto seguro. Vocês são a base e a força que me sustentam.

“O que importa é o sangue da família.”

Luiz Antonio Lubanco Thomé

Aproveito também para homenagear meu falecido avô, Romeu Claro Francisconi, um homem que me ensinou sobre o amor, bondade e como uma mulher deve ser incentivada a lutar por sua independência. Obrigada, vô, por apoiar meus sonhos. Serei para sempre a “piquitita do vovô”.

Agradeço ao meu companheiro, Leonardo Henrique de Souza, por ser meu maior incentivador. Seu amor e suporte me fazem sentir que sou capaz de enfrentar o que for preciso. Sem você, a vida não seria tão bela e eu não seria capaz de enxergar o melhor que há nas pessoas e nas situações pelas quais passamos. Você me ensina todos os dias. Deixo meus agradecimentos também à sua família que, carinhosamente, considero como minha.

Deixo meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, professora doutora Renata Katsuko Takayama Kobayashi, cuja admiração ultrapassa o campo profissional e adentra o pessoal. Se hoje permaneço na vida acadêmica, devo isso a ela, que por seu exemplo, me fez enxergar a beleza e a paixão que existem nos olhos de um pesquisador brasileiro.

Agradeço também a todos os integrantes do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL (NIP 3), especialmente ao professor doutor Gerson Nakazato, o qual não poupou esforços para apoiar o meu trabalho e minha trajetória

na pesquisa, e à Natália Yukari Kashiwaqui, Mirian Sumini, Yasmin Vitorino, Bruna Marcela Bergamasco e Mariana Mello que, além de me auxiliarem em tantos trabalhos, tornaram o meu mestrado uma experiência única e especial.

Deixo também meus agradecimentos às parcerias formadas com o Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP), a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), o Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), o Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal da UEL e o Laboratório Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/CMI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Agradeço aos membros que compõem a banca da minha qualificação e defesa, a Universidade Estadual de Londrina por ser minha segunda casa nos últimos seis anos e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro que me permitiu ofertar completa dedicação ao meu mestrado.

Meu agradecimento também se estende a todos os meus amigos que estiveram comigo durante essa trajetória. Tenho a sorte de carregar comigo amizades muito preciosas, que se fazem presentes em todas as estações. Como é bom ter com quem dividir os sorrisos e as lágrimas. Serei eternamente grata a cada um de vocês.

“Em todo o tempo ama o amigo; e na angústia nasce o irmão.”

Provérbios 17:17

Por fim e de maneira mais significativa, agradeço a Deus por me sustentar até aqui. Toda honra e glória sejam dadas a Jesus, pois sem Seu amor, eu nada seria. Em todos os momentos, nas lutas, nas conquistas e nas derrotas, Ele sempre esteve ao meu lado. É tudo sobre Ele!

“Nós amamos porque ele nos amou primeiro.”

1 João 4:19

Epígrafe

*“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

THOMÉ, Maria Luiza Francisconi Lubanco; KOBAYASHI, Renata Katsuko Takayama. **OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Burkholderia thailandensis***. 2025. 95p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina/Paraná, 2025.

RESUMO

As cepas de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) são patógenos que causam inflamação intestinal, resultando em diarreia aguda e persistente, especialmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos. Essas infecções contribuem para cerca de 500.000 mortes anuais por diarreia em crianças menores de cinco anos. A resistência bacteriana aos antimicrobianos, especialmente devido à formação de biofilmes, reduz a eficácia dos antimicrobianos e prejudica a resposta imunológica, dificultando o tratamento. Biofilmes aumentam a resistência aos antimicrobianos em até 1000 vezes e estão envolvidos em cerca de 80% das infecções bacterianas. Este estudo avaliou a ação antibiofilme de vesículas de membrana externa (OMVs) isoladas de *Burkholderia thailandensis*, observando inibição de 95,86% e 94,83% na formação de biofilme e destruição de 88,55% e 62,52% de biofilme pré-formado de EAEC 042 com OMVs obtidas por ultracentrifugação (OMVs-UC) e OMVs obtidas pelo uso do kit de isolamento de exossomos (OMVs-Kit), respectivamente. Além disso, o uso de OMVs apresentou baixo efeito citotóxico contra células VERO CCL-81. Além disso, comparamos os padrões, a composição geral e a concentração de vesículas obtidas por dois métodos de obtenção: ultracentrifugação e uso de kit de isolamento de exossomos. Os resultados indicaram que o uso do kit apresenta vantagens em termo de simplicidade, além de recuperar quantidades e padrões de vesículas muito semelhantes àqueles obtidos pela técnica tradicional de ultracentrifugação e apresentar ação contra biofilme de EAEC.

Palavras-chave: Ultracentrifugação. Método de Obtenção. *Escherichia coli* Enteroagregativa. Compostos antibacterianos.

THOMÉ, Maria Luiza Francisconi Lubanco; KOBAYASHI, Renata Katsuko Takayama. **ISOLATION, PURIFICATION, CHARACTERIZATION, AND ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF OUTER MEMBRANE VESICLES FROM *Burkholderia thailandensis*.** 2025. 95p. Dissertation (Master's in Microbiology). State University of Londrina, Londrina/Paraná, 2025.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains are pathogens that cause intestinal inflammation, resulting in acute and persistent diarrhea, especially in children and immunocompromised individuals. These infections contribute to approximately 500,000 annual deaths from diarrhea in children under five years old. Bacterial resistance to antimicrobials, particularly due to biofilm formation, reduces the effectiveness of antimicrobials and impairs the immune response, complicating treatment. Biofilms increase antimicrobial resistance by up to 1000 times and are involved in about 80% of bacterial infections. This study evaluated the antibiofilm activity of outer membrane vesicles (OMVs) isolated from *Burkholderia thailandensis*, showing 95,86% and 94,83% inhibition of biofilm formation and 88,55% and 62,52% destruction of pre-formed EAEC 042 biofilm with OMVs obtained by ultracentrifugation (OMVs-UC) and OMVs obtained by using the exosome isolation kit (OMVs-Kit), respectively. Furthermore, the use of OMVs showed low cytotoxic effects against VERO CCL-81 cells. Additionally, we compared the patterns, overall composition, and vesicle concentration obtained by two isolation methods: ultracentrifugation and the use of the exosome isolation kit. The results indicated that using the kit has advantages in terms of simplicity, as well as recovering quantities and vesicle patterns very similar to those obtained by the traditional ultracentrifugation technique, while also showing activity against EAEC biofilm.

Keywords: Ultracentrifugation. Isolation Method. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Antibacterial Compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de dispersão de células de biofilme bacteriano.....	7
Figura 2. Mecanismos de tolerância antimicrobiana em biofilmes bacterianos.....	9
Figura 3. Crio-Microscopia dos tipos de vesículas nas cepas WT e Δ tolA.....	11
Figura 4. Biogênese da produção de OMVs.....	12
Figura 5. Fluxo de trabalho de obtenção e purificação de OMVs.....	13
Figura 6. Microscopia de <i>Burkholderia thailandensis</i>	16
Figura 7. Comparação entre OMVs-UC e OMVs-Kit visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	26
Figura 8. Diâmetro e topologia de OMVs-Kit por micrografia de MEV.....	27
Figura 9. Comparação da recuperação de células HeLa por meio do kit de isolamento de exossomos e por ultracentrifugação.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de OMVs obtidas por ambos os métodos, utilizadas no ensaio CIM.....	22
Tabela 2. Análises do diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície de OMVs.....	25
Tabela 3. Redução da concentração bacteriana de células planctônicas após o tratamento com as maiores concentrações de OMVs, determinado pela contagem de colônias a partir do método de diluição seriada das maiores concentrações de OMVs utilizadas no CIM.....	31
Tabela 4. Macromoléculas de OMVs-UC identificadas por valores de deslocamento do Raman no laser de 532 nm por espectroscopia de micro-Raman.....	75
Tabela 5. Macromoléculas de OMVs-UC identificadas por valores de deslocamento do Raman no laser de 785 nm por espectroscopia de micro-Raman.....	75
Tabela 6. Grupos funcionais de compostos orgânicos de OMVs-UC identificados pelos valores de absorção por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	76
Tabela 7. Grupos funcionais de compostos orgânicos de OMVs-Kit identificados pelos valores de absorção por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	77
Tabela 8. Resumo dos resultados de caracterização, atividade antibacteriana, atividade antibiofilme e ensaio de citotoxicidade.....	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico de OMVs-UC e OMVs-Kit avaliada por espalhamento de luz dinâmico.....25

Gráfico 2. Concentração e distribuição geral dos tamanhos de OMVs pela análise de rastreamento de nanopartículas de OMVs-UC e OMVs-Kit.....28

Gráfico 3. Espectros correspondentes às macromoléculas identificadas por espectroscopia micro-Raman de OMVs-UC em 532 nm e 785 nm, observadas pela interação entre o deslocamento Raman do eixo x e intensidade Raman do eixo y...29

Gráfico 4. Espectros correspondentes aos grupos funcionais identificados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de OMVs-UC e OMVs-Kit, observados pela interação entre números de ondas do eixo x e intensidade do sinal do eixo y.....30

Gráfico 5. Inibição da formação de biofilme de *Escherichia coli* por OMVs-UC e OMVs-Kit.....32

Gráfico 6. Destruição de biofilme pré-formado por *Escherichia coli* por OMVs-UC e OMVs-Kit.....33

Gráfico 7. Ensaio de citotoxicidade utilizando células VERO CCL-81 tratadas com OMVs-UC e OMVs-Kit.....34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Infecções Bacterianas e Resistência à Antibioticoterapia.....	1
1.2	Impactos de Infecções Bacterianas na Saúde Pública e Economia	2
1.3	Sistemas de Administração de Medicamentos.....	2
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	<i>Escherichia coli</i>	3
2.2	Biofilmes Bacterianos.....	5
2.3	Vesículas de Membrana Externa.....	10
2.4	<i>Burkholderia thailandensis</i>	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	Objetivo Geral.....	16
3.2	Objetivos Específicos.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Amostras Bacterianas.....	17
4.2	Obtenção e Purificação de OMVs.....	17
4.2.1	Obtenção e Purificação de OMVs por Ultracentrifugação.....	17
4.2.2	Obtenção e Purificação de OMVs por Kit de Isolamento de Exossomos.....	18
4.3	Caracterização Física, Química e Biológica de OMVs.....	19
4.3.1	Diâmetro Médio e Carga de Superfície.....	19
4.3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	19
4.3.3	Análise de Rastreamento de Nanopartículas.....	20
4.3.4	Espectroscopia Micro-Raman.....	20
4.3.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	21
4.4	Avaliação da Atividade Antibacteriana de OMVs.....	21
4.4.1	Ensaio de Suscetibilidade Bacteriana.....	21
4.4.2	Concentração Inibitória Mínima.....	21
4.4.3	Concentração Bactericida Mínima.....	22
4.5	Atividade Antibiofilme Contra <i>Escherichia coli</i> Utilizando MTT.....	22

4.6.	Ensaio de Citotoxicidade.....	24
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Obtenção, Purificação e Caracterização de OMVs.....	24
5.1.1	Diâmetro Médio e Carga de Superfície.....	24
5.1.2	Diâmetro e Morfologia das OMVs por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	25
5.1.2.1	OMVs-UC.....	25
5.1.2.2	OMVs-Kit.....	25
5.1.3	Diâmetro e Topologia das OMVs por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
5.1.4	Análise de Rastreamento de Nanopartículas.....	27
5.1.4.1	OMVs-UC.....	27
5.1.4.2	OMVs-Kit.....	27
5.1.5	Espectroscopia Micro-Raman.....	28
5.1.5.1	OMVs-UC.....	28
5.1.5.2	OMVs-Kit.....	28
5.1.6	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	29
5.1.6.1	OMVs-UC.....	29
5.1.6.2	OMVs-Kit.....	29
5.2	Avaliação da Atividade Antibacteriana de OMVs.....	30
5.3	Avaliação da Atividade Antibiofilme de OMVs por MTT.....	31
5.3.1	Inibição da Formação de Biofilme de <i>Escherichia coli</i>	31
5.3.1.1	OMVs-UC.....	31
5.3.1.2	OMVs-Kit.....	31
5.3.2	Destruição de Biofilme Pré-Formado de <i>Escherichia coli</i>	32
5.3.2.1	OMVs-UC.....	32
5.3.2.2	OMVs-Kit.....	32
5.4	Ensaio de Citotoxicidade.....	33
5.4.1	OMVs-UC.....	33
5.4.2	OMVs-Kit.....	33
6	DISCUSSÃO.....	34

7	CONCLUSÃO.....	46
8	REFERÊNCIAS.....	47
9	ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Bacterianas e Resistência à Antibioticoterapia

Embora as bactérias sejam pequenos organismos classificados na microescala e com um pequeno genoma, elas são uma forma de vida complexa, com potencial ameaça a saúde pública (Van Oosten *et al.*, 2015). Diante disso, inúmeros estudos são desenvolvidos com o intuito de aumentar o conhecimento acerca das habilidades bacterianas nos processos de adesão, invasão e sobrevivência nos mais diversos nichos, assim como na propagação da virulência bacteriana (Liu *et al.*, 2022).

Os antibacterianos apresentam ação em culturas bacterianas devido aos seus principais mecanismos de ação, como interferência na síntese da parede celular, inibição da síntese proteica, interferência na síntese de DNA, inibição de vias metabólicas e danos estruturais na membrana bacteriana (Etebu; Ariekpar, 2016; Xiong *et al.*, 2014).

Segundo dados fornecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que, até 2050, cerca de 10 milhões de mortes anuais serão atribuídas a infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos (De Kraker; Stewardson; Harbarth, 2016). Nos Estados Unidos, aproximadamente 35.000 óbitos ocorrem anualmente devido à dificuldade no tratamento de infecções bacterianas resistentes (CDC, 2019; O'Neill, 2016). Em países de baixa e média renda, a resistência bacteriana tem se intensificado, uma vez que a escassez de recursos e a limitação no acesso a diagnósticos e tratamentos adequados agravam a situação, especialmente em sistemas de saúde precários (Abbas, 2024; Majigo *et al.*, 2024). A alta incidência de *Escherichia coli* multirresistente, identificada em hospitais do mundo todo e já isoladas em ambientes comunitários de países em desenvolvimento, tem gerado preocupações globais, reforçando a urgência de ações para conter a disseminação de cepas resistentes dessa bactéria, particularmente no que diz respeito à sua resistência a antibióticos (Nji *et al.*, 2021).

Em países de alta renda, observa-se a implementação de políticas rigorosas para a prescrição de antimicrobianos, com o objetivo de mitigar a resistência bacteriana (Sanchez, 2016). Devido à sua importância, *E. coli* foi incluída na lista de patógenos críticos prioritários da OMS, o que tem incentivado pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos (Shrivastava; Shrivastava; Ramasamy, 2018). A exposição recorrente aos antimicrobianos promove a seleção natural de *E. coli* comensais resistentes, as quais sobrevivem a ambientes, mesmo que na

presença de compostos com atividade antibacteriana (Allocati *et al.*, 2013). Além disso, *E. coli* desempenha um papel central na transmissão de resistência bacteriana, facilitando a troca de plasmídeos e outros mecanismos de transferência horizontal de genes (Amikanra; Ako-Nai; Ogunniyi, 1996; Blake *et al.*, 2003; Lambrecht *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Massot *et al.*, 2016; Mcinnes *et al.*, 2020; Salyers; Gupta; Wang, 2004).

1.2 Impactos de Infecções Bacterianas na Saúde Pública e Economia

A estimativa dos custos associados ao tratamento de infecções bacterianas resistentes aos antimicrobianos no sistema de saúde é desafiadora, exigindo um conjunto de dados relacionados à microbiologia, dados clínicos, informações demográficas e de custo. Desse modo, para uma avaliação mais precisa, são necessários grandes bancos de informações a respeito dos inúmeros impactos das infecções bacterianas (Nelson *et al.*, 2021).

Segundo estimativa de O'Neill (2016), até 2050, a ameaça de bactérias multirresistentes será potencializada, sugerindo que o número de óbitos por ano por infecções bacterianas atingirá a marca de 10 milhões. Como alternativa de controle de infecções por microrganismos multirresistentes, foram implementadas medidas legislativas com o objetivo de limitar e, quando possível, proibir o uso de antimicrobianos, seja na forma de aditivos alimentares para animais de produção ou através de sua ação original no tratamento de infecções (Dorofte, 2022). Além disso, o incentivo à pesquisa é crucial para combater a resistência bacteriana, promovendo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e o uso de novos tratamentos (Ruvalcaba-Gómez *et al.*, 2022).

1.3 Sistemas de Administração de Medicamentos

Embora os antimicrobianos tenham sido essenciais e a única fonte de tratamento contra doenças infecciosas por anos, bloqueando processos celulares essenciais para a proliferação de microrganismos (Etebu; Arikekpar, 2016; Xiong *et al.*, 2014), atualmente, têm-se buscado desenvolver e compreender sistemas avançados de administração de medicamentos, os quais são capazes de oferecer uma liberação controlada dos fármacos aos locais-alvo, mantendo uma concentração adequada para o tratamento terapêutico e minimizando os efeitos colaterais (Ferreira

et al., 2015; Forier *et al.*, 2014; Joshi; Gunawan; Mann, 2021).

Os veículos utilizados para a administração de medicamentos podem apresentar diversas constituições, dentre elas, a presença predominante de lipídios, como observado em lipossomos, micelas e nanopartículas lipídicas sólidas, os quais possuem boa versatilidade e biocompatibilidade (Dos Santos Ramos *et al.*, 2018; Forier *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020a). Devido à constituição lipídica, esses veículos são capazes de encapsular medicamentos hidrofílicos, além de serem aptos a se fundir à membrana bacteriana e liberar sua carga interna no meio intracelular (Forier *et al.*, 2014; Rukavina; Vanic, 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram-negativa reconhecida por compor a microbiota humana. No entanto, algumas cepas dessa bactéria apresentam padrões de virulência que as configuram como microrganismos patogênicos, causando a infecção em diversas partes do organismo humano, especialmente no trato intestinal (Ballén *et al.*, 2022). As cepas de *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) são patógenos com expressão de fatores de virulência complexos, que lhes conferem a capacidade de aderir ao epitélio intestinal, além de produzir toxinas e biofilmes. Essa interação resulta em respostas inflamatórias que comprometem a capacidade digestiva e absorptiva do intestino do hospedeiro. Quando persistente, a infecção causa o comprometimento da função intestinal, resultando em desnutrição, retardo do crescimento e danos cognitivos (Croxen *et al.*, 2013; Elias; Navarro-Garcia, 2016; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Opintan *et al.*, 2010; Steiner *et al.*, 1998).

Embora seja desafiador estimar a epidemiologia molecular da infecção por EAEC, grande parte das cepas realiza a colonização em mucosa intestinal por intermédio de fímbrias de adesão agregativa e adesinas não estruturais (Kwasi *et al.*, 2022; Shamir *et al.*, 2010), resultando na formação de biofilmes no hospedeiro (Estrada-Garcia; Navarro-Garcia, 2012; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014; Hicks; Candy; Phillips, 1996).

Dentre os sintomas que acometem pacientes infectados por EAEC, destaca-se a diarreia aguda e persistente em crianças ou indivíduos imunocomprometidos (Harrington; Dudley; Nataro, 2006). A diarreia, embora seja uma doença autolimitada, pode necessitar de tratamento com antimicrobianos (Shane *et al.*, 2017). A gravidade

da diarreia é notória principalmente em países em desenvolvimento, onde ela é reconhecida como uma das principais mortes entre crianças (Levine *et al.*, 2020). Estima-se que essa doença seja responsável por contribuir com quadros de desnutrição, deficiências no crescimento e desenvolvimento, resultando em aproximadamente 500.000 mortes anuais de crianças menores de cinco anos de idade (IHME, 2018; Mal-Ed *et al.*, 2017; Roche *et al.*, 2010).

A diarreia pode ser causada por uma variedade de patógenos, como rotavírus, astrovírus, norovírus, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Salmonella* e diversos subtipos de *E. coli* diarreiogênica (DEC), incluindo as EAEC (Kotloff *et al.*, 2013), como a cepa EAEC 042 (Bernabeu *et al.*, 2024), sendo o patótipo enteroagregativo associado à diarreia do viajante e infecções alimentares (Acosta *et al.*, 2016; Harrington; Dudley; Nataro, 2006; Scavia *et al.*, 2008).

A crescente resistência bacteriana é uma grande preocupação para a saúde pública (WHO *et al.*, 2014), como evidenciado na família Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, na qual são isoladas cepas resistentes aos agentes antimicrobianos mais utilizados na primeira linha de tratamento (Rahbar; Deldari; Hajia, 2007; Wellington *et al.*, 2013). No ano de 2011, um surto de infecção por *E. coli* enterohemorrágica acometeu a Alemanha, resultando em mais de 4.300 diagnósticos de diarreia, 900 internações e 50 mortes (Bielaszewska *et al.*, 2011).

Um estudo recente relatou que, entre os isolados de crianças com diarreia nos Emirados Árabes Unidos, a prevalência de ESBL foi observada em 11,3% dos casos de EAEC (Eltai *et al.*, 2020). Devido a elevada incidência de diarreia em países em desenvolvimento, somado ao uso frequente e indevido de antimicrobianos prescritos de maneira empírica para o tratamento de gastroenterite, é estimada uma potencialização do isolamento de bactérias multirresistentes (Nguyen *et al.*, 2005). Atualmente, observa-se um aumento de Enterobacteriaceae multirresistentes às cefalosporinas de terceira geração e à colistina, causando preocupação no tratamento de pacientes acometidos pela doença, visto que ambos são antimicrobianos de último recurso e a colistina é utilizada no tratamento de bactérias resistentes aos carbapenêmicos (Burow *et al.*, 2014; Cannatelli *et al.*, 2016; Hasman *et al.*, 2015; Poirel *et al.*, 2016).

2.2 Biofilmes Bacterianos

Como mencionado, as células de EAEC apresentam como característica marcante, a capacidade de se aderir de forma abundante às células epiteliais, formando uma estrutura agregativa organizada, comparável a “tijolos empilhados”, resultando em biofilmes volumosos (Huang *et al.*, 2004; Okeke; Nataro, 2001; Sheikh *et al.*, 2002). Assim, a patogênese das infecções por *E. coli* está intimamente ligada à formação de biofilmes, causando danos citotóxicos e inflamação da camada mucosa (Estrada-Garcia; Navarro-Garcia, 2012; Hebbelstrup Jensen *et al.*, 2014). Os biofilmes bacterianos de EAEC são comunidades complexas de bactérias que abrigam componentes essenciais para a colonização persistente e transmissão de diarreia em pacientes afetados (Bangar; Ballal, 2008; Hicks; Candy; Phillips, 1996; Pereira *et al.*, 2010).

Como definição, os biofilmes são comunidades de microrganismos, organizadas de modo tridimensional e envoltas por uma substância polimérica extracelular (EPS) sintetizada pelas células que os compõem, a qual é responsável pela adesão dos microrganismos às superfícies, sejam bióticas ou abióticas (Vert *et al.*, 2012). Eles possuem propriedades únicas que os distinguem de células planctônicas, como a proteção contra fatores externos danosos, dentre eles: alterações de pH e temperatura; radiação ultravioleta; escassez de água e nutrientes; oxidação e agentes antimicrobianos (Lerch *et al.*, 2017; Welin-Neilands; Svensater, 2007).

De acordo com dados fornecidos por Institutos Nacionais de Saúde, as infecções humanas são predominantemente causadas por microrganismos formadores de biofilmes, que podem ser encontrados em dispositivos médicos, tais como implantes, válvulas cardíacas artificiais, próteses ortopédicas, cateteres urinários e intravenosos, tubos endotraqueais, lentes de contato, entre outros, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Davies, 2003; Donlan; Costerton, 2002; Fernández-Barat; Torres, 2016; Fux *et al.*, 2003; Gbejuade; Lovering; Webb, 2015; Khatoon *et al.*, 2018; Lohse *et al.*, 2018; Veerachamy *et al.*, 2014). Essas comunidades microbianas estão associadas à maioria das infecções crônicas, como infecções do trato urinário (ITUs), fibrose cística, otite e sinusite, infecções crônicas de feridas e demais doenças acometidas por biofilmes (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999; Donlan; Consterton, 2002; Fernández-Barat; Torres, 2016; Fux *et al.*, 2003).

EAEC é amplamente reconhecida pela sua capacidade de formar biofilmes, processo que requer um desenvolvimento complexo, dividido em várias fases: fixação reversível e irreversível, maturação e dispersão. Na fase de fixação reversível, as células planctônicas de *E. coli* devem se mover até encontrar superfícies propícias para iniciar o processo de fixação. Para tanto, utilizam apêndices bacterianos conhecidos como flagelos, que facilitam o movimento das células, permitindo que elas se aproximem ou se afastem de superfícies por meio de movimentos rotatórios (Belas, 2014). Essa estrutura é crucial para a fixação das células bacterianas, pois seus movimentos no sentido horário e anti-horário permitem que as células superem forças repulsivas e se fixem à superfície para dar continuidade à formação do biofilme (Ballén *et al.*, 2022).

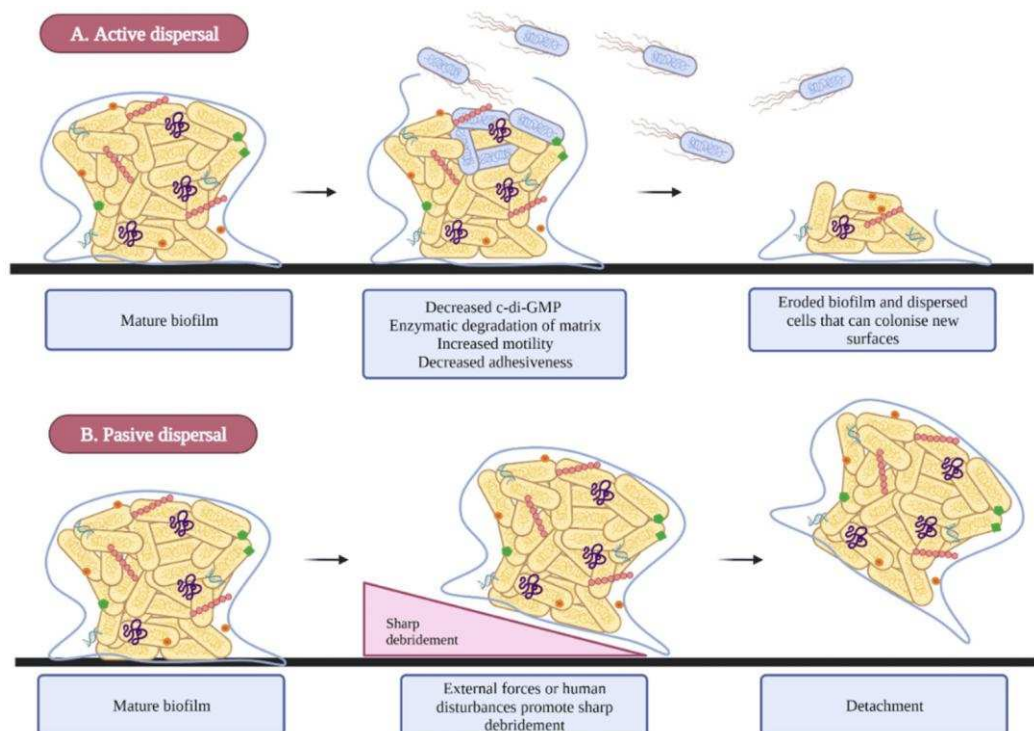
Essa fase recebe o nome de “fixação reversível”, devido à associação frágil da célula bacteriana, que pode ser rompida através das alterações nas condições ambientais, como mudanças de pH, mudanças de temperatura, alterações na disponibilidade de nutrientes e oxigênio, resultando em uma regulação negativa da quimiotaxia e assim, ocasionando a desafixação da célula bacteriana à superfície. Contudo, em situações de estresse, é comum evidenciar células planctônicas que transitam para a formação de biofilmes, evidenciado pela perda de flagelos e presença de fímbrias tipo 1 e pili conjugativo, iniciando a fase de fixação irreversível (Vidal *et al.*, 1998).

A transição de células planctônicas para células sésseis marca o início da fase de maturação do biofilme, caracterizada pela produção da matriz extracelular, pelo desenvolvimento das estruturas características e pela formação da arquitetura que constitui a comunidade bacteriana. Nesse estágio, a matriz torna-se essencial para fornecer estabilidade à estrutura tridimensional, além de permitir a comunicação intercelular e o transporte de nutrientes e resíduos dentro da comunidade. Além disso, seu papel na proteção contra efeitos adversos, como mencionados anteriormente, destaca-se como uma de suas funções cruciais (Beloin; Roux; Ghigo, 2008; Goller; Romeo, 2008; Rabin *et al.*, 2015; Schooling; Beveridge, 2006). A matriz do biofilme é predominantemente composta por água, embora tenha outros componentes, como exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. As ligações covalentes entre os polissacarídeos conferem maior estabilidade e favorecem a interação intercelular no biofilme (Flemming; Wingender, 2010).

Após a maturação, inicia-se a fase final do biofilme: a dispersão. Nessa etapa, as bactérias sésseis, que antes formavam o biofilme, começam a se desprender e se dispersar no ambiente, tornando-se aptas a colonizar novos habitats. Esse processo é desencadeado por condições ambientais, como alterações de pH, altas concentrações de produtos tóxicos, baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio, concomitantemente a outros fatores que resultem no estresse da comunidade bacteriana (Donlan, 2001; Goller; Romeo, 2008; Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Kostakioti; Hadjifrangiskou; Hultgren, 2013).

De modo geral, o desprendimento das células sésseis pode ocorrer por dois mecanismos, conforme ilustrado a seguir. Quando a dispersão ocorre de maneira ativa, ou seja, quando as bactérias escapam do biofilme e se dispersam por novos nichos, o mecanismo utilizado é a degradação enzimática (Rumbaugh; Sauer, 2020; Singh *et al.*, 2021). Já quando a dispersão ocorre por descolamento passivo, o mecanismo necessário são fatores externos à comunidade bacteriana, como perturbação humana que atue como gatilho para o desprendimento das células, forças de cisalhamento do fluido e abrasão (Rumbaugh; Sauer, 2020).

Figura 1. Processo de dispersão de células de biofilme bacteriano.



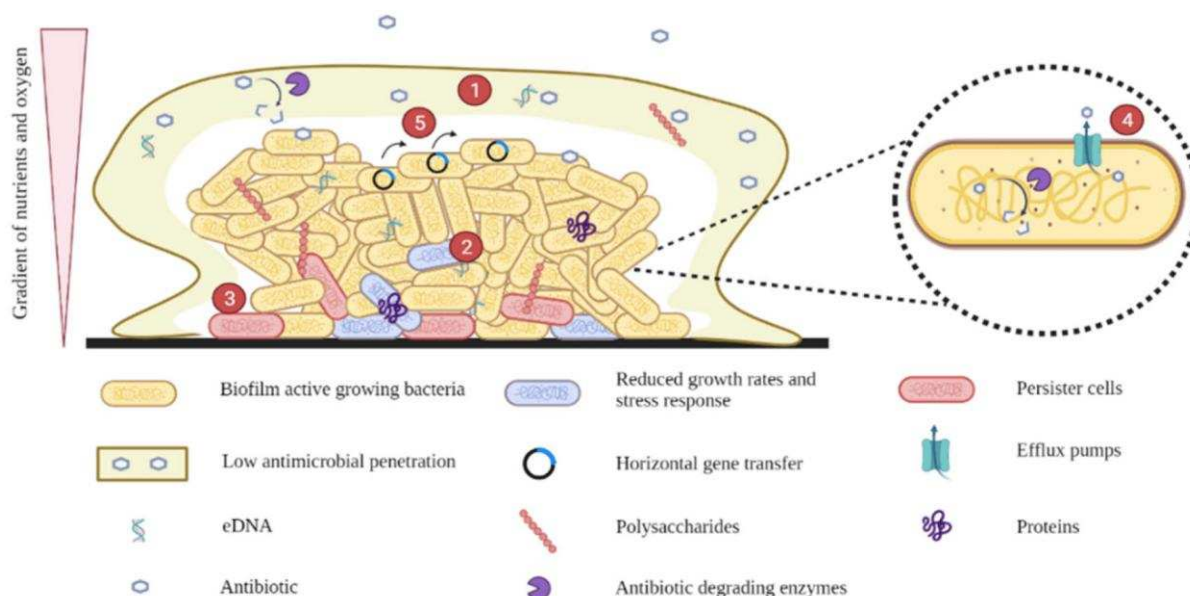
Processo de dispersão de células bacterianas. **A.** desprendimento ativo decorrente de enzimas. **B.** desprendimento passivo decorrente de fatores externos. Fonte: Ballén *et al.*, 2022

Os biofilmes bacterianos desempenham um papel crucial para o desenvolvimento e disseminação da resistência aos agentes antimicrobianos, visto que bactérias formadoras de biofilmes apresentam uma resistência de 100 a 1000 vezes maior à ação de antimicrobianos em comparação com células planctônicas (Hoiby *et al.*, 2010). Essa resistência por biofilmes pode dificultar o tratamento empírico da diarreia, em que os antimicrobianos mais comumente prescritos são ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina e quinolonas, devido ao baixo custo e alta disponibilidade (Kong; Hong; Li, 2015). No entanto, a literatura relata uma alta resistência bacteriana em células planctônicas de EAEC, além das dificuldades encontradas no tratamento de biofilmes bacterianos (Ali *et al.*, 2014; Aslani *et al.*, 2011; Okeke *et al.*, 2003; Raju; Ballal, 2009). Somado a isso, testes qualitativos e quantitativos utilizados para a determinação da suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos, não traduzem o real perfil de sensibilidade presente nas comunidades bacterianas de biofilmes (Hoiby *et al.*, 2010; Tagliabue *et al.*, 2010).

A formação do biofilme de *E. coli* resulta em uma significativa redução da eficácia de diversos antimicrobianos e da resposta do sistema imunológico, comprometendo o tratamento da comunidade bacteriana. Esse aumento na tolerância à antibioticoterapia é atribuído à barreira física imposta pelo biofilme, que restringe a penetração de agentes antimicrobianos nas células bacterianas. A defesa é mediada por componentes do biofilme, como polissacarídeos e DNA, que podem formar uma ligação com moléculas responsáveis por bloquear a difusão de antimicrobianos, além de limitar a resposta imune do hospedeiro (Dincer; Uslu; Delik, 2020; Rabin *et al.*, 2015; Rather; Gupta; Mandal, 2021). Ademais, a matriz do biofilme contém uma variedade de enzimas, incluindo liases, transferases, hidrolases e enzimas redox, capazes de degradar antimicrobianos e contribuindo para a resistência a antibioticoterapia (Rather; Gupta; Mandal, 2021).

Outros fatores que contribuem para a resistência são as alterações nas taxas de crescimento bacteriano e redução das respostas ao estresse, além da presença de células persistentes e bombas de efluxo que eliminam o antimicrobiano para o meio extracelular. Dentro do biofilme, ocorre também a transferência horizontal de genes de resistência, o que facilita a disseminação de perfis de resistência (Ballén *et al.*, 2022). Assim, o retardo na penetração de antimicrobianos, associado à degradação dos mesmos quando capazes de atravessar o biofilme, gera um efeito sinérgico, potencializando a resistência da comunidade bacteriana ao tratamento (Lewis, 2001).

Figura 2. Mecanismos de tolerância antimicrobiana em biofilmes bacterianos.



Mecanismos de tolerância antimicrobiana em biofilmes. 1. Baixa penetração antimicrobiana. 2. Taxas de crescimento e respostas ao estresse reduzidas. 3. Células persistentes. 4. Bombas de efluxo. 5. Transferência horizontal de genes. Fonte: Ballén *et al.*, 2022

A organização espacial do biofilme de *E. coli* resulta em uma diferenciação das condições metabólicas entre as células localizadas nas camadas superficiais e profundas. As células nas camadas mais internas apresentam uma atividade metabólica reduzida, devido à menor disponibilidade de oxigênio e nutrientes, que são consumidos pelas células das camadas mais externas (Dincer; Uslu; Delik, 2020). Essa condição favorece a perda da eficácia dos antimicrobianos, pois suas ações são menos efetivas em células com baixa atividade metabólica, resultando em uma diminuição da ação antibacteriana sobre os biofilmes (Butt; Khan, 2015; Mah; O'Toole, 2001; Rabin *et al.*, 2015; Rather; Gupta; Mandal, 2021). Além disso, observa-se um aumento da diversidade fenotípica dentro do biofilme, devido às variações nas taxas de crescimento e aos diferentes perfis de expressão gênica, contribuindo para a resistência e adaptação da comunidade bacteriana (Rather; Gupta; Mandal, 2021).

Os tratamentos convencionais baseados em antimicrobianos com ação bactericida ou bacteriostática, frequentemente falham em combater as células de biofilmes, o que tem impulsionado a busca por terapias alternativas. As abordagens não convencionais visam novos alvos, como agentes anti-adesão, inibidores de quorum sensing (QS) e agentes de erradicação de biofilme, que têm mostrado eficácia na eliminação de células sésseis de biofilmes bacterianos, contribuindo para a

destruição da estrutura tridimensional do biofilme (Ballén *et al.*, 2022). Em resposta à crescente resistência aos antimicrobianos, a pesquisa tem se concentrado no desenvolvimento de novas moléculas com mecanismos de ação distintos, com o objetivo de superar as limitações do tratamento das células formadoras de biofilmes (Ballén *et al.*, 2022).

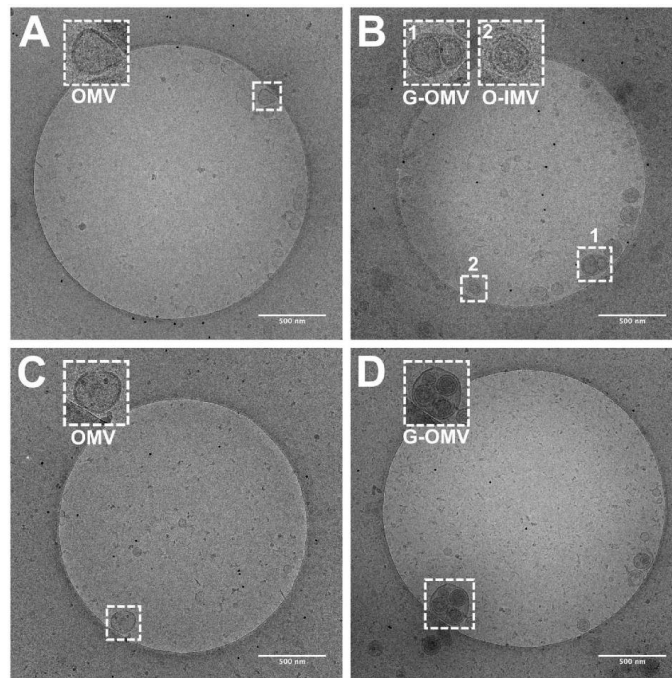
Nesse contexto, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com diferentes propriedades e mecanismos de ação, surge como uma possível solução para o problema atual da resistência bacteriana (Ballén *et al.*, 2022). Contudo, devido ao alto custo necessário para o desenvolvimento de antimicrobianos sintéticos, a busca por abordagens antibacterianas alternativas tem ganhado destaque nos últimos anos, especialmente aquelas baseadas em sistemas de administração de antimicrobianos (Birk; Boisen; Nielsen; 2021; Li *et al.*, 2020; Ndayishimiye *et al.*, 2020).

Dentre as novas abordagens terapêuticas, destacam-se os nanomateriais como transportadores de antimicrobianos, devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis (Chen; Cheng, 2020; Lei *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2018; Markwalter *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021), melhorando a sensibilidade aos antimicrobianos pela melhor absorção e aumentando a eficácia da antibioticoterapia (Le *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2021; Thorn *et al.*, 2020).

2.3 Vesículas de Membrana Externa

As Vesículas de Membrana Externa (Outer Membrane Vesicle - OMVs) são nanoestruturas não replicativas, com uma bicamada lipídica, originadas a partir do brotamento da membrana externa (ME) de bactérias Gram-negativas (Castillo-Romero; Santacruz; González-Valdez, 2023; Schwechheimer; Kuehn, 2015), com diâmetro variando de 20 a 450 nm (Wang *et al.*, 2021). Essas vesículas foram inicialmente relatadas na década de 1960, com o desenvolvimento do microscópio eletrônico (De, 1959), onde foi possível descrevê-las como um complexo antigênico de LPS (Lipopolissacarídeo) e lipoproteína, sendo consideradas um produto oriundo de um crescimento bacteriano desequilibrado (Knox; Vesik; Work, 1996). No entanto, atualmente, já são conhecidas suas diversas atividades bacterianas e como sua síntese é considerada um processo ativo (Huang *et al.*, 2022).

Figura 3. Crio-Microscopia dos tipos de vesículas nas cepas WT e $\Delta tolA$.

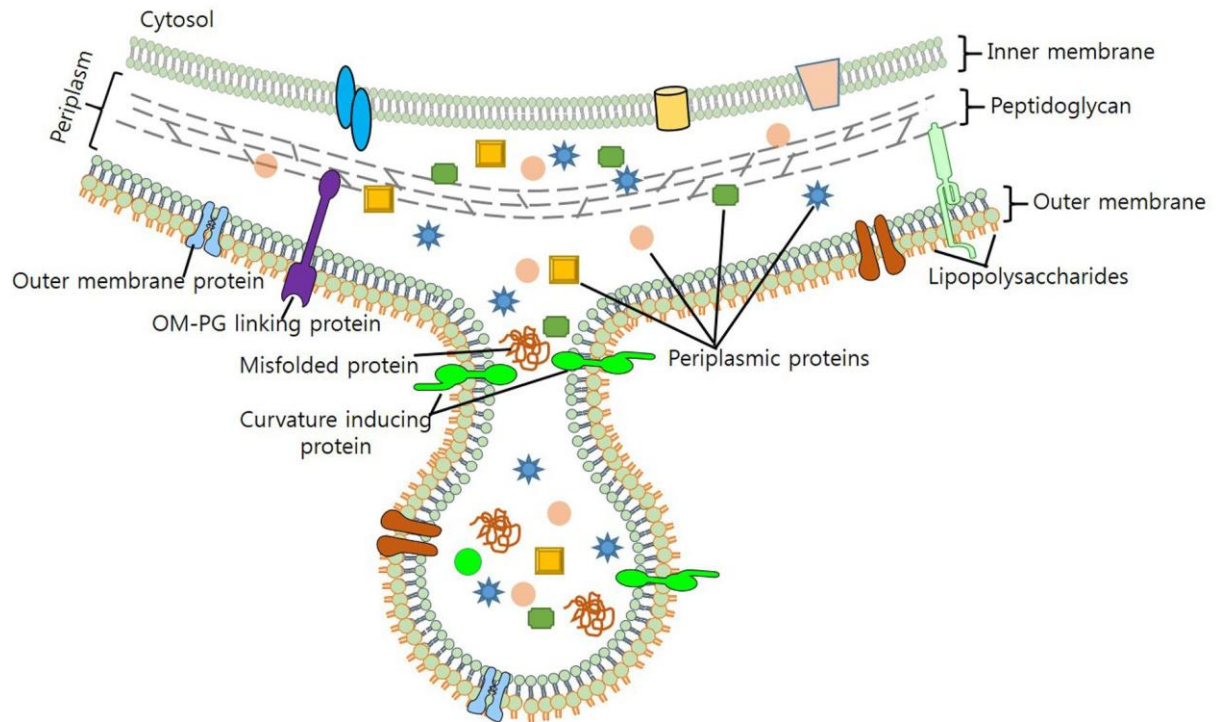


Imagens representativas de Crio-MET de OMVs de cepas selvagens de *E. coli* isoladas por ultracentrifugação (A), OMVs de cepas selvagens de *E. coli* isoladas por ultrafiltração (B), OMVs de cepa *E. coli* K-12 BW25113 e seu mutante de deleção do gene hipervesiculante $\Delta tolA$ (JW0729) isoladas por ultracentrifugação (C), OMVs de *E. coli* K-12 BW25113 e seu mutante de deleção do gene hipervesiculante $\Delta tolA$ (JW0729) isoladas por ultrafiltração (D). Fonte: Reimer *et al.*, 2021.

Através do processo de brotamento da ME, ocorre a formação de OMVs, as quais possuem diversas moléculas biológicas da ME e da região periplasmática, dentre elas, proteínas, ácidos nucleicos e fatores de virulência, os quais encontram-se localizados na bicamada lipídica ou em seu lúmen (Jan, 2017; Kulp; Kuehn, 2010). A origem desse processo ainda precisa ser elucidada. Contudo, várias hipóteses sugerem que o enriquecimento ou falta de proteína locais, permitem a curvatura da ME e o acúmulo de diferentes cargas (Avila-Calderón *et al.*, 2021; Bohuszewicz; Liu; Low, 2016; Ellis; Kuehn, 2010; Gui *et al.*, 2016; Kulp; Kuehn, 2010; Toyofuku; Nomura; Eberl, 2019), resultando na formação de OMVs.

Dentre os modelos propostos para a biogênese de OMVs, estão a perda da conectividade da ME com a camada de peptidoglicano, resultando no acúmulo de proteínas da ME no espaço periplasmático, como evidenciado pela menor concentração de proteínas na ME em bactérias produtoras de OMVs; aumento da pressão de turgor decorrente do acúmulo de proteínas periplasmáticas e partes do peptidoglicano fragmentadas; e por fim, a curvatura de ME a partir de mudanças conformacionais de fosfolipídios da ME (Çelik *et al.*, 2022).

Figura 4. Biogênese da produção de OMV.

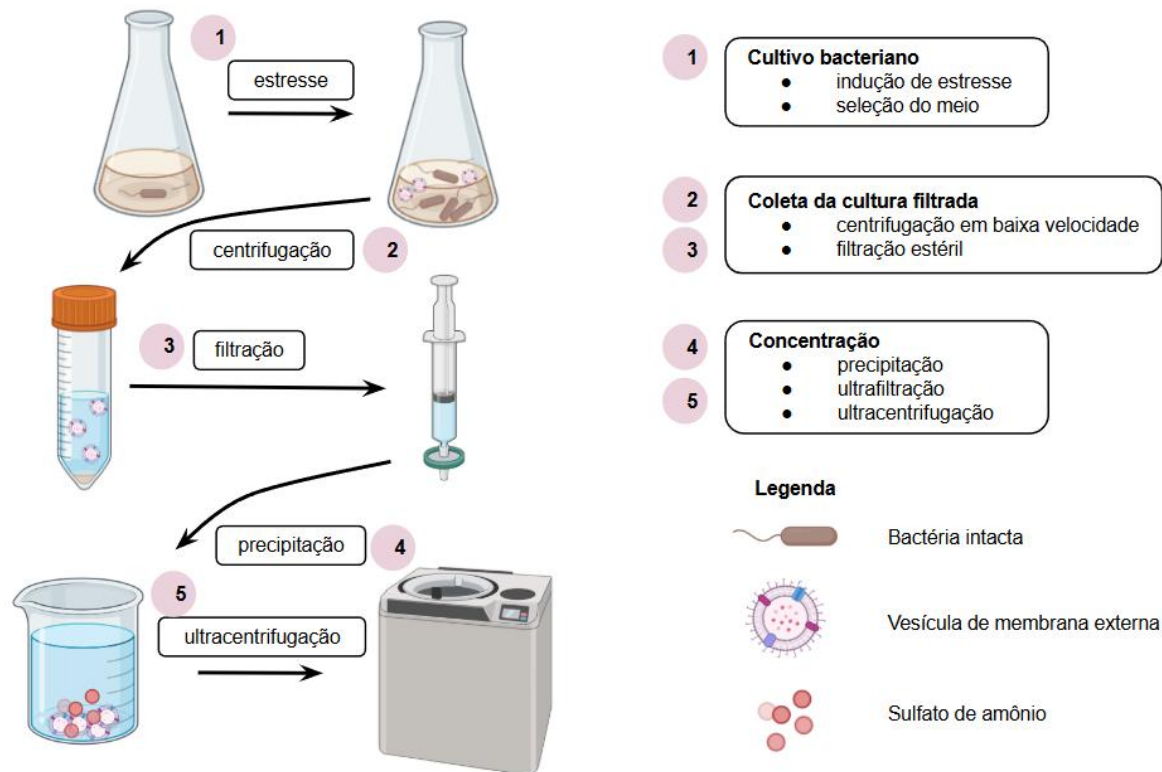


Biogênese de OMVs. Composição, seleção de carga e carregamento de OMVs. Fonte: Jan, 2017.

A biogênese das OMVs não é apenas influenciada pela biogênese endógena, mas também por vários fatores externos que podem regular sua síntese, resultando em variações na quantidade, tamanho e carga das vesículas (Duperthuy *et al.*, 2013). Entre esses fatores, destacam-se a exposição aos antimicrobianos, alteração de temperatura, exposição à radiação ultravioleta, maior disponibilidade de nutrientes (Aytar Çelik *et al.*, 2023; Orench-Rivera; Kuehn, 2016; Schwechheimer e Kuehn, 2015; Taheri *et al.*, 2019), genes e sinais exógenos (Bala *et al.*, 2015; Pasqua *et al.*, 2021).

Não há um método padrão estabelecido para a obtenção e purificação de OMVs. Contudo, os pesquisadores comumente adotam a combinação de diferentes métodos. O primeiro passo geralmente envolve processos de centrifugação e filtração da cultura bacteriana. Os passos subsequentes podem incluir ultracentrifugação (UC), precipitação, cromatografia de exclusão por tamanho e ultrafiltração (Aytar Çelik *et al.*, 2023).

Figura 5. Fluxo de trabalho de obtenção e purificação de OMVs.



Fluxo de trabalho de obtenção e purificação de OMVs com as etapas de cultivo em meio líquido, remoção de bactérias intactas e concentração da cultura filtrada. Fonte: adaptado de Klimentová e Stulík, 2015.

De modo sucinto, o processo de obtenção geralmente inicia-se pela remoção de bactérias íntegras pela centrifugação, seguido de uma filtração para a remoção de resíduos bacterianos. O sobrenadante filtrado tende a possuir uma baixa concentração de OMVs, necessitando de uma etapa de pré-concentração antes da UC (Klimentová; Stulík, 2015; Wu *et al.*, 2019). Dentre os possíveis métodos de precipitação, destaca-se o uso de sais, como o sulfato de amônio, responsável por contribuir para a extração eficiente de vesículas esféricas e uniformes (Grenier; Mayrand, 1987; López *et al.*, 2019). No processo de salting out, o sal quebra o equilíbrio das cargas de superfície de proteínas e de ligações de hidrogênio, resultando em sua insolubilidade (Klimentová; Stulík, 2015).

A ultracentrifugação é um método comumente utilizado, envolvendo diversas etapas para que se obtenha OMVs com maior pureza. Após a filtração do sobrenadante, inicia-se o processo de UC (Wu *et al.*, 2019). Contudo, embora seja um método eficaz, requer a padronização das diferentes forças e tempos de centrifugação (Torres Crigna *et al.*, 2021).

As OMVs apresentam uma gama de aplicações benéficas para as bactérias, como a participação na comunicação intercelular, auxílio na formação de biofilme e patogênese bacteriana (Toyofuku; Nomura; Eberl, 2019). Contudo, seu uso não é destinado apenas para a propagação da comunidade bacteriana, visto que seu potencial em aplicações antibacterianas é reconhecido, seja como uma agente ativo contra bactérias ou como um sistema de transporte de administração de medicamentos (Huang *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Schulz *et al.*, 2018). Estudos demonstram a aplicação de OMVs contra biofilmes bacterianos, como relatado no trabalho de Zhao e colaboradores (2022), onde OMVs isoladas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram ação antibiofilme, inibindo o crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*.

A primeira descrição de atividade antibacteriana de OMVs ocorreu em 1996, com o relato da atividade bactericida de OMVs produzidas por *P. aeruginosa*. As vesículas apresentavam em sua composição, autolisinas denominadas de hidrolases de peptidoglicano (Kadurugamuwa; Beveridge, 1996). Essas enzimas líticas são amplamente encontradas em bactérias, sendo essenciais para a reciclagem do peptidoglicano, divisão celular e transporte de proteínas (Bobrovskyy *et al.*, 2018). O peptidoglicano é essencial para a formação da parede celular, garantindo a sobrevivência bacteriana em ambientes de alta pressão osmótica intracelular. Quando hidrolases de peptidoglicano são secretadas para outras bactérias, a parede celular pode sofrer uma desintegração, resultando na lise osmótica das células competidoras (Huang *et al.*, 2022).

O conhecimento da especificidade das autolisinas presentes em OMVs são de grande importância, como relatado por Watt e Clarke (1997), que descobriram que OMVs produzidas por *P. aeruginosa* PA01, apresentavam β -glicosidase que agem especificamente na parede celular de *P. aeruginosa* e *E. coli*, mas sem implicar em danos em bactérias Gram-positivas (Watt; Clarke, 1997). Além disso, estudos indicam que as autolisinas de OMVs apresentam maior atividade em bactérias similares, com peptidoglicano mais parecido com as bactérias parentais (Li; Clarke; Beveridge, 1998). Complementando as investigações, há uma hipótese de que OMVs ativas gerem efeitos benéficos para as células parentais, enquanto resultam em danos para células distintas, contribuindo para a competitividade entre células bacterianas (Huang *et al.*, 2022).

A partir desses dados, o uso de OMVs como possível agente antimicrobiano passou a ser investigado. De acordo com o estudo de Evans e colaboradores (2012), OMVs de *Myxococcus xanthus*, uma bactéria ambiental localizada no solo, eram capazes de eliminar células de *E. coli*, devido às enzimas presentes em sua composição, como proteases, fosfatases e hidrolases, juntamente com metabólitos secundários (Evans *et al.*, 2012).

As OMVs mantêm uma semelhança com as células parentais, visto que são compostas pela mesma ME, facilitando sua fusão e integração de seus antígenos com a ME de células alvo (Kadurugamuwa; Beveridge, 1999). A partir de seus antígenos, foi criada a hipótese de transformação resistente-sensível, em que observa-se que os antígenos presentes em OMVs são capazes de configurar células bacterianas receptoras resistentes aos tratamentos antimicrobianos, em células sensíveis (Ofir; Sorek, 2017; Tzipilevich; Habusha; Ben-Yehuda, 2017).

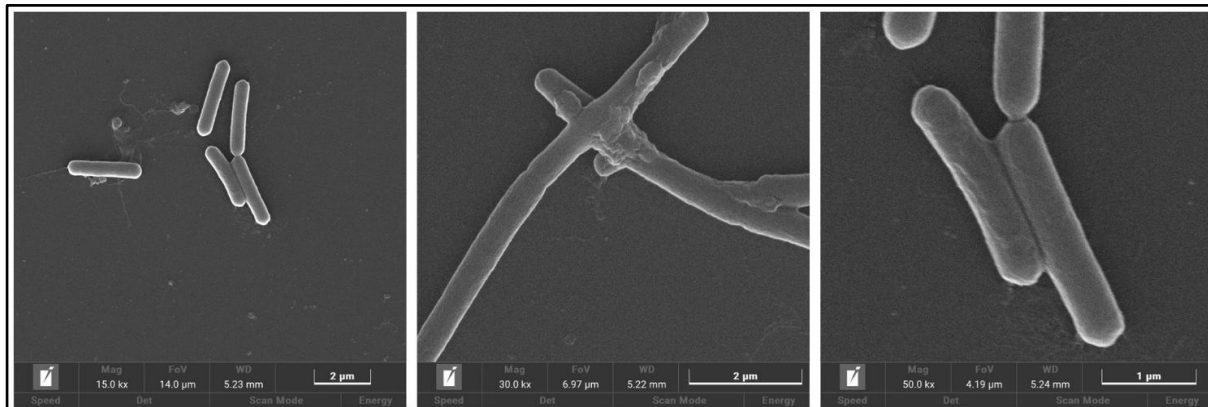
Recentemente, diversos trabalhos têm explorado avaliar o potencial antimicrobiano de OMVs, por intermédio de moléculas, surfactantes e enzimas bacterianas (Berleman *et al.*, 2014; Baker; Davitt; Morici, 2016; Li; Clarke; Beveridge, 1998; Kadurugamuwa; Beveridge, 1996; Macdonald; Beveridge, 2002; Vasilyeva *et al.*, 2008). Considerando o potencial antimicrobiano de OMVs e sua presença em biofilmes bacterianos, um estudo recente investigou a capacidade das vesículas em inibir a formação de biofilme e constatou que OMVs isoladas de *B. thailandensis* foram capazes de inibir o biofilme de *Streptococcus mutans* e culturas planctônicas após 24 horas de tratamento com 50 e 100 µg/mL, quando comparados com o controle, o qual apresentou a concentração de 10^7 UFC/mL de células viáveis (Wang *et al.*, 2021).

2.4 *Burkholderia thailandensis*

B. thailandensis é uma bactéria Gram-negativa oxidase positiva conhecida pela sua produção de OMVs. O gênero de *Burkholderia* compreende bactérias isoladas de ambientes abióticos, como água e solo, e bióticos, como animais e plantas. Por sua vez, *B. thailandensis* desenvolveu-se como uma bactéria saprófita de solo, sem apresentar hospedeiros mamíferos (Glass *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Tuanyok *et al.*, 2017). Devido a grande variedade de colonização, o perfil não patogênico da bactéria foi estimulado, tolerando o estresse e apresentando intensa comunicação intercelular (Horinouchi *et al.*, 2010). A cepa de *B. thailandensis* E264 é conhecida na

literatura por sua não patogenicidade em seres humanos e potencial produção de ramnolipídios (Held *et al.*, 2018; Lowe *et al.*, 2014).

Figura 6. Microscopia de *B. thailandensis*.



Microscopia Eletrônica de Varredura de *B. thailandensis* E264. Fonte: autoria própria.

Um estudo recente avaliou a ação antimicrobiana de OMVs de *B. thailandensis* E264 e constatou a potente atividade contra *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, *A. baumannii* multirresistente, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Wang *et al.*, 2020b). Wang e colaboradores (2020) demonstraram que a ação antimicrobiana das OMVs não era decorrente exclusivamente de hidrolases de peptidoglicano, mas também de compostos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, como 4-hidroxi-3-metil-quinolina (HMNQ) e ramnolipídios. Desse modo, uma nova fonte de agentes antimicrobianos tem sido estudada através dos compostos naturais de *Burkholderia spp.*, possibilitando o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes contra microrganismos multirresistentes (Wang *et al.*, 2020b).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar, purificar, caracterizar e avaliar a atividade de vesículas de membrana externa produzidas por *B. thailandensis* E264 contra o biofilme em formação e o biofilme pré-formado de *Escherichia coli* Enteroagregativa 042.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e purificar OMVs de *B. thailandensis* pelos métodos de ultracentrifugação e kit de isolamento de exossomos;

- Caracterizar OMVs de *B. thailandensis* quanto aos aspectos físicos, químicos e biológicos;
- Determinar a atividade antibacteriana das OMVs contra bactérias formadoras de biofilme;
- Avaliar a atividade de OMVs contra biofilme em formação e biofilme pré-formado de *E. coli* Enteroagregativa 042;
- Avaliar a citotoxicidade de OMVs de *B. thailandensis*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Bacterianas

Para a realização do estudo, foi utilizada a amostra de *B. thailandensis* E264, obtida da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) para a obtenção de OMVs. Para a avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme das OMVs, foi utilizada a cepa de *E. coli* Enteroagregativa 042 pertencente à coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia, pertencente ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

4.2 Obtenção e Purificação de OMVs

4.2.1 Obtenção e Purificação por Ultracentrifugação

Para o preparo das OMVs, a cepa de *B. thailandensis* E264 foi cultivada em caldo Lúria-Bertani (LB) até atingir a fase logarítmica tardia, com aproximadamente 18 horas de incubação. Após a incubação, o cultivo bacteriano foi centrifugado a 6.000 x g por 1 hora a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, as OMVs presentes no sobrenadante foram concentradas por precipitação, com a lenta adição de sulfato de amônio sólido, sob agitação suave e constante, atingindo a concentração de 1,5 M. A adição do sulfato de amônio causa o aumento da força iônica da solução, resultando na redução da solubilidade de OMVs, contribuindo para sua precipitação. Em seguida, o sobrenadante foi esterilizado em filtro com poros de 0,22 µm.

Após a adição do sulfato de amônio, as OMVs foram armazenadas a 4°C até o dia seguinte, para permitir uma melhor precipitação. No dia seguinte, a solução foi centrifugada a 11.000 x g por 45 minutos a 4°C. O pellet resultante da centrifugação, constituído pelas vesículas brutas, foi ressuspensionado em tampão Tris-HCl 30 mM em pH 8,0, suplementado com sacarose a 60%, em pH 8,0, com o intuito estabilizar as OMVs e protegê-las contra a baixa temperatura e danos mecânicos. As OMVs brutas

foram então submetidas a UC a 200.000 x g por 3 horas a 4°C para purificação. O pellet resultante da UC foi ressuspendido em 3 mL de tampão Tris-HCl 30 mM em pH 8,0 e armazenado a 4°C.

No dia seguinte, as OMVs foram submetidas a uma segunda UC a 200.000 x g por 19 horas a 4°C, com o objetivo de finalizar o processo de purificação e remover resíduos de sacarose e demais interferentes. O pellet formado, contendo as vesículas purificadas, foi ressuspendido em água ultrapura esterilizada. As OMVs recuperadas foram armazenadas à 4°C até o seu uso (protocolo adaptado de Wang *et al.*, 2020b).

4.2.2 Obtenção e Purificação por Kit de Isolamento de Exossomos

Para obtenção de OMVs utilizando o reagente do kit de isolamento de exossomos, foi utilizado o protocolo recomendado pelo fabricante. Para isso, a cepa de *B. thailandensis* E264 foi cultivada em caldo LB e incubada em estufa bacteriológica com agitação constante de 150 rotações por minuto (RPM) a 37°C até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, conforme avaliado pela densidade óptica da espectroscopia, no comprimento de onda de 600 nm.

Com o intuito de induzir o estresse físico e metabólico em *B. thailandensis* pela centrifugação e homogeneização de células, que pode resultar na agregação bacteriana e, conseqüentemente, estresse e aumento da produção de OMVs, a cultura bacteriana foi centrifugada a 960 x g por 5 minutos a 25°C para sedimentação das bactérias. O pellet foi ressuspendido em 10 mL de caldo LB e a suspensão obtida foi novamente centrifugada a 960 x g por 5 minutos a 25°C, com o *pellet* sendo cuidadosamente ressuspendido em 10 mL de caldo LB. O sobrenadante foi então centrifugado a 960 x g por 10 minutos a 25°C, e o *pellet* foi ressuspendido em 3 mL de caldo LB.

Após as centrifugações, o cultivo foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 2 horas para liberação das OMVs. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 2000 x g por 30 minutos a 25°C para sedimentação das bactérias, e o sobrenadante foi esterilizado utilizando um filtro de seringa com poros de 0,22 µm, descartando o pellet bacteriano.

Para a extração das vesículas, 375 µL do kit *Total Exosome Isolation* (Invitrogen™) foram adicionados ao sobrenadante filtrado, o qual facilita a recuperação e o isolamento dos exossomos. Após a homogeneização, a solução contendo OMVs com kit foi armazenada à 2°C durante a noite. Posteriormente, as

OMVs foram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 1 hora a 4°C para aumentar a concentração de vesículas. Os sobrenadantes dos microtubos foram cuidadosamente descartados, e o pellet vesicular foi ressuspensionado em 1 mL de Solução Salina Tampão Fosfato (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) esterilizado, pH 7,2. As OMVs obtidas foram armazenadas em 2°C até o seu uso.

4.3 Caracterização Física, Química e Biológica de OMVs

4.3.1 Diâmetro Médio e Carga de Superfície

O diâmetro médio das OMVs foi determinado por Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), pelo Litesizer 500, ANTON PAAR, no Laboratório Multiusuário do Campus Londrina (LabMult-LD) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Ballottin *et al.*, 2017).

A carga de superfície das OMVs foi medida pelo ZetaSizer Advance Lab (Blue Label) do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP).

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura

As características estruturais internas das OMVs foram observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o microscópio JEOL JEM 1400, no Laboratório Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/CMI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Além disso, a topologia foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando o microscópio TESCAN VEGA, Tescan, no Laboratório Multiusuário do Campus Londrina (LabMult-LD) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Para a realização da MET, 5 μL de OMVs isoladas pelos dois métodos mencionados foram adicionadas, separadamente, a uma grade de cobre revestida com carbono, coradas negativamente com acetato de uranila a 2%. Para a MEV, as amostras de OMVs foram fixadas utilizando uma solução fixadora contendo glutaraldeído a 2,5% e tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M. Em seguida, lamínulas esterilizadas foram preparadas com 30 μL de poli-L-lisina, as quais receberam 30 μL das amostras, juntamente com 30 μL da solução fixadora. Após a fixação das amostras, as lamínulas foram incubadas durante a noite em solução fixadora e,

posteriormente, receberam três lavagens com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, com pH de 7,2.

Após as lavagens, as amostras foram impregnadas com tetróxido de ósmio para a estabilização dos lipídios e incubadas a temperatura ambiente, por 1 hora, protegidas da luz. Em seguida, as amostras receberam novamente três banhos com tampão cacodilato de sódio e, posteriormente, iniciaram a série alcoólica, composta por sete lavagens consecutivas de álcool, iniciando na concentração de 50%, seguido das concentrações de 60%, 70%, 80%, 90% e, finalmente, dois banhos de álcool 100%. Após a última lavagem com álcool absoluto, a solução foi descartada e 2 mL de hexametildissilazano (HMDS) foram adicionados a cada lamínula, seguido de uma incubação de 2 horas à temperatura ambiente. O HMDS foi removido e as amostras foram destinadas à leitura em microscópio eletrônico de varredura.

4.3.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

A distribuição de tamanho e a concentração das OMVs foram registradas pela Análise de Rastreamento de Nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis* - NTA), realizada pelo NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra e um laser de 532 nm, do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP).

Para a realização da técnica, cerca de 1 mL de cada isolamento de OMVs foi injetado na câmara de amostra do NanoSight NS300, conforme recomendações do fabricante. O fluxo de nanovesículas foi medido conforme a incidência do laser sobre as partículas, causando o espalhamento de luz e resultando no cálculo do caminho percorrido por elas ao longo do tempo, determinando sua velocidade e movimento browniano e, conseqüentemente, seu diâmetro e concentração.

4.3.4 Espectroscopia Micro-Raman

A fim de analisar a composição química e as propriedades estruturais das OMVs, foi realizada a espectroscopia micro-Raman através de inVia™ confocal Raman microscope do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP).

As OMVs isoladas por ultracentrifugação (OMVs-UC) foram analisadas nos comprimentos de onda de 532 nm para análise de compostos orgânicos e 785 nm

para análise de compostos metálicos. Os resultados obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.

4.3.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Para determinar os grupos funcionais e as ligações químicas presentes nas moléculas que compõem as OMVs, foi realizada a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FT-IR) pelo Nicolet iS50 do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (GNano) da Universidade de São Paulo (USP). Uma alíquota de OMVs isoladas pelos métodos descritos anteriormente foi adicionada em uma lâmina de selênio. Após secar, as amostras foram submetidas ao laser de infravermelho e suas ligações químicas foram determinadas pela transmitância de cada onda relatada no gráfico.

4.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana de OMVs

4.4.1 Ensaio de Suscetibilidade Bacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana das OMVs de *B. thailandensis* em células planctônicas, foi realizada a semeadura por Drigalski das bactérias EAEC 042 em ágar LB. Em seguida, 10 µL da solução de OMVs foram adicionados em cada placa. De modo semelhante, 10 µL de PBS foram utilizados como controle negativo. As placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C e lidas no dia seguinte, com o intuito de verificar a possível formação de halos de inibição de crescimento bacteriano (protocolo adaptado de Wang *et al.*, 2021).

4.4.2 Concentração Inibitória Mínima

A fim de determinar os valores mínimos de concentração de OMVs capazes de inibir o crescimento bacteriano de células planctônicas, foi realizado o ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo ensaio de microdiluição em caldo. O ensaio foi realizado de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI (2021). Para isso, em uma placa de 96 poços, foi utilizado caldo Mueller-Hinton (MH) e testado as soluções de OMVs em diferentes concentrações contra o inóculo inicial de EAEC na concentração de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). As concentrações de OMVs obtidas por ambos os métodos encontram-se listadas na tabela 1. A microplaca foi incubada a 37°C por 24 horas e lida no dia seguinte.

Tabela 1. Concentrações de OMVs obtidas por ambos os métodos, utilizadas no ensaio CIM.

Concentração de OMVs-UC (partículas/mL)	Concentração de OMVs-Kit (partículas/mL)
$3,54 \times 10^8$	$1,23 \times 10^8$
$1,77 \times 10^8$	$6,15 \times 10^7$
$8,85 \times 10^7$	$3,07 \times 10^7$
$4,42 \times 10^7$	$1,53 \times 10^7$
$2,21 \times 10^7$	$7,68 \times 10^6$
$1,11 \times 10^7$	$3,84 \times 10^6$
$5,53 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$
$2,76 \times 10^6$	$9,61 \times 10^5$

4.4.3 Concentração Bactericida Mínima

A partir do teste de CIM, é realizado o teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM). Contudo, devido ao crescimento bacteriano em todas as concentrações de tratamento com OMVs, foi realizada a diluição seriada a partir dos poços com maiores concentrações de tratamento. A diluição seriada foi feita com a transferência de 100 µL do poço, para 900 µL de salina esterilizada. O processo se repetiu mais 7 vezes, atingindo o log de 10^8 . Todas as diluições foram cultivadas em triplicata em ágar MH. O mesmo foi feito para o controle positivo e de esterilidade. No dia seguinte, foi realizada a contagem de colônias, determinando a concentração de UFC/mL do tratamento.

4.5 Atividade Antibiofilme Contra *Escherichia coli* Utilizando MTT

Para a análise do efeito sobre o biofilme de EAEC 042, foi utilizado como controle positivo a cepa bacteriana sem tratamento. Como controle de esterilidade, foi utilizado Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 0,45% de glicose, sem adição de antimicrobiano ou de bactéria, e para os poços testes, foi utilizado o cultivo bacteriano associado ao tratamento com OMVs.

O teste de ação contra biofilme em formação e biofilme pré-formado foi realizado em microplacas de 96 poços. Para o biofilme em formação, foram

adicionados 180 μ L de meio DMEM suplementado com 0,45% de glicose com as mesmas concentrações utilizadas no CIM em cada fileira de tratamento, 180 μ L DMEM suplementado com glicose nos poços teste e 200 μ L nos poços de controle de esterilidade. Todos os poços, com exceção dos referentes ao controle de esterilidade, receberam 20 μ L de cultura bacteriana, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas e, no dia seguinte, o meio de cultura foi removido e foram realizadas três lavagens com PBS, a fim de remover qualquer resquício de DMEM e células planctônicas.

Em seguida, foram adicionados 100 μ L de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a 0,25 mg/mL, diluído em água destilada, em cada poço teste com bactéria tratada com vesícula, aos poços controle de crescimento bacteriano sem tratamento e aos poços controle de meio DMEM, sem a presença de bactéria e tratamento. A microplaca foi incubada por 2 horas à 37°C, protegida contra luz. Em seguida, o MTT em suspensão foi removido e 100 μ L da solução solubilizante de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço. A microplaca foi incubada sob agitação constante por 15 minutos. Após a incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (BioTek Synergy HT) a 570 nm (protocolo adaptado de Kashiwaqui *et al.*, 2023).

Para avaliar a atividade antibiofilme em biofilme pré-formado, foram adicionados 180 μ L de meio DMEM suplementado com glicose e 20 μ L de cultura bacteriana em cada poço teste, conforme especificações descritas para o biofilme em formação. A placa foi incubada em estufa bacteriológica por 24 horas à 37°C para a formação do biofilme. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e foram realizadas lavagens com PBS. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de tratamento com OMVs de *B. thailandensis* em cada poço teste, nas concentrações listadas no ensaio CIM.

A placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C, por 24 horas. Em seguida, o conteúdo dos poços da microplaca foi removido, os poços foram lavados e o biofilme foi revelado conforme citado anteriormente.

Para o cálculo, o biofilme do microrganismo teste foi considerado como 100% (sem inibição, ou seja, 0% de inibição). Os demais percentuais de biofilme foram calculados proporcionalmente a partir da leitura da densidade ótica (DO), descontando o valor do controle em branco, e o efeito inibitório foi determinado pela diferença observada.

4.6 Ensaio de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade das OMVs, uma suspensão de 100 µL de células VERO CCL-81 (células epiteliais derivadas do tecido renal de macaco verde africano adulto) na concentração de 2×10^5 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal), foi adicionada em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, as foram incubadas por 24 h a 37°C sob tensão de CO₂ (5%). Após o período de incubação, o meio de cultura foi substituído por OMVs diluídas em meio DMEM, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios antibiofilme, conforme o método de obtenção. O sistema foi incubado, como feito anteriormente, por mais 24 horas, e então lido em espectrofotômetro a 570 nm, conforme metodologia adaptada de Mosmann (1983) descrita por Dutta e colaboradores (2020).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. A concentração das OMVs, necessária para inibir a atividade metabólica de 50 e 100% das células, corresponde à concentração citotóxica de 50 e 100% (CC₅₀/24 horas – CC₁₀₀/24 horas). O valor CC₁₀₀ foi utilizado para calcular o índice de seletividade (IS) aplicando a seguinte equação:

$$IS = CC_{100}/CIM_{100},$$

em que CC₁₀₀ equivale a concentração citotóxica e CIM₁₀₀ à concentração inibitória mínima.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção, Purificação e Caracterização de OMVs

5.1.1 Diâmetro Médio e Carga de Superfície

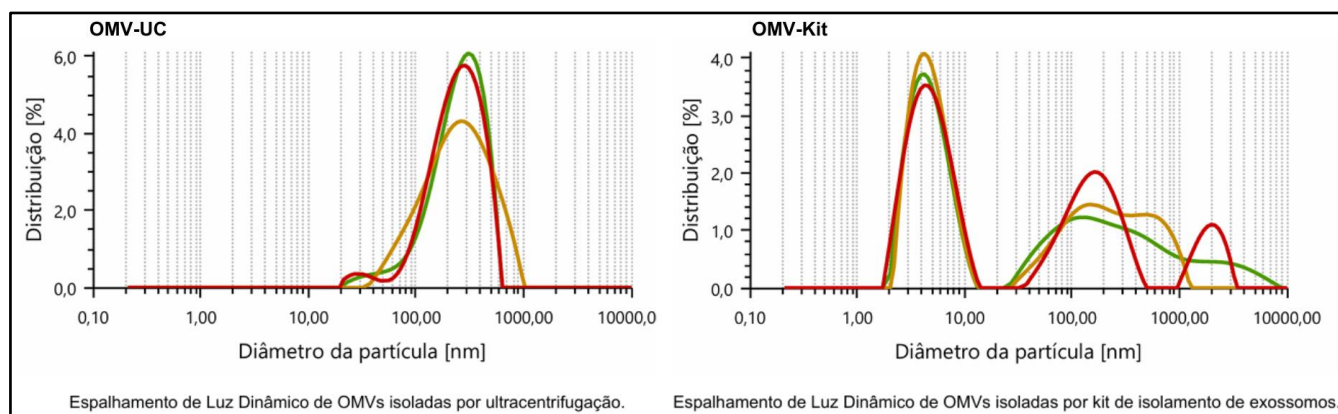
Através da medição do espalhamento dinâmico de luz, foi constatada uma diferença significativa nas médias dos diâmetros das OMVs isoladas por ambas as técnicas. De acordo com os resultados obtidos, as OMVs isoladas por kit de isolamento de exossomos (OMVs-Kit) apresentaram um diâmetro 2,83 vezes menor, quando comparadas às isoladas pela UC. Ademais, as vesículas isoladas por UC apresentaram uma carga de superfície quase 7 vezes mais negativa, quando comparadas as vesículas isoladas pelo kit.

Tabela 2. Análises do diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície de OMVs.

	OMVs-UC	OMVs-Kit
Espalhamento de Luz Dinâmico (nm)	242,83*	85,71*
Potencial Zeta (mV)	-22,41	-3,28

*Média dos valores do diâmetro hidrodinâmico das OMVs.

Gráfico 1. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico de OMVs-UC e OMVs-Kit avaliada por espalhamento de luz dinâmico e índice de polidispersão representada pelas três linhas de coloração distintas.



5.1.2 Diâmetro e Morfologia das OMVs por Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.1.2.1 OMVs-UC

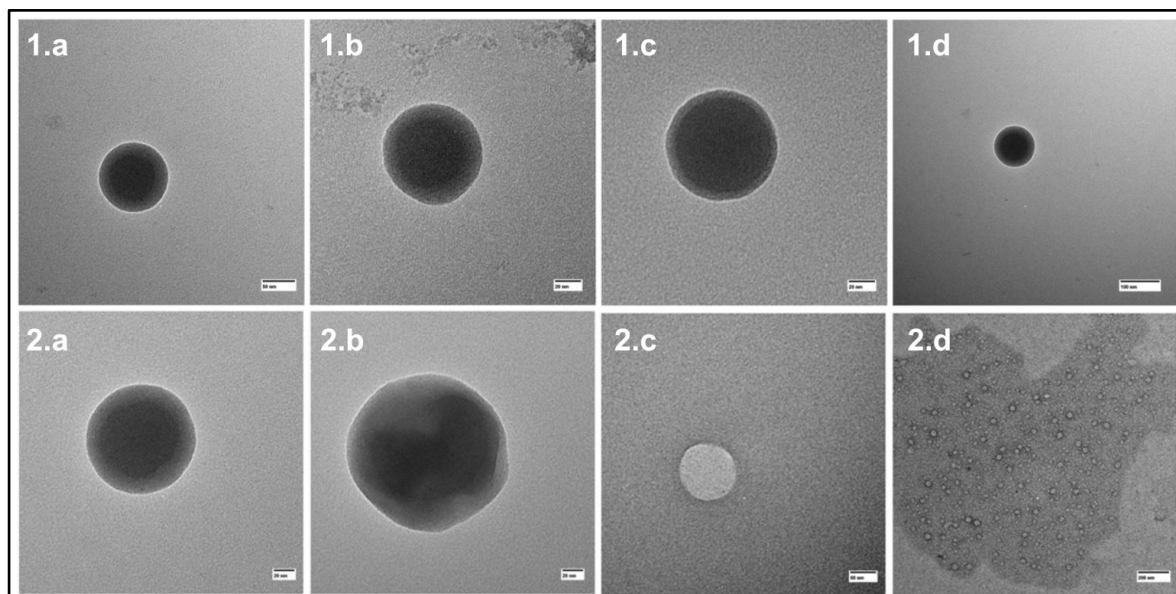
Através da técnica de MET, foi possível observar a morfologia interna de OMVs-UC, sendo constatada a presença da ME, responsável pelo revestimento da vesícula, e uma estrutura interna abaixo da membrana, com constituintes não identificados. Através das micrografias, foi possível realizar a visualização direta das OMVs fixas e secas, sem comprometer a visualização pela aglomeração de vesículas. Desse modo, constatou-se que as nanovesículas apresentaram um diâmetro na faixa dos 60 a 100 nm, com características estruturais semelhantes entre si.

5.1.2.2 OMVs-Kit

Da mesma forma, foram observadas OMVs-Kit, com diâmetro na faixa dos 60 a 100 nm. No entanto, foram constatados diferentes tipos de OMVs, presumindo-se que o uso do kit seja capaz de isolar nanovesículas de menores diâmetros e

densidades, como observado pela coloração mais clara das OMVs da figura 8.

Figura 7. Comparação entre OMVs-UC e OMVs-Kit visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão.

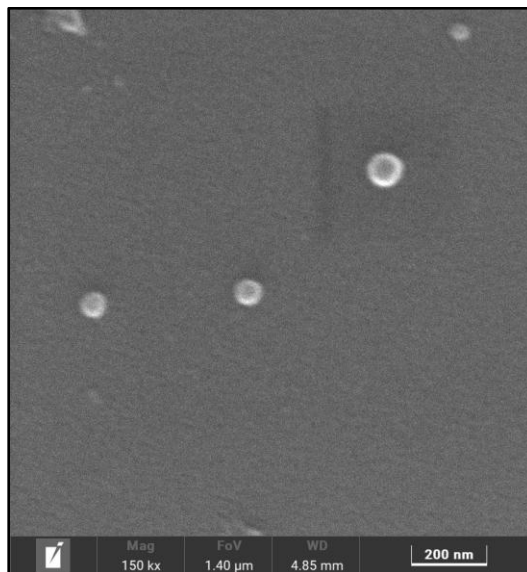


5.1.3 Diâmetro e Topologia das OMVs por Microscopia Eletrônica de Varredura

A partir da MEV, foi possível observar o diâmetro e superfície de *B. thailandensis* E264, como visto anteriormente na figura 6, e de OMVs-Kit, conforme imagem 8. No entanto, a leitura de OMVs-UC foi comprometida, não sendo possível visualizar OMVs.

De acordo com a micrografia, *B. thailandensis* possui cerca de 2,5 μm de comprimento, com formato de bacilo. As OMVs-Kit, por sua vez, apresentam formato esférico e diâmetro similar ao constatado por MET, variando na faixa de 60 a 100 nm.

Figura 8. Diâmetro e topologia de OMVs-Kit por micrografia de MEV.



5.1.4 Análise de Rastreamento de Nanopartículas

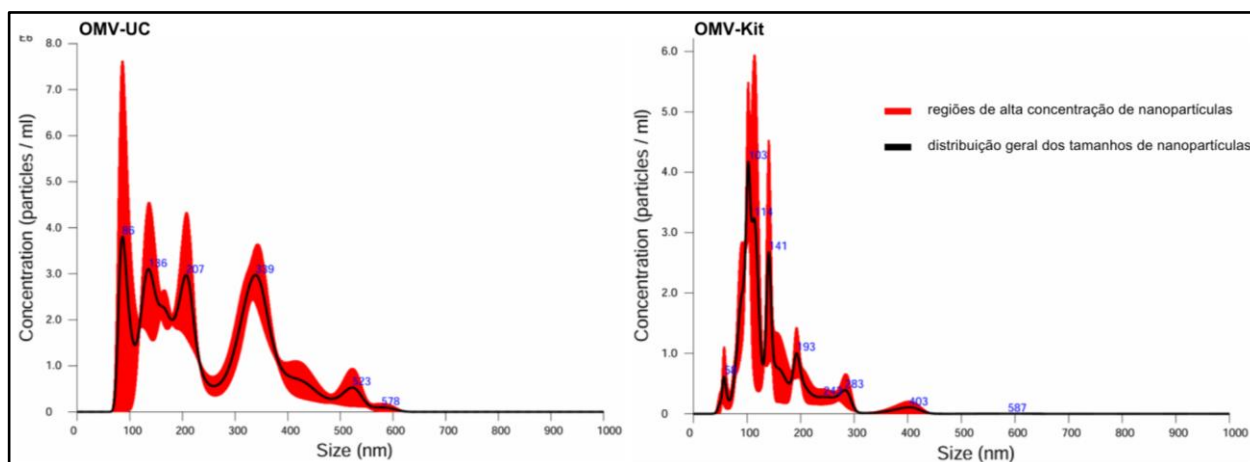
5.1.4.1 OMVs-UC

A partir da análise de NTA, observou-se que as OMVs-UC apresentaram diâmetro médio de 249 nm. Além disso, utilizando a metodologia de obtenção descrita anteriormente, foram quantificadas $7,08 \times 10^8$ partículas/mL.

5.1.4.2 OMVs-Kit

O uso do kit de isolamento de exossomos resultou em OMVs com um diâmetro médio de 145,8 nm, além de uma maior concentração de nanovesículas com 102 nm. A quantificação das partículas revelou um total de $2,46 \times 10^8$ partículas/mL.

Gráfico 2. Concentração e distribuição geral dos tamanhos de OMVs pela análise de rastreamento de nanopartículas de OMVs-UC e OMVs-Kit.



5.1.5 Espectroscopia Micro-Raman

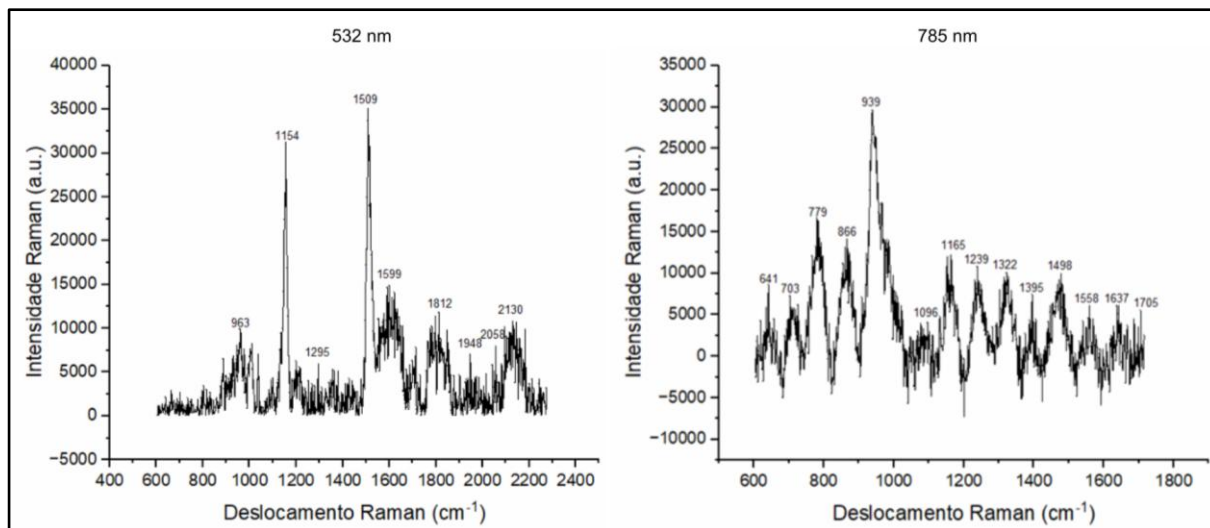
5.1.5.1 OMVs-UC

A partir da análise de espectroscopia micro-Raman, foram constatados compostos biológicos, identificados a partir dos números de onda comparados com dados da literatura. Os compostos encontram-se listados nas tabelas 4 e 5, em anexo. A identificação foi feita com base na relação entre intensidade e deslocamento do Raman. De modo geral, foram identificados carotenoides, material genético, aminoácidos como tirosina e fenilalanina, além de proteínas e lipídios.

5.1.5.2 OMVs-Kit

A análise por espectroscopia de micro-Raman não pôde ser realizada devido à ressuspensão das OMVs em PBS, o qual interferiu na leitura da amostra devido a sua composição contendo cristais de sais de fosfato e cloreto de sódio, responsáveis por causar o espalhamento da luz, causando a sobreposição ou mascarando os sinais do laser Raman.

Gráfico 3. Espectros correspondentes às macromoléculas identificadas por espectroscopia micro-Raman de OMVs-UC em 532 nm e 785 nm, observadas pela interação entre o deslocamento Raman do eixo x e intensidade Raman do eixo y.



5.1.6 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

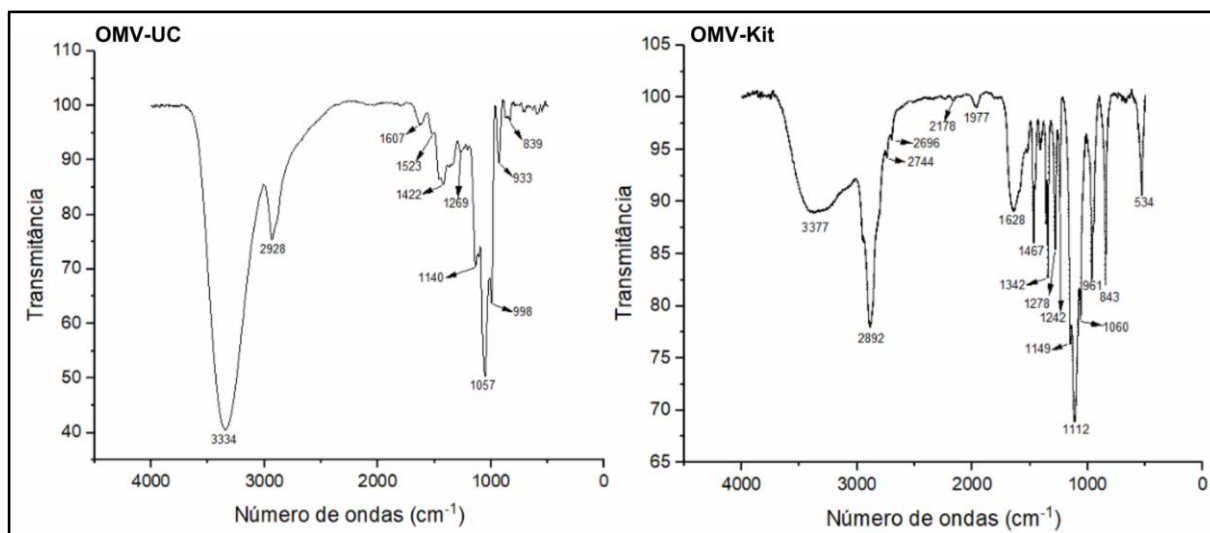
5.1.6.1 OMVs-UC

A partir da análise de FT-IR, foram constatados em OMVs-UC, os grupos funcionais listados na tabela 6, encontrada em anexo, como hidroxilas, nitro, halogênio, compostos aromáticos, grupo dióxido de enxofre, álcoois, fenóis, grupo sulfóxido, alquenos e anéis aromáticos. Para isso, a partir dos valores dos picos fornecidos pelo gráfico, os grupos funcionais foram comparados com dados da literatura.

5.1.6.2 OMVs-Kit

A partir da análise de FT-IR, foram constatados em OMVs-Kit grupos funcionais em comum com OMVs-UC, como hidroxilas, nitro e halogênio, conforme listado na tabela 7 encontrada em anexo.

Gráfico 4. Espectros correspondentes aos grupos funcionais identificados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier de OMVs-UC e OMVs-Kit, observados pela interação entre números de ondas do eixo x e intensidade do sinal do eixo y.



5.2 Avaliação da Atividade Antibacteriana de OMVs

Os resultados obtidos pelo método de gota-difusão não indicaram inibição do crescimento de células planctônicas de EAEC 042 tratada com as concentrações estoques de OMVs-UC à $7,08 \times 10^8$ partículas/mL e OMVs-Kit à $2,46 \times 10^8$ partículas/mL, assim como não houve inibição do crescimento bacteriano constatada pelo ensaio CIM. Consequentemente, a CBM não foi obtida, não havendo concentração responsável pela morte bacteriana.

Contudo, a partir das maiores concentrações de OMVs utilizadas no ensaio CIM, sendo de $3,54 \times 10^8$ partículas/mL de OMVs-UC e de $1,23 \times 10^8$ partículas/mL de OMVs-Kit, foi realizada a diluição seriada e contagem de colônias, comparando o crescimento bacteriano de EAEC que não recebeu o tratamento com vesículas, com EAEC tratadas com OMVs-UC e OMVs-Kit. A partir da contagem, foi revelada a redução de quase 1 log no crescimento bacteriano após o tratamento com OMVs isoladas por ambos os métodos.

Tabela 3. Redução da concentração bacteriana de células planctônicas após o tratamento com as maiores concentrações de OMVs, determinado pela contagem de colônias a partir do método de diluição seriada das maiores concentrações de OMVs utilizadas no CIM.

	EAEC 042	EAEC 042 + OMVs-UC	EAEC 042 + OMVs-Kit
Concentração Bacteriana (UFC/mL)	1,6x10 ⁹	6x10 ⁸	4,8x10 ⁸

Concentração bacteriana de EAEC 042 após o ensaio CIM, representadas pela cultura bacteriana sem tratamento; cultura bacteriana tratada com OMVs-UC na concentração de 3,54 x 10⁸; cultura bacteriana tratada com OMVs-Kit na concentração de 1,23 x 10⁸.

5.3 Avaliação da Atividade Antibiofilme de OMVs por MTT

5.3.1 Inibição da Formação de Biofilme de *Escherichia coli*

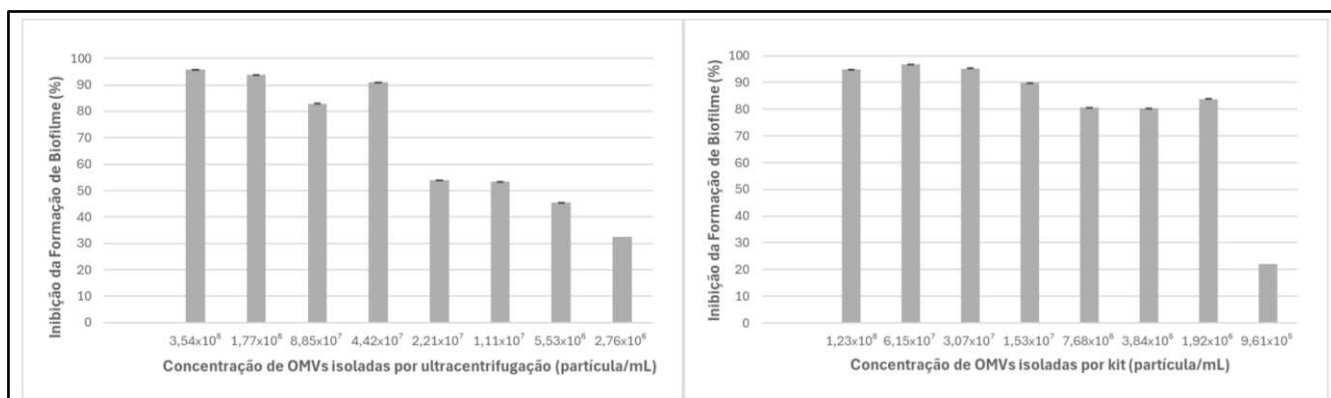
5.3.1.1 OMVs-UC

A partir do ensaio antibiofilme, foi observada a inibição de 95,86% da formação de biofilme de EAEC, utilizando OMVs-UC na concentração de 3,54 x 10⁸ partículas/mL. A alta taxa de redução da formação de biofilme permaneceu nas concentrações seguintes, conforme o gráfico 5.

5.3.1.2 OMVs-Kit

O ensaio de inibição da formação de biofilme utilizando OMVs-Kit na concentração de 1,23 x 10⁸ partículas/mL, resultou na inibição de 94,83% da formação de biofilme de EAEC. A alta taxa de redução da formação de biofilme permaneceu nas concentrações seguintes, conforme o gráfico 5.

Gráfico 5. Inibição da formação de biofilme de *Escherichia coli* por OMVs-UC e OMVs-Kit.



5.3.2 Destruição de Biofilme Pré-Formado de *Escherichia coli*

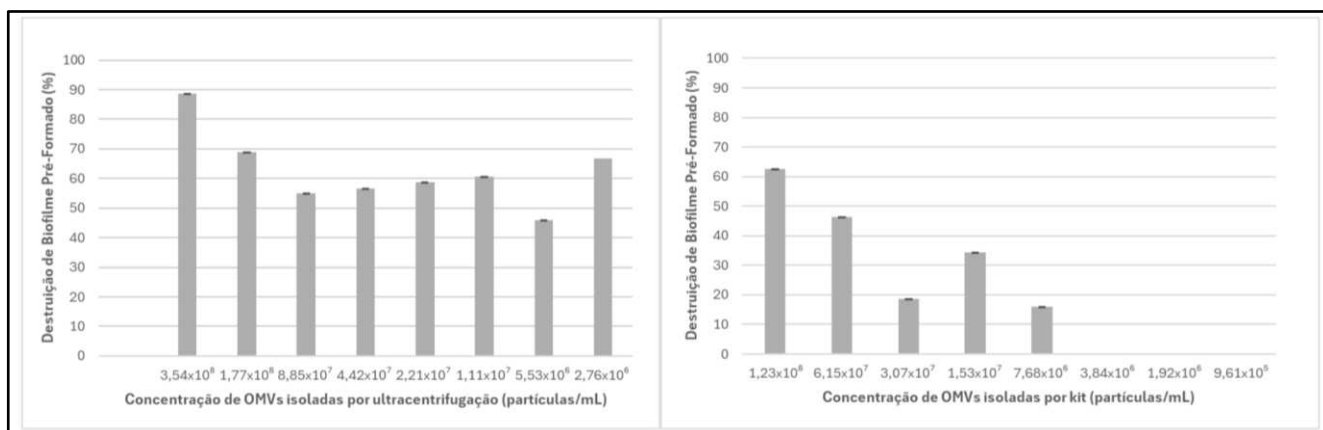
5.3.2.1 OMVs-UC

As OMVs-UC demonstraram-se capazes de reduzir 88,55% do biofilme pré-formado de EAEC, utilizando OMVs nas mesmas concentrações do ensaio contra biofilme em formação. A taxa de redução foi inferior quando comparada ao biofilme em formação. No entanto, as nanovesículas demonstraram atividade antibiofilme mesmo após diluições, conforme o gráfico 6.

5.3.2.2 OMVs-Kit

Diferente do observado anteriormente, as OMVs-Kit demonstraram uma redução da destruição de biofilme pré-formado, apresentando uma redução de 62,52% do biofilme pré-formado de *E. coli*, na maior concentração do tratamento, conforme observado no gráfico 6. Assim como relatado nas OMVs-UC, a atividade contra biofilme pré-formado pode ser reduzida devido ao tempo de formação de biofilme e maior dificuldade do tratamento após o crescimento bacteriano.

Gráfico 6. Destruição de biofilme pré-formado por *Escherichia coli* por OMVs-UC e OMVs-Kit.



5.4 Ensaio de Citotoxicidade

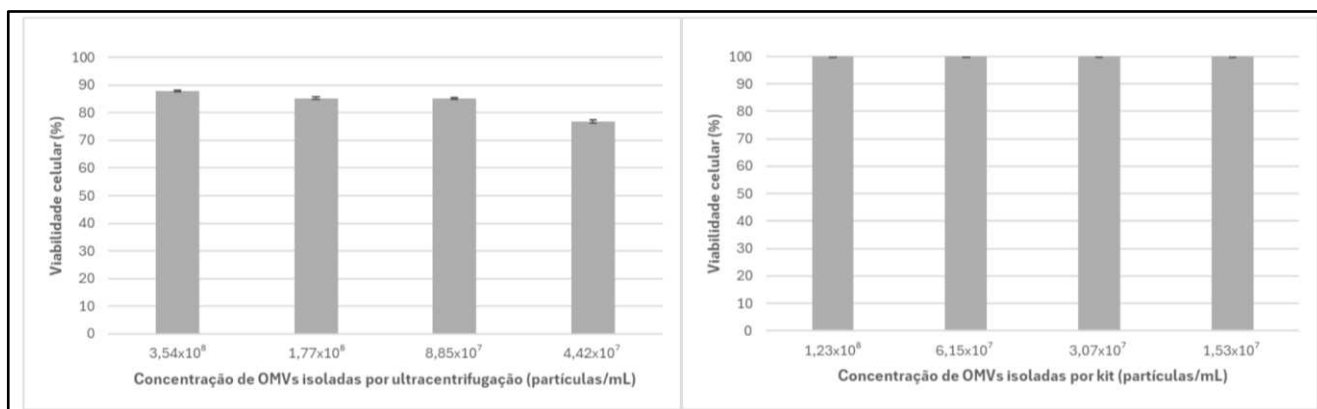
5.4.1 OMVs-UC

Conforme o gráfico 7, o ensaio de citotoxicidade demonstrou que OMVs-UC não apresentaram efeitos citotóxicos contra células VERO CCL-81. Embora a viabilidade celular tenha sido levemente reduzida a partir das diluições do tratamento, os tratamentos não afetaram o crescimento das células, resultando em uma viabilidade celular de 87,85% na concentração mais alta de OMVs-UC.

5.4.2 OMVs-Kit

As OMVs-Kit não apresentaram atividade citotóxica contra células VERO CCL-81, de forma que para todas as concentrações testadas nos ensaios antibiofilme, as células mantiveram 100% de viabilidade, como observado no gráfico 7. Desse modo, não foi possível calcular os valores de CC50 e CC100.

Gráfico 7. Ensaio de citotoxicidade utilizando células VERO CCL-81 tratadas com OMVs-UC e OMVs-Kit.



6 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, embora a estrutura de OMVs esteja intimamente relacionada com a arquitetura da ME parental (Avila-Calderón *et al.*, 2021), análises mais detalhadas indicaram que sua composição e estrutura não são idênticas às das células bacterianas, sugerindo que as OMVs sejam uma via de secreção dependente de um mecanismo específico de empacotamento (Schwechheimer; Kuehn, 2015; Turner *et al.*, 2018). Sabe-se que, em bactérias Gram-negativas, a biogênese vesicular é o principal fator determinante para a seletividade da carga de OMVs (Toyofuku *et al.*, 2023). Além da síntese de vesículas ser resultante de protuberâncias e desprendimento de fragmentos da ME, devido a velocidade inferior na síntese de mureína quando comparada à da síntese de ME, formando um excesso dessa membrana e, conseqüentemente, originando OMVs, elas também podem ser originadas a partir da lise de células bacterianas (Klim; Godlewska, 2017). Além disso, estudos sugerem que a composição do LPS esteja envolvida no aumento da secreção de OMVs e nas alterações em sua composição, especialmente quando há mutações em genes envolvidos na síntese da cadeia de açúcares OPS (oligopolissacarídeo), a porção mais externa do LPS que possui como principais funções o reconhecimento e ligação celular (Cahill *et al.*, 2015; Kocincova; Lam, 2011; Liu *et al.*, 2016).

A interação entre moléculas de LPS e moléculas envolvidas na sinalização de quorum sensing, como quinolona e acetil homoserina lactonas (AHLs), podem induzir a liberação de OMVs (Lin *et al.*, 2018). Ademais, estudos demonstraram que interrupções nas ligações entre ME e membrana celular interna, juntamente com o acúmulo de peptidoglicano, resultam em um aumento da produção vesicular (Ionescu

et al., 2014; Paulsson *et al.*, 2021; Wessel *et al.*, 2013). Desse modo, a liberação de OMVs pode ocorrer em regiões em que as ligações entre ME e peptidoglicano encontram-se relaxadas (YashRoy, 2017).

De modo geral, as vesículas apresentam em sua constituição, componentes da ME, proteínas da região periplasmática, moléculas hidrofóbicas e partes do peptidoglicano (Toyofuku *et al.*, 2023). Embora em nosso trabalho não tenha sido possível identificar especificamente os constituintes das OMVs de *B. thailandensis*, a partir da análise de micro-Raman e FT-IR, avaliamos os constituintes gerais a partir dos números de ondas identificadas pelo micro-Raman e os grupos funcionais identificados pelos números de ondas fornecidos pelo FT-IR. O uso de ambas as técnicas fornece um direcionamento quanto aos tipos de compostos vesiculares a partir de suas estruturas químicas (Krysa; Szymanska-Chargot; Zdunek, 2022).

Os espectros Raman são resultantes da dispersão da luz por moléculas vibrantes presentes na amostra, a partir da interação de um fóton do feixe de luz monocromático de laser de alta intensidade da espectroscopia com a nuvem de elétrons da molécula analisada. Desse modo, a molécula é excitada, gerando a emissão de fótons, permitindo a obtenção de um conjunto de vibrações moleculares presentes em uma amostra, fornecendo informações fisiológicas e bioquímicas, como as de uma célula bacteriana (Barnett *et al.*, 1990; Das; Agrawal, 2011; Harris *et al.*, 1977; Jones *et al.*, 2019; Schuster *et al.*, 2000). Sendo assim, os espectros gerados podem revelar a composição de macromoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Camp JR; Cicerone, 2015). No entanto, alguns fatores devem ser considerados para a realização do micro-Raman, visto que podem interferir na leitura da amostra, como a fluorescência das amostras que podem obscurecer os sinais Raman, dificultando a leitura dos resultados (Pasteris; Beyssac, 2020), além da alta qualidade e preparo correto das amostras para obtenção de resultados precisos (Krafft; Popp, 2019).

O FT-IR por sua vez, é uma técnica pautada na vibração de moléculas que são excitadas pela luz infravermelha, as quais refletem ou emitem a luz infravermelha, sendo possível utilizar as ligações detectadas para comparar e determinar os compostos químicos, fornecendo dados que sugerem quais grupos funcionais são presentes na amostra (Boskey; Pleshko Camacho, 2007). Trata-se de uma análise rápida, na qual não necessita de um complexo preparo das amostras (Nene *et al.*, 2024). Contudo, a análise pode ser afetada pela homogeneidade e espessura da

amostra, dificultando a leitura correta (Siddique, 2023).

De acordo com nossos dados, através do micro-Raman, foi possível identificar em OMVs-UC, a presença de carotenoides, um grupo de compostos orgânicos com pigmentos que conferem ação antioxidante (Dutta; Bandopadhyay, 2022), material genético, aminoácidos como tirosina e fenilalanina, além de proteínas e lipídios, os quais são compostos predominantes na ME bacteriana. Em razão da presença de PBS, a análise não pôde ser realizada em OMVs-Kit, o que impediu a leitura pelo laser. Complementando nossos resultados, a espectroscopia FT-IR revelou, em ambos os métodos de obtenção, a presença de grupos hidroxilas, indicando a possível presença de álcoois ou ácidos carboxílicos; grupo nitro, indicando a presença de compostos orgânicos; e halogênio, indicando a presença de haletos orgânicos. Também foram detectados em OMVs-UC, compostos aromáticos, grupo dióxido de enxofre, álcoois, fenóis ou grupo sulfóxido, e alquenos ou anéis aromáticos.

De acordo com a literatura, OMVs de *P. aeruginosa* e *Porphyromonas gingivalis* apresentam altas concentrações de LPS com cadeias de antígeno O carregadas negativamente, o que sugere que a ME dessas bactérias seja desestabilizada pelas interações repulsivas entre as cadeias de antígeno O, resultando na síntese de OMVs (Murphy et al., 2014). Além disso, foi observada a presença de altas concentrações de porinas no proteoma de vesículas. Essas proteínas, localizadas na ME de bactérias e, em OMVs, desempenham diversas funções, como a formação de vesículas de *Pseudomonas*, a partir da redução dos níveis de sinal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS), que impede a ligação entre a ME e o peptidoglicano (Wessel et al., 2013). As porinas também facilitam a internalização de OMVs de *V. cholerae* em células hospedeiras (Zingl et al., 2021), além de promoverem a adesão de OMVs à mucosa do hospedeiro, superfícies de células bacterianas e biofilmes, mediada pela interação entre a porina OprF e o exopolissacarídeo presente na matriz do biofilme (Cassin; Tseng, 2019).

A presença de proteínas específicas, assim como o conteúdo lipídico, é uma característica fundamental das OMVs, variando de acordo com a célula bacteriana progenitora. Estudos demonstram que fatores de virulência são encontrados em vesículas oriundas de bactérias patogênicas, como *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *P. gingivalis* e *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC) (Bomberger et al., 2009; Horstman; Kuehn, 2000; Kadurugamuwa; Beveridge. 1995); assim como hidrolases de glicosídeo são encontrados em vesículas de *Bacteroides*, permitindo a degradação de

polissacarídeos ambientais e causando a quebra de ligações glicosídicas que implicam na degradação da parede celular de células vegetais (Elhenawy; Debelyy; Feldman, 2014; Zhang *et al.*, 2020); além de outros compostos antibacterianos, como os identificados em vesículas de *Myxococcus xanthus* que auxiliam na eliminação de bactérias ambientes (Berleman *et al.*, 2014), sendo esses: hidrolases ácidas, como hidrolases de peptidoglicano, as quais hidrolisam ligações covalentes no peptidoglicano, comprometendo a parede celular e resultando em lise bacteriana (Wilson; Garner, 2021), e fosfatases alcalinas, as quais reduzem efeitos tóxicos de infecções bacterianas pelo processo de desintoxicando dos LPS (Hodin; Malo, 2011; Brands; Poelstra, 2005).

Segundo o trabalho de Wang e colaboradores (2020), OMVs isoladas por *B. thailandensis* apresentaram em sua composição, hidrolases de peptidoglicano e moléculas termicamente estáveis, como HMNQ e o biosurfactante ramnolipídio (Rha-Rha-C14-C14), os quais apresentaram atividade antimicrobiana e antibiofilme contra *MRSA*. Desse modo, a hipótese levantada no estudo sugere que essas OMVs sejam capazes de entregar alguns compostos antimicrobianos, garantindo a sobrevivência da *B. thailandensis* quando essa encontra-se competindo com outras espécies microbianas em um nicho ambiental. A análise proteômica realizada identificou diversas classes de hidrolases de peptidoglicano. Também foram identificados análogos potenciais de hidroxi-alkilquinolinas (HAQs), os quais apresentaram menor rendimento e atividade antimicrobiana mais fraca (Wang *et al.*, 2020b).

Desse modo, nossos resultados corroboram com os dados encontrados na literatura, indicando a presença das mesmas classes de constituintes. Sugerimos que OMVs isoladas por ambos os métodos, sejam constituídas por hidrolases de peptidoglicano, ramnolipídios e HMNQ, além da carga geral presente em OMVs, conforme listado anteriormente. Contudo, mais estudos são necessários a fim de confirmar especificamente os compostos vesiculares.

Em nosso trabalho, buscamos comparar dois métodos de obtenção de OMVs: a obtenção por UC e a obtenção por meio do kit de isolamento de exossomos. Desse modo, realizamos a obtenção e caracterização vesicular por ambas as técnicas e comparamos sua atividade antibiofilme.

Embora seja amplamente utilizado por sua alta pureza, a UC é um processo demorado que demanda grandes volumes iniciais de cultura bacteriana, com baixa recuperação de vesículas (Cvjetkovic *et al.*, 2014; Klimentová; Stulík, 2015; Van Der

Pol *et al.*, 2015). Além do mais, esse método pode promover o acúmulo e agregação de OMVs, devido ao uso de rotores de ângulo fixo e a peletização, resultando na fusão de vesículas íntegras com vesículas que apresentam membranas enfraquecidas, gerando OMVs com maiores diâmetros (Klimentová; Stulík, 2015; Witwer *et al.*, 2013). De acordo com o trabalho de Reimer e colaboradores (2021), em seus resultados, as maiores OMVs-UC apresentaram um diâmetro de 450 nm, indicando uma possível agregação, visto que, anteriormente a etapa de UC, a amostra foi filtrada em filtro com poros de 0,45 µm, removendo partículas maiores que esse tamanho.

Em nosso trabalho, observamos pelo NTA que, OMVs-UC apresentaram um diâmetro médio de 249 nm, enquanto a análise de DLS demonstrou um diâmetro hidrodinâmico maior de 242,83 nm.

O segundo método utilizado para a obtenção vesicular foi a partir do uso do kit de isolamento de exossomos. De acordo com a descrição do produto (Kit Total Exosome Isolation Reagent - Invitrogen™), o reagente é responsável por forçar os componentes menos solúveis, como OMVs, a precipitarem após um período de incubação, permitindo sua coleta por centrifugação de baixa rotação. Além disso, a empresa afirma que o uso do kit apresenta maior semelhança no tamanho dos exossomos quando comparado ao método por UC.

Nossos dados indicam uma grande similaridade entre as OMVs obtidas pelos dois métodos de isolamento. No entanto, observou-se que as OMVs-Kit apresentaram menor diâmetro e uma concentração ligeiramente inferior, conforme evidenciado pelas análises DLS e NTA. Junto a isso, a MET revelou, além dos mesmos padrões de vesículas em ambos os métodos de obtenção, um padrão diferente de OMVs-Kit, com diâmetro e densidade menores. O estudo de Reimer e colaboradores (2021) também demonstrou que, ao realizar o isolamento por UC, as OMVs apresentaram tamanho maior em comparação ao isolamento por ultrafiltração.

O trabalho de Sharif e colaboradores (2021) também buscou comparar OMVs de *E. coli* ClearColi™ isoladas pelo método de UC e pelo uso de Exocib Kit (Cib Biotech Co., Irã) e avaliou as vantagens de cada técnica. Em ambos os métodos, as OMVs foram previamente precipitadas pelo uso de sulfato de amônio. De acordo com seus resultados, as OMVs-UC apresentaram menor diâmetro e menor índice de polidispersão quando comparado ao kit utilizado, apresentando menor heterodispersão das vesículas.

Nossos resultados mostram que as OMVs-UC, apresentam grande similaridade morfológica com aquelas isoladas pelo mesmo método no estudo anteriormente citado, assim como OMVs-Kit também apresentaram semelhanças com o método correspondente. Além disso, em nosso trabalho, as OMVs-Kit apresentaram heterogeneidade em seus diâmetros, corroborando com a literatura. Contudo, a análise de DLS revelou que o tamanho das vesículas obtidas pelo kit utilizado em nosso estudo foi menor quando comparado ao método de ultracentrifugação, destacando uma possível vantagem no uso do kit, visto que MVs de menores diâmetros possuem maior capacidade de penetração nas membranas de células bacterianas, facilitando as interações mais rápidas com as células-alvo (Singh *et al.*, 2023).

De modo semelhante, um estudo isolou vesículas fosfolipídicas, que foram visualizadas em MET, apresentando imagens parecidas às observadas pelas vesículas isoladas pelo kit utilizado neste trabalho. As vesículas fosfolipídicas foram identificadas quanto a sua composição, como PA, PC e PE, em que possuem os seguintes fosfolipídios, respectivamente: fosfatídica, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina. O PA e PE são comumente encontrados em membranas plasmáticas bacterianas (Epand; Savage; Epand, 2007; Istivan; Coloe, 2006; Moncelli; Becucci; Guidelli, 1994; Murzyn; Róg; Wilderman *et al.*, 2002).

Desse modo, a UC e o uso do kit de isolamento de exossomos apresentam grande similaridade quanto à recuperação vesicular. No entanto, sugerimos que o uso do kit de isolamento seja significativamente vantajoso devido às dificuldades encontradas no método de ultracentrifugação. Para a obtenção de OMVs por ultracentrifugação utilizando altas rotações, é necessário considerar o tipo de material biológico utilizado, o tipo específico de rotor, assim como o tempo e velocidade de rotação, implicando em difíceis comparações entre estudos que não fornecem especificamente os dados utilizados (Crigna *et al.*, 2021; Cvjetkovic *et al.*, 2014; Suh *et al.*, 2024; Torres-Vanegas *et al.*, 2024). Além disso, a alta rotação pode implicar em danos e agregações de OMVs (Nordin, 2017). O uso do kit, por sua vez, otimiza o tempo de produção, facilitando a produção de OMVs em maior escala.

Em relação à ação bacteriostática das OMVs de *B. thailandensis* contra EAEC, foi observada a queda de quase 1 log do crescimento bacteriano, na maior concentração testada para CIM, conforme dados apresentados neste trabalho. Embora não tenha sido observada a ação bactericida das OMVs, a partir do ensaio

antibiofilme com revelação por MTT, foi constatada a capacidade das vesículas de *B. thailandensis*, isoladas por ambos os métodos, em reduzir significativamente os biofilmes, sobretudo, biofilmes em formação.

De acordo com trabalhos da literatura, OMVs são capazes de realizar sua fusão com células bacterianas mediadas por algum tipo de grau de especificidade (Biller *et al.*, 2022; Toyofuku *et al.*, 2017; Wang; Nie; Wu, 2021). Contudo, os mecanismos envolvidos nesse processo não são bem compreendidos (Toyofuku *et al.*, 2023). Estima-se que a partir de sua estrutura, as OMVs possam apresentar uma maior propensão em se associar com a parede celular de bactérias específicas que apresentem similaridade em sua constituição, como a carga de superfície (Tashiro *et al.*, 2017) e superfície hidrofóbica (Macdonald; Beveridge, 2002). Desse modo, sugerimos que devido às similaridades entre as paredes celulares de EAEC 042 e *B. thailandensis* E264, as OMVs foram capazes de se fundir a ME das bactérias, liberando compostos antimicrobianos, como hidrolases, HMNQ e ramnolipídios.

A atividade antibiofilme de ramnolipídios já é descrita na literatura (De Rienzo; Martin, 2016; Wood *et al.*, 2018). De acordo com um estudo recente, biofilmes de MRSA tratados com HMNQ e ramnolipídios apresentaram uma redução significativa da biomassa total, aumento da proporção de células mortas e do coeficiente de rugosidade nos biofilmes, além de uma redução da espessura dos biofilmes pré-formados, quando comparados ao grupo controle que não recebeu tratamento (Wang *et al.*, 2020b).

Ademais, quando secretadas por bactérias resistentes a β -lactâmicos, as OMVs apresentam altas concentrações de β -lactamases (Ciofu *et al.*, 2000; Schaar *et al.*, 2011). Devido ao empacotamento vesicular, a enzima encontra-se protegida no interior do lúmen das OMVs, evitando a degradação e neutralização pelos anticorpos do sistema imune do hospedeiro (Schaar *et al.*, 2013). Desse modo, quando necessário, as enzimas são liberadas, contribuindo para a sobrevivência da célula bacteriana progenitora e da comunidade bacteriana que coabitam o mesmo habitat, como observado em casos de coinfeções (Kim *et al.*, 2018; Schaar *et al.*, 2011). Esse fato foi observado em um estudo clínico que relatou que pacientes infectados por *S. pyogenes* do grupo A e *Haemophilus influenzae* resistente, o qual produz OMVs com β -lactamases, apresentaram uma falha na terapia com amoxicilina, resultando em um tratamento ineficaz contra faringoamigdalite (Bielaszewska *et al.*, 2021).

Outro fator que pode contribuir para a especificidade vesícula-célula são as

interações entre ligante-receptor. Conforme estudo de Lin e colaboradores (2017), um efector denominado TseF é incorporado em OMVs de *P. aeruginosa* por intermédio de um sistema de secreção tipo VI (T6SS), que direciona as OMVs para suas células-mãe pela ligação aos receptores de superfície FptA e OprF (Lin *et al.*, 2017).

A ação antibacteriana de OMVs contra demais espécies competidoras, foi relatada pela primeira vez com vesículas de *P. aeruginosa*, relacionada à presença de hidrolases de peptidoglicano (Kadurugamuwa; Beveridge, 1966; Li *et al.*, 1998). Nos últimos anos, foi constatada a síntese de produtos antibacterianos por *Burkholderia*, como capistruina (Knappe *et al.*, 2008), malleilactona (Biggins; Ternei; Brady, 2012), thailandamida (Nguyen *et al.*, 2008), burkholdacs (Biggins *et al.*, 2011), thailanstatinas (Liu *et al.*, 2013), bactobolina (Seyedsayamdost *et al.*, 2010), ramnolipídio (Dubeau *et al.*, 2009) e hidroxi-alkilquinolina (Vial *et al.*, 2008). Wang e colaboradores (2020) sugerem que esses compostos sejam secretados por intermédio de OMVs, resultando em vantagens nas respostas predatórias contra microrganismos competidores (Beveridge, 1999; Mashburn-Warren *et al.*, 2008; Mashburn-Warren; Whiteley, 2006), mas destacam a necessidade de novos estudos para determinar a preferência pela secreção de HMNQ e ramnolipídios por OMVs.

Derivados de HAQs foram recentemente encontrados em *B. thailandensis* (Vial *et al.*, 2008; Wu; Seyedsayamdost, 2007), agindo como moléculas de QS, participando da modulação imunológica, da comunicação entre células bacterianas e com efeitos sinérgicos que podem ser capazes de inibir o crescimento de *E. coli* (Vial *et al.*, 2008; Wu; Seyedsayamdost, 2007). Dentre os HAQs produzidos por *B. thailandensis*, o HMNQ é a forma predominante, sendo capaz de perturbar a força motriz da proteína responsável pela passagem de prótons e por impedir a biossíntese de pirimidinas (Wu; Seyedsayamdost, 2007).

Os surfactantes ramnolipídios, por sua vez, são glicolipídios com até dois rhamnoses unidos por ligação β -glicosídica, sendo mono ou di-ramnolipídios, além de ácidos graxos 3-hidroxi com axilas de diferentes comprimentos de cadeia (Jarvis; Johnson, 1949). Em *B. thailandensis*, sabe-se que os ramnolipídios produzidos são predominantemente de ácidos graxos de cadeias longas, com potente atividade antibacteriana por inibição da síntese da parede celular (Costa; Déziel; Lépine, 2011; Dubeau *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2020b).

Ademais, um estudo investigou a geração de estresse oxidativo por meio de OMVs isoladas por *P. aeruginosa*, sendo capaz de causar morte celular em bactérias

(Gurunathan; Choi; Kim, 2018). A partir do estresse oxidativo, danos celulares são gerados, afetando proteínas, DNA e a membrana celular (Zhang; Shen; Gurunathan, 2016). De acordo com o estudo, as vesículas produzidas por *P. aeruginosa* induzem 3 vezes mais a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *Streptococcus mutans*. As proteínas bacterianas são importantes alvos biológicos para a ação de ROS (Butterfield; Dalle-Donne, 2012; Davis, 2003; Zhang *et al.*, 2016). Ademais, embora o mecanismo de interação entre OMVs e células bacterianas ainda não seja completamente compreendido, as vesículas são capazes de agir em diversos alvos bacterianos, como membrana celular, enzimas, proteínas, lipídios, DNA e plasmídeos (Gurunathan *et al.*, 2023).

As células apresentam naturalmente um estado de homeostasia, devido a manutenção do equilíbrio entre pró-oxidante-antioxidante. Quando sofrem pelo estresse oxidativo, elas podem sofrer hidroxilação do DNA, desnaturação proteica, peroxidação lipídica e perda da viabilidade celular, que podem ser combatidas por defesas antioxidantes não enzimáticas, assim como sistemas de reparo (Gurunathan *et al.*, 2023). Diante disso, o trabalho de Gurunathan (2023) sugere que OMVs produzidas por *P. aeruginosa* agem comprometendo os metabólitos antioxidantes, resultando no estresse celular, levando à morte bacteriana, causada pelo extravasamento de proteínas citoplasmáticas em *S. mutans*, devido à alteração do potencial de membrana, resultando na perda de sua integridade e morte celular, além da inibição na síntese de ATP e perda da capacidade de adesão das bactérias.

Além disso, devido ao seu tamanho na nanoescala, as OMVs têm uma distribuição mais rápida nos tecidos em comparação a distribuição de medicamentos convencionais. Essas vesículas também são capazes de proteger seu conteúdo interno, tornando-se uma estratégia promissora para a entrega de medicamentos (Bitto; Kaparakis-Liaskos, 2017; Macdonald; Kuehn, 2013). Em hospedeiros humanos, foi relatado que OMVs com diâmetros inferiores a 100 nm são capazes de entrar em células epiteliais e desencadear respostas pró-inflamatórias, potencializando a ação medicamentosa (Karakakis *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2018). Sugerimos que, embora a diferença tenha sido sutil, a melhor atividade antibiofilme das OMVs-Kit em comparação às OMVs-UC possa ser atribuída ao seu menor diâmetro, além de uma possível variação em sua composição.

De acordo com dados do estudo de Van Nederveen e Melton-Celsa (2024), os autores investigaram diferentes abordagens para a modulação de biofilmes de EAEC.

O uso de proteinase K mostrou-se eficaz, reduzindo em 60% a coloração dos biofilmes em formação, enquanto o tratamento com DNase resultou em uma redução de 20%. Em alguns casos, a proteinase K induziu alterações no arranjo das células do biofilme, observando-se uma quantidade menor de células em comparação aos biofilmes tratados com PBS (Van Nederveen; Melton-Celsa, 2024). Além disso, foi observado que o metaperiodato de sódio, um agente que cliva carboidratos, causou rearranjos nas células presentes no biofilme, embora sem alterar significativamente a coloração quantitativa (Van Nederveen; Melton-Celsa, 2024). O estudo também sugere que componentes como proteínas, DNA e carboidratos estão protegidos dentro da estrutura dos biofilmes formados. Nos biofilmes pré-existentes, somente a proteinase K foi capaz de reduzir a coloração quantitativa de algumas células (Van Nederveen; Melton-Celsa, 2024). Com base nesses resultados, os autores concluem que os biofilmes de EAEC são estruturas complexas que envolvem carboidratos, proteínas e DNA, indicando que um único tratamento de antibioticoterapia não seria suficiente para eliminar completamente os biofilmes de EAEC.

Com base em nossos resultados acerca da composição das OMVs de *B. thailandensis* obtidos pelo micro-Raman e FT-IR, os quais indicam a presença de proteínas, sugerimos que as vesículas podem apresentar em sua constituição proteinase K ou enzimas semelhantes, capazes de reduzir a concentração de células e causar o rearranjo do biofilme. Desse modo, ainda que a inibição do crescimento do biofilme de EAEC não seja alcançada, o tratamento com OMVs é capaz de impactar em sua estrutura.

Devido à variedade de moléculas bioativas presentes nas OMVs, a matriz extracelular dos biofilmes pode ser degradada por enzimas líticas, enquanto o biofilme bacteriano pode ser desorganizado pelo contato com proteínas, lipídios e DNA originados das OMVs (Cooke *et al.*, 2020; YashRoy, 2016). A interação entre OMVs e bactérias formadoras de biofilmes é potencializada por fatores de virulência e material genético que são entregues pelas vesículas, resultando no direcionamento da degradação de estruturas do biofilme (Tashiro *et al.*, 2019). Desse modo, baseando-se em dados citados anteriormente que demonstram a ação de OMVs contra estrutura de biofilmes, sugerimos que as OMVs oriundas de *B. thailandensis* analisadas neste trabalho, possuem compostos com maior capacidade de destruição da matriz extracelular de biofilmes, comprometendo sua estrutura.

Outro fator observado em nosso trabalho foi a diferença eletrostática entre as

OMVs analisadas. Conforme descrito na tabela 2, foi constatada a carga superficial de -22,41 mV em OMVs-UC, enquanto OMVs-Kit apresentaram a carga de -3,28 mV. A interação entre OMVs e superfícies biológicas é influenciada pela carga eletrostática das vesículas, as quais são predominantemente carregadas negativamente, devido a presença de LPS em sua superfície, aumentando a adesão e absorção nas superfícies de células hospedeiras (Gui *et al.*, 2016; Magaña *et al.*, 2023). Contudo, a carga pode variar de acordo com as espécies bacterianas e a composição da membrana externa (Gui *et al.*, 2016).

De acordo com a Wang e colaboradores (2023), cargas positivas de OMVs promovem sua ligação com membranas bacterianas carregadas negativamente, facilitando a entrega dos compostos intravesiculares. Além disso, o campo elétrico formado a partir de OMVs pode modular a expressão gênica associada à formação de biofilme, resultando na redução da biomassa e integridade da comunidade bacteriana (Wang *et al.*, 2023).

É relatado que OMVs induzidas por PQS de *P. aeruginosa* aumentam a degradação da matriz exopolissacarídica de biofilmes durante sua dispersão, sugerindo que as enzimas hidrolíticas presentes em OMVs sejam capazes de degradar essa matriz, colaborando para o desprendimento das células (Cooke *et al.*, 2020). Contribuindo para a ação antibiofilme, OMVs são capazes de modular vias de QS, as quais são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de biofilmes bacterianos e, desse modo, podem resultar na redução da formação de biofilme e aumento de sua dispersão (Chen *et al.*, 2024).

Sugerimos que a diferença de carga de superfície constatada entre as OMVs analisadas neste trabalho, seja decorrente da variação da composição das vesículas, conforme discutido anteriormente, com base nas micrografias obtidas por MET, onde é possível constatar a presença de OMVs-Kit com menor densidade, quando comparado às OMVs-UC. Sendo assim, pela variação em sua composição, a superfície de OMVs-Kit pode tornar-se menos negativa, possibilitando uma maior interação com as células bacterianas, ainda que em menor concentração.

Desse modo, a junção de fatores parece contribuir para a ação antibiofilme de OMVs, como a capacidade de se fundir a membranas bacterianas, presença de enzimas líticas, interferência na expressão gênica responsável pela formação de biofilme, degradação do conteúdo da matriz extracelular e modulação na via de quorum sensing.

Assim, a partir da junção dos dados do nosso trabalho e de estudos relatados na literatura, as OMVs apresentam uma vasta gama de aplicações no desenvolvimento de antimicrobianos, com estudos destacando suas vantagens como sistemas eficientes de administração de medicamentos em organismos eucariotos.

Ademais, a fim de avaliar a toxicidade das vesículas, avaliamos o efeito citotóxico de OMVs de *B. thailandensis* obtidas pelos métodos discutidos, testando-as contra células VERO CCL-81. As células VERO são conhecidas por sua sensibilidade a diversas substâncias tóxicas, possibilitando a detecção de efeitos citotóxicos de substâncias testadas em baixas concentrações, sendo possível determinar com precisão as doses citotóxicas letais (Gumm *et al.*, 2016; Perryman *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que as OMVs não apresentaram efeito citotóxico, não afetando a viabilidade celular dessa linhagem.

Em um estudo recente (Esam; Al Sahlane, 2023), OMVs isoladas de *E. coli* resistentes a múltiplos antimicrobianos causaram uma redução significativa na viabilidade celular das linhagens OV33 (células de câncer de ovário) e HdFn (fibroblastos dérmicos humanos), de forma dependente da concentração das vesículas utilizadas. Esses resultados sugerem que o conteúdo intravesicular das OMVs, como enzimas, fatores de virulência, peptidoglicanos, LPS e proteínas, foi transferido para as células, causando desestabilização biológica, alterações morfológicas e induzindo apoptose (Ellis; Kuehn, 2010).

O trabalho de Baker e colaboradores (2021) também investigou o efeito citotóxico de OMVs sobre células de linhagens. Neste estudo, Baker avaliou se as OMVs de *B. pseudomallei*, cultivadas em meio M9 que mimetiza as condições dos macrófagos, apresentavam alterações em seu conteúdo vesicular. As OMVs cultivadas nesse meio, denominadas OMVs M9, apresentaram proteínas relacionadas à sobrevivência intracelular. Quando testadas contra macrófagos RAW 264.7, essas OMVs não afetaram a viabilidade celular. Da mesma forma, ao testar OMVs derivadas de uma cepa não virulenta de *E. coli*, observou-se efeito citotóxico nas células de macrófagos. Corroborando com os achados de Baker, um estudo recente de Jin e colaboradores. (2022) relatou uma atividade citotóxica dependente da dose de OMVs isoladas de *E. coli* contra as linhagens de células de neuroblastoma humano SK-N-SH e SH-SY5Y, além das células de rim de embrião humano HEK293, conforme representado abaixo.

Como demonstrado pelos dados apresentados, o efeito citotóxico das OMVs

parece variar conforme as condições de crescimento e a cepa progenitora das vesículas. Sugerimos que, embora as OMVs obtidas neste trabalho apresentem efeito contra biofilme de EAEC, elas não resultem em efeitos citotóxicos em células VERO CCL-81 devido a não patogenicidade da célula progenitora e, conseqüentemente, ausência de compostos tóxicos para linhagem celular testada. Além disso, considerando as diferenças morfológicas entre células eucariotas e procariotas, reafirmamos a hipótese de que as OMVs utilizadas neste estudo, por apresentarem composição semelhante à da EAEC, sejam capazes de se fundir de forma mais eficiente e exercer maior toxicidade contra as células bacterianas. Isso se deve à semelhança com a membrana externa e com compostos bacterianos como LPS, lipídeos e proteínas. Em contrapartida, as células de linhagem renal, que não possuem membrana externa e apresentam estruturas mais complexas, seriam menos suscetíveis a esses efeitos, não possuindo receptores que permitem a internalização de OMVs.

Estudos futuros podem explorar em maior profundidade o mecanismo de ação das OMVs isoladas e avaliar sua eficácia em modelos clínicos, ampliando as possibilidades terapêuticas contra bactérias multirresistentes. Além disso, é recomendado que novas pesquisas se concentrem na identificação e isolamento dos constituintes bioativos das OMVs, a fim de testar sua atividade antibacteriana diretamente em cultivos bacterianos, além de realizar mais testes de toxicidade para avaliar seu efeito contra células eucariotas. A associação entre OMVs e antimicrobianos convencionais também pode representar uma estratégia inovadora para o tratamento de infecções resistentes, especialmente por serem possíveis carreadores com atividade antibiofilme, oferecendo uma abordagem terapêutica mais eficaz e de longo alcance.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, este estudo demonstrou que as OMVs isoladas de *B. thailandensis* E264 possuem uma ação eficaz na redução da formação e destruição de biofilmes de EAEC 042, sugerindo seu potencial como uma estratégia antibiofilme. Ademais, constatamos que as OMVs isoladas neste trabalho não apresentaram efeito tóxico contra cultura 2D de células VERO CCL-81. A comparação dos métodos de obtenção das vesículas revelou que, apesar das diferenças nos

procedimentos, o uso do kit de isolamento de exossomos apresentou vantagens em termos de tempo e facilidade, ao recuperar quantidades e padrões de vesículas semelhantes à ultracentrifugação. Esses achados indicam a viabilidade de técnicas mais rápidas e simples para a obtenção de vesículas do que a ultracentrifugação, sem comprometer a qualidade do material obtido. A resistência bacteriana associada à formação de biofilmes é um desafio significativo na terapia antimicrobiana, e o uso de OMVs pode representar uma alternativa promissora para o combate a infecções bacterianas persistentes.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, Salma. The challenges of implementing infection prevention and antimicrobial stewardship programs in resource-constrained settings. **Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. e45, 2024.

ACOSTA, G. J. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence and pathotype distribution in children from Peruvian rural communities. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 574, 2016.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.

ALI, M. M. M. *et al.* Enteraggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 05, p. 589-596, 2014.

ALLOCATI, N. *et al.* *Escherichia coli* in Europe: an overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6235-6254, 2013.

ASLANI, M. M. *et al.* Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. e136-e139, 2011.

ATKINS, T. *et al.* Characterisation of an acapsular mutant of *Burkholderia pseudomallei* identified by signature tagged mutagenesis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 539-553, 2002.

AVILA-CALDERÓN, E. D. *et al.* Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 557902, 2021.

AYTAR ÇELİK, P. *et al.* Bacterial membrane vesicles as smart drug delivery and carrier systems: a new nanosystems tool for current anticancer and antimicrobial therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1052, 2023.

BALA, A. *et al.* Augmentation of virulence related traits of pqs mutants by *Pseudomonas* quinolone signal through membrane vesicles. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 566-578, 2015.

BALLÉN, V. *et al.* Clinical *Escherichia coli*: from biofilm formation to new antibiofilm strategies. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1103, 2022.

BALLOTTIN, D. *et al.* Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. **Materials Science and Engineering C**, v.75, p.582–589, 2017.

BAKER, S.; DAVITT, C.; MORICI, Lisa. Gram-negative bacterial outer membrane vesicles inhibit growth of multidrug-resistant organisms and induce wound-healing cytokines. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2016. p. 2242.

BAKER, S. M. *et al.* *Burkholderia pseudomallei* OMVs derived from infection mimicking conditions elicit similar protection to a live-attenuated vaccine. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 18, 2021.

BANGAR, R.; BALLAL, M. Identification of enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 8, 2008.

BALHUIZEN, M. D.; VELDHUIZEN, E. JA; HAAGSMAN, H. P. Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 629090, 2021.

BARNETT, S. M.; DICAIRE, F.; ISMAIL, A. A. Application of FT-Raman spectroscopy to the study of selected organometallic complexes and proteins. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1196-1200, 1990.

BAZARGANI, M. M; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, p. 156-164, 2016.

BELAS, R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 9, p. 517-527, 2014.

BELOIN, C.; ROUX, A.s; GHIGO, J. -M. *Escherichia coli* biofilms. **Bacterial Biofilms**, p. 249-289, 2008.

BERLEMAN, J. E. *et al.* The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 474, 2014.

BERNABEU, M. *et al.* Infection of mice by the enteroaggregative *E. coli* strain 042 and two mutant derivatives overexpressing virulence factors: impact on disease markers, gut microbiota and concentration of SCFAs in feces. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 16945, 2024.

BEVERIDGE, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671-676, 2011.

BIELASZEWSKA, M. *et al.* In vivo secretion of β -lactamase-carrying outer membrane vesicles as a mechanism of β -lactam therapy failure. **Membranes**, v. 11, n. 11, p. 806, 2021.

BIGGINS, J. B.; GLEBER, C. D.; BRADY, S. F. Acyldepsipeptide HDAC inhibitor production induced in *Burkholderia thailandensis*. **Organic Letters**, v. 13, n. 6, p. 1536-1539, 2011.

BIGGINS, J. B.; TERNEI, M. A.; BRADY, S. F. Malleilactone, a polyketide synthase-derived virulence factor encoded by the cryptic secondary metabolome of *Burkholderia pseudomallei* group pathogens. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 32, p. 13192-13195, 2012.

BILLER, S. J. *et al.* *Prochlorococcus* extracellular vesicles: molecular composition and adsorption to diverse microbes. **Environmental Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 420-435, 2022.

BIRK, S. E.; BOISEN, A.; NIELSEN, L. H. Polymeric nano-and microparticulate drug delivery systems for treatment of biofilms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 174, p. 30-52, 2021.

BITTO, N. J.; KAPARAKIS-LIASKOS, M. The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1287, 2017.

BLAKE, D. P. *et al.* Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 428-436, 2003.

BOBROVSKYY, M. *et al.* EssH peptidoglycan hydrolase enables *Staphylococcus aureus* type VII secretion across the bacterial cell wall envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 20, p. 10.1128/jb. 00268-18, 2018.

BOHUSZEWICZ, O.; LIU, J.; LOW, H. H. Membrane remodelling in bacteria. **Journal of Structural Biology**, v. 196, n. 1, p. 3-14, 2016.

BOMBERGER, J. M. *et al.* Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000382, 2009.

BOSKEY, A.; CAMACHO, N. P. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 28, n. 15, p. 2465-2478, 2007.

BRANDS, R.; POELSTRA, K. Use of alkaline phosphatase for the detoxification of LPS present at mucosal barriers. n. 2554683A, 10 jun. 2014.

BRETT, P. J.; DESHAZER, D.; WOODS, D. E. Note: *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 317-320, 1998.

BUROW, E. *et al.* Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*—A systematic review. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 4, p. 364-375, 2014.

BUTT, A.; KHAN, A. Antibiotics resistance of bacterial biofilms. **Middle East Journal of Business**, v. 55, n. 2473, p. 1-8, 2015.

BUTTERFIELD, D. A.; DALLE-DONNE, I. Redox proteomics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 11, p. 1487-1489, 2012.

CADAVID, E.; ECHEVERRI, F. The search for natural inhibitors of biofilm formation and the activity of the autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 49, 2019.

CAGNASSO, M. *et al.* ATR-FTIR studies of phospholipid vesicle interactions with α -FeOOH and α -Fe₂O₃ surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 2, p. 456-467, 2010.

CAHILL, B. K. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* O antigen loss alters the outer membrane protein composition and the selective packaging of proteins into secreted outer membrane vesicles. **Microbiological Research**, v. 180, p. 1-10, 2015.

CAMP JR, C. H.; CICERONE, M. T. Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering. **Nature Photonics**, v. 9, n. 5, p. 295-305, 2015.

CANNATELLI, A. *et al.* First detection of the mcr-1 colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 3257-3258, 2016.

CASSIN, E. K.; TSENG, B. S.. Pushing beyond the envelope: the potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 18, p. 10.1128/jb. 00050-19, 2019.

CASTILLO-ROMERO, K. F.; SANTACRUZ, A.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J. Production and purification of bacterial membrane vesicles for biotechnology applications: Challenges and opportunities. **Electrophoresis**, v. 44, n. 1-2, p. 107-124, 2023.

ÇELİK, P. A. *et al.* Bacterial membrane vesicle functions, laboratory methods, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 54, p. 107869, 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION *et al.* **Antibiotic Resistance Threats in The United States, 2019**. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention, 2019.

CHAKRABORTY, P. *et al.* Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 623-635, 2020.

CHAN, J. W. *et al.* Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 2, p. 648-656, 2006.

CHEN, Y.; CHENG, K. Advances of biological-camouflaged nanoparticles delivery system. **Nano Research**, v. 13, p. 2617-2624, 2020.

CHEN, Y. *et al.* Nanomaterials-based photothermal therapy and its potentials in antibacterial treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 328, p. 251-262, 2020.

CHEN, Z. *et al.* Bacterial outer membrane vesicles increase polymyxin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* while inhibiting its quorum sensing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 478, p. 135588, 2024.

CIOFU, O. *et al.* Chromosomal β -lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 9-13, 2000.

COOKE, A. C. *et al.* PQS-Induced outer membrane vesicles enhance biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **BioRxiv**, p. 2020.06. 15.153908, 2020.

COOKE, A. C. *et al.* *Pseudomonas* quinolone signal-induced outer membrane vesicles enhance biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Msphere**, v. 5, n. 6, p. 10.1128/msphere.01109-20, 2020.

COSTA, S.; DÉZIEL, E.; LÉPINE, F. Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 620-627, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CROXEN, M. A. *et al.* Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

CVJETKOVIC, A.; LÖTVALL, J.; LÄSSER, C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 23111, 2014.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 12, p. 3593-3596, 2000.

DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 163-176, 2011.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.

DAVIS, I. J. **Characterisation of Heavy Metal and Antibiotic-Resistance Genes in Oral Bacteria**. University of London, University College London (United Kingdom), 2003.

DE KRAKER, M. EA; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. **PLoS Medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

DE RIENZO, M. A. Díaz; MARTIN, P. J. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. **Current Microbiology**, v. 73, p. 183-189, 2016.

DE OLIVEIRA, V. E. *et al.* Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, n. 6, p. 642-650, 2010.

DE, S. N. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. **Nature**, v. 183, n. 4674, p. 1533-1534, 1959.

DINCER, S.; USLU, F. M.; DELIK, A. Antibiotic resistance in biofilm. In: **Bacterial Biofilms**. IntechOpen, 2020.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DOROFTE, R. About regulation (EU) 2019/6 of the European parliament and of the council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing directive 2001/82/EC: Art. 61: variations that do not require evaluation Art. 62 to 68: variations requiring evaluation. 2022.

DOS SANTOS RAMOS, M. A. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1179-1213, 2018.

DUBEAU, D. *et al.* *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-12, 2009.

DUPERTHUY, M. *et al.* Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003620, 2013.

DUTTA, B.; BANDOPADHYAY, R. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 75, 2022.

DUTTA, M. *et al.* Acid mine drainage in an Indian high-sulfur coal mining area: Cytotoxicity assay and remediation study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 389, p. 121851, 2020.

ELHENAWY, W.; DEBELYY, M. O.; FELDMAN, M. F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. **MBio**, v. 5, n. 2, p. 10.1128/mbio. 00909-14, 2014.

ELIAS, W. P.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). **Escherichia coli in the Americas**, p. 27-57, 2016.

ELLIS, T. N.; KUEHN, M. J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 81-94, 2010.

ELTAI, N. O. *et al.* Antibiotic resistance and virulence patterns of pathogenic *Escherichia coli* strains associated with acute gastroenteritis among children in Qatar. **BMC Microbiology**, v. 20, p. 1-12, 2020.

EPAND, R. F.; SAVAGE, P. B.; EPAND, R. M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 10, p. 2500-2509, 2007.

ESAM, B.; AL SAHLANEE, R. Cytotoxic Impact of outer membrane nanovesicles (OMVs) on ovarian cancer. **Bionatura**, v. 8, n. 4, p. 12023, 2023.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 281-298, 2012.

ETEBU, E.; ARIKEKPAR, I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. **Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res**, v. 4, n. 2016, p. 90-101, 2016.

EVANS, A. GL *et al.* Predatory activity of *Myxococcus xanthus* outer-membrane vesicles and properties of their hydrolase cargo. **Microbiology**, v. 158, n. 11, p. 2742-2752, 2012.

FERNÁNDEZ-BARAT, L.; TORRES, A. Biofilms in ventilator-associated pneumonia. **Future Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1599-1610, 2016.

FERREIRA, I. S. *et al.* Activity of daptomycin-and vancomycin-loaded poly-epsilon-caprolactone microparticles against mature staphylococcal biofilms. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4351-4366, 2015.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453-464, 2017.

FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FORIER, K. *et al.* Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 607-623, 2014.

FUX, C. A. *et al.* Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 1, n. 4, p. 667-683, 2003.

GAO, Y. *et al.* Potentials of nanotechnology in treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 213, p. 113056, 2021.

GARIDEL, P.; BLUME, A.; HÜBNER, W. A Fourier transform infrared spectroscopic study of the interaction of alkaline earth cations with the negatively charged phospholipid 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1466, n. 1-2, p. 245-259, 2000.

GAUGER, D. R. *et al.* Comparative FTIR-spectroscopic studies of the hydration of diphytanoylphosphatidylcholine and-ethanolamine. **Journal of molecular structure**, v. 614, n. 1-3, p. 211-220, 2002.

GBEJUADE, H. O.; LOVERING, A. M.; WEBB, J. C. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: A review. **Acta Orthopaedica**, v. 86, n. 2, p. 147-158, 2015.

GLASS, M. B. *et al.* *Burkholderia oklahomensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species formerly known as the Oklahoma strain of *Pseudomonas pseudomallei*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2171-2176, 2006.

GNIADCKA, M. *et al.* Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, n. 2-3, p. 125-129, 1997.

GOLLER, C. C.; ROMEO, T. Environmental influences on biofilm development. **Bacterial Biofilms**, p. 37-66, 2008.

GONZÁLEZ, J. F.; HAHN, M. M.; GUNN, J. S. Chronic biofilm-based infections: skewing of the immune response. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 3, p. fty023, 2018.

GRENIER, D.; MAYRAND, D. Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 111-117, 1987.

GUI, M. J. *et al.* Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 365-378, 2016.

GUMM, B. *et al.* Cell-based cytotoxicity and immunocytotoxicity assays for colchicine and ovine anti-colchicine sera and Fab fragments. **J Clin Toxicol**, v. 6, n. 323, p. 2161-0495.1000323, 2016.

GUPTA, P. *et al.* Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of Microbiology**, v. 198, p. 1-15, 2016.

GURUNATHAN, S.; CHOI, Y. J.; KIM, J. H. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1210, 2018.

GURUNATHAN, S. *et al.* Antibacterial and antibiofilm effects of *Pseudomonas aeruginosa* derived outer membrane vesicles against *Streptococcus mutans*. **Heliyon**, v. 9, n. 12, 2023.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HARPER, R. A. *et al.* Diminishing biofilm resistance to antimicrobial nanomaterials through electrolyte screening of electrostatic interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 392-399, 2019.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 1, p. 12-18, 2006.

HARRIS, C. B.; SHELBY, R. M.; CORNELIUS, P. A. Effects of energy exchange on vibrational dephasing times in Raman scattering. **Physical Review Letters**, v. 38, n. 24, p. 1415, 1977.

HASMAN, H. *et al.* Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 49, p. 30085, 2015.

HAURAT, M. F. *et al.* Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1269-1276, 2011.

HEBBELSTRUP JENSEN, B. *et al.* Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614-630, 2014.

HELD, K. *et al.* Determinants of extreme β -lactam tolerance in the *Burkholderia pseudomallei* complex. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 10.1128/aac.00068-18, 2018.

HEYDORN, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2395-2407, 2000.

HICKS, S.; CANDY, D. C.; PHILLIPS, A. D. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 11, p. 4751-4760, 1996.

HODIN, R. A.; MALO, M. S. Methods of reducing or inhibiting toxic effects associated with a bacterial infection using alkaline phosphatase. U.S. Patent n. 8,932,587, 13 jan. 2015.

HØIBY, N. *et al.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HORINOUCI, S. Cell-to-cell communications among microorganisms. **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**, v. 4, p. 283-337, 2010.

HORSTMAN, A. L.; KUEHN, M. J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 17, p. 12489-12496, 2000.

HUANG, D. B. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 99, n. 2, p. 383-389, 2004.

HUANG, W. *et al.* Bacterial outer membrane vesicles as potential biological nanomaterials for antibacterial therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 140, p. 102-115, 2022.

HUANG, W. *et al.* Development of novel nanoantibiotics using an outer membrane vesicle-based drug efflux mechanism. **Journal of Controlled Release**, v. 317, p. 1-22, 2020.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) Global burden of disease, 2018. Annual deaths from diarrheal diseases differentiated by age categories. Acessado no site <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases> no dia 29 de janeiro de 2020.

IONESCU, M. *et al.* Xylella fastidiosa outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 111, n. 37, p. E3910-E3918, 2014.

ISTIVAN, T. S.; COLOE, P. J. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p. 1263-1274, 2006.

JAN, A. T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1053, 2017.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124-4126, 1949.

JIN, L. *et al.* Antitumor effect of *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles on neuroblastoma in vitro and in vivo: Effect of *E. coli*-OMVs on neuroblastoma. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 54, n. 9, p. 1301, 2022.

JONES, R. R. *et al.* Raman techniques: fundamentals and frontiers. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, p. 1-34, 2019.

JOSHI, R. V.; GUNAWAN, C.; MANN, R. We are one: multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 635432, 2021.

KADURUGAMUWA, J. L.; BEVERIDGE, T. J. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 10, p. 2767-2774, 1996.

KADURUGAMUWA, J. L.; BEVERIDGE, T. J. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. **Microbiology**, v. 145, n. 8, p. 2051-2060, 1999.

KADURUGAMUWA, J. L.; BEVERIDGE, T. J. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 3998-4008, 1995.

KAMARUZZAMAN, N. F. *et al.* Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. **Materials**, v. 11, n. 9, p. 1705, 2018.

KAMEMOTO, L. E. *et al.* Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. **Applied Spectroscopy**, v. 64, n. 3, p. 255-261, 2010.

KAPARAKIS, M. *et al.* Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 372-385, 2010.

KASHIWAQUI, N. Y. *et al.* Atividade antibiofilme de micropartículas de óxido de zinco sintetizadas biologicamente. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 7, p. 22782-22796, 2023.

KHAN, F. *et al.* Phloroglucinol-gold and-zinc oxide nanoparticles: Antibiofilm and antivirulence activities towards *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Marine Drugs**, v. 19, n. 11, p. 601, 2021.

KHATOON, Z. *et al.* Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. **Heliyon**, v. 4, n. 12, 2018.

KHIDER, M. *et al.* Differential expression profiling of Δ litR and Δ rpoQ mutants reveals insight into QS regulation of motility, adhesion and biofilm formation in *Aliivibrio salmonicida*. **BMC Genomics**, v. 20, p. 1-18, 2019.

KIM, H. S. *et al.* Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies. **BMC Genomics**, v. 6, p. 1-13, 2005.

KIM, S. W. *et al.* Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5402, 2018.

KLIMENTOVÁ, J.; STULÍK, J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 170, p. 1-9, 2015.

KLIM, J. J.; GODLEWSKA, R. Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrz błonowych w konstrukcji szczepionek. **Postępy Mikrobiologii**, v. 56, n. 1, 2017.

KNOX, K.; VESK, M.; WORK, E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 92, n. 4, p. 1206-1217, 1966.

KNAPPE, T. A. *et al.* Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 34, p. 11446-11454, 2008.

KOCINCOVA, D.; LAM, J. S. Structural diversity of the core oligosaccharide domain of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, p. 755-760, 2011.

KONG, H.; HONG, X.; LI, X.. Current perspectives in pathogenesis and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 85, p. 44-49, 2015.

KOOIJMAN, E. E. *et al.* What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special?. **Biochemistry**, v. 44, n. 51, p. 17007-17015, 2005.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 4, p. a010306, 2013.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KRAFFT, C.; POPP, J. Micro-Raman spectroscopy in medicine. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 10, p. 20170047, 2019.

KRYSA, M.; SZYMAŃSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids—a review. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133430, 2022.

KRUGLIK, S. G. *et al.* Raman tweezers microspectroscopy of circa 100 nm extracellular vesicles. **Nanoscale**, v. 11, n. 4, p. 1661-1679, 2019.

KUHAR, N.; SIL, S.; UMAPATHY, S. Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 258, p. 119712, 2021.

KULP, A.; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual review of microbiology**, v. 64, n. 1, p. 163-184, 2010.

KWASI, D. A. *et al.* Antibiofilm agents with therapeutic potential against enteroaggregative *Escherichia coli*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 10, p. e0010809, 2022.

LAMBRECHT, E. *et al.* Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). **International Journal of Food Microbiology**, v. 311, p. 108357, 2019.

LAMIKANRA, A.; AKO-NAI, A. K.; OGUNNIYI, D. A. Transferable antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from healthy Nigerian school children. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 7, n. 1, p. 59-64, 1996.

LEEANSYAH, E. *et al.* Emerging role for MAIT cells in control of antimicrobial resistance. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 504-516, 2021.

LEE, J. H. *et al.* Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 29, n. 5, p. 491-499, 2013.

LE, H. *et al.* Antibody-conjugated nanocarriers for targeted antibiotic delivery: application in the treatment of bacterial biofilms. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 4, p. 1639-1653, 2021.

LEI, C. *et al.* Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 331, p. 416-433, 2021.

LERCH, T. Z. *et al.* Biofilm vs. planktonic lifestyle: Consequences for pesticide 2, 4-D metabolism by *Cupriavidus necator* JMP134. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 904, 2017.

LEVINE, M. M. *et al.* Diarrhoeal disease and subsequent risk of death in infants and children residing in low-income and middle-income countries: analysis of the GEMS case-control study and 12-month GEMS-1A follow-on study. **The Lancet Global Health**, v. 8, n. 2, p. e204-e214, 2020.

LEWIS, K. I. M. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LI, B. *et al.* Antimicrobial resistance and integrons of commensal *Escherichia coli* strains from healthy humans in China. **Journal of Chemotherapy**, v. 26, n. 3, p. 190-192, 2014.

LI, B. *et al.* Dissecting horizontal and vertical gene transfer of antibiotic resistance plasmid in bacterial community using microfluidics. **Environment International**, v. 131, p. 105007, 2019.

LI, H. *et al.* Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 199, p. 111502, 2021.

LIN, J. *et al.* A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14888, 2017.

LIN, J. *et al.* The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): not just for quorum sensing anymore. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 230, 2018.

LIU, B. *et al.* VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D912-D917, 2022.

LIU, J. *et al.* Graphene-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 286, p. 64-73, 2018.

LIU, Q. *et al.* Outer membrane vesicles derived from *Salmonella* Typhimurium mutants with truncated LPS induce cross-protective immune responses against infection of *Salmonella enterica* serovars in the mouse model. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 8, p. 697-706, 2016.

LIU, W. *et al.* Antimicrobial peptide Cec4 eradicates the bacteria of clinical carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilm. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1532, 2020.

LIU, X. *et al.* Genomics-guided discovery of thailanstatins A, B, and C As pre-mRNA splicing inhibitors and antiproliferative agents from *Burkholderia thailandensis* MSMB43. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 685-693, 2013.

LI, Y. *et al.* Drug-free and non-crosslinked chitosan scaffolds with efficient antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Carbohydrate polymers**, v. 241, p. 116386, 2020.

LI, Z.; CLARKE, A. J.; BEVERIDGE, T. J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5478-5483, 1998.

LOHSE, M. B. *et al.* Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.

LÓPEZ, C. *et al.* Protein determinants of dissemination and host specificity of metallo- β -lactamases. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3617, 2019.

LOWE, W. *et al.* PCR-based Methodologies Used to Detect and Differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis*. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 16, n. 1, p. 23-54, 2014.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 13, p. 2971-2981, 2013.

MACDONALD, K. L.; BEVERIDGE, T. J. Bactericidal effect of gentamicin-induced membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on Gram-positive bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 810-820, 2002.

MADALINA MIHAI, M. *et al.* Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1552-1576, 2015.

MAGAÑA, G. *et al.* Bacterial Outer Membrane Vesicles: Role in Pathogenesis and Host-Cell Interactions. **Antibiotics**, v. 13, n. 1, p. 32, 2023.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAJIGO, Mtebe Venance *et al.* Protocol for surveillance of antimicrobial-resistant bacteria causing community-acquired urinary tract infections in low-income countries. **Plos One**, v. 19, n. 5, p. e0304388, 2024.

MAL-ED NETWORK INVESTIGATORS *et al.* Relationship between growth and illness, enteropathogens and dietary intakes in the first 2 years of life: findings from the MAL-ED birth cohort study. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 4, p. e000370, 2017.

MANNING, A. J.; KUEHN, M. J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2011.

MANNO, D. E. *et al.* Surface architecture of *Neisseria meningitidis* capsule and outer membrane as revealed by atomic force microscopy. **Research in Microbiology**, v. 172, n. 6, p. 103865, 2021.

MAQUELIN, K. *et al.* Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 12-19, 2000.

MARCUS, M. A.; LEWIS, A. Resonance Raman spectroscopy of the retinylidene chromophore in bacteriorhodopsin (bR570), bR560, M412, and other intermediates: structural conclusions based on kinetics, analogs, models, and isotopically labeled membranes. **Biochemistry**, v. 17, n. 22, p. 4722-4735, 1978.

MARKWALTER, C. E. *et al.* Sustained release of peptides and proteins from polymeric nanocarriers produced by inverse Flash NanoPrecipitation. **Journal of Controlled Release**, v. 334, p. 11-20, 2021.

MASHBURN-WARREN, L.; MCLEAN, R. J. C.; WHITELEY, M. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. **Geobiology**, v. 6, n. 3, p. 214-219, 2008.

MASHBURN-WARREN, L. M.; WHITELEY, M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 839-846, 2006.

MASSOT, M. *et al.* Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. **Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 642-650, 2016.

MCCONOUGHIEY, S. J. *et al.* Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. **Future Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 987-1007, 2014.

MCINNES, R. S. *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 53, p. 35-43, 2020.

MELLO, T. P.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, André LS. Biofilms formed by *Scedosporium* and *Lomentospora* species: focus on the extracellular matrix. **Biofouling**, v. 36, n. 3, p. 308-318, 2020.

MONCELLI, M. R.; BECUCCI, L.; GUIDELLI, R. The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 6, p. 1969-1980, 1994.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365-376, 2017.

MULCAHY, L. R. *et al.* Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 23, p. 6191-6199, 2010.

MURPHY, K. *et al.* Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 7, p. 1306-1317, 2014.

MURZYN, K.; RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 2, p. 1091-1103, 2005.

MUSSI, V. *et al.* Raman mapping of biological systems interacting with a disordered nanostructured surface: A simple and powerful approach to the label-free analysis of single DNA bases. **Micromachines**, v. 12, n. 3, p. 264, 2021.

NDAYISHIMIYE, J. *et al.* Formulation technologies and advances for oral delivery of novel nitroimidazoles and antimicrobial peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 324, p. 728-749, 2020.

NELSON, R. E. *et al.* National estimates of healthcare costs associated with multidrug-resistant bacterial infections among hospitalized patients in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. Supplement_1, p. S17-S26, 2021.

NENE, R. *et al.* Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy: Recent advances and prospective in Analytical Method Development and Validation. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 17, n. 6, p. 2955-2958, 2024.

NGUYEN, T. *et al.* Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 225-233, 2008.

NGUYEN, T. V. *et al.* Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 816-819, 2005.

NILSSON, M. *et al.* The *dlt* genes play a role in antimicrobial tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 3, p. 298-304, 2016.

NJI, E. *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3372, 2021.

NORDIN, J. Z. Purification and biodistribution of extracellular vesicles. 2017. Tese de Doutorado. Karolinska Institutet (Sweden).

NOVEM, V. *et al.* Structural and biological diversity of lipopolysaccharides from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 10, p. 1420-1428, 2009.

OFIR, G.; SOREK, R. Vesicles spread susceptibility to phages. **Cell**, v. 168, n. 1, p. 13-15, 2017.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OJEDA, J. J. *et al.* In situ monitoring of the biofilm formation of *Pseudomonas putida* on hematite using flow-cell ATR-FTIR spectroscopy to investigate the formation of inner-sphere bonds between the bacteria and the mineral. **Mineralogical Magazine**, v. 72, n. 1, p. 101-106, 2008.

OKEKE, I. N. *et al.* Etiology of acute diarrhea in adults in southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4525-4530, 2003.

OKEKE, I. N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 5, p. 304-313, 2001.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OPINTAN, J. A. *et al.* Pediatric diarrhea in southern Ghana: etiology and association with intestinal inflammation and malnutrition. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 936, 2010.

ORENCH-RIVERA, N.; KUEHN, M. J. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 1525-1536, 2016.

PASQUA, M. *et al.* Modulation of OMV Production by the Lysis Module of the DLP12 Defective Prophage of *Escherichia coli* K12. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 369, 2021.

PASTERIS, Jill D.; BEYSSAC, Olivier. Welcome to Raman spectroscopy: successes, challenges, and pitfalls. **Elements**, v. 16, n. 2, p. 87-92, 2020.

PAULSSON, M. *et al.* Peptidoglycan-binding anchor is a *Pseudomonas aeruginosa* OmpA family lipoprotein with importance for outer membrane vesicles, biofilms, and the periplasmic shape. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 639582, 2021.

PEREIRA, A. L. *et al.* Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1-18, 2010.

PERRYMAN, A. L. *et al.* Naïve bayesian models for Vero cell cytotoxicity. **Pharmaceutical Research**, v. 35, p. 1-10, 2018.

POIREL, L. *et al.* Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 281, 2016.

POTTER, M. *et al.* Abiotic stressors impact outer membrane vesicle composition in a beneficial rhizobacterium: Raman spectroscopy characterization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21289, 2020.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RAHBAR, M.; DELDARI, M.; HAJIA, M. Changing prevalence and antibiotic susceptibility patterns of different *Shigella* species in Tehran, Iran. **The Internet J Microbiol**, v. 3, n. 2, 2007.

RAJU, B.; BALLAL, M. Multidrug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhoea in rural southern Indian population. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 2, p. 105-108, 2009.

RAMOS, G. P.; ROCHA, J. L.; TUON, F. F. Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e757-e761, 2013.

RATHER, M. A.; GUPTA, K.; MANDAL, M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-18, 2021.

REIMER, S. L. *et al.* Comparative analysis of outer membrane vesicle isolation methods with an *Escherichia coli* *tolA* mutant reveals a hypervesiculating phenotype with outer-inner membrane vesicle content. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 628801, 2021.

REISNER, A. *et al.* Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 5, p. 931-939, 2014.

RIBEIRO, J. M. *et al.* Comparative analysis of effectiveness for phage cocktail development against multiple *Salmonella* serovars and its biofilm control activity. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13054, 2023.

RIBEIRO, M.; MONTEIRO, F. J.; FERRAZ, M. P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 176-194, 2012.

RICHEL, H.; FOURNIER, P. E. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii* a major threat worldwide. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 645-646, 2006.

ROCHE, J. K. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) impairs growth while malnutrition worsens EAEC infection: a novel murine model of the infection malnutrition cycle. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 506-514, 2010.

ROQUE-BORDA, C. A. *et al.* Challenge in the discovery of new drugs: antimicrobial peptides against WHO-list of critical and high-priority bacteria. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 773, 2021.

RUKAVINA, Z.; VANIĆ, Ž. Current trends in development of liposomes for targeting bacterial biofilms. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 2, p. 18, 2016.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.

RUVALCABA-GÓMEZ, J. M. *et al.* Non-antibiotics strategies to control Salmonella infection in poultry. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 102, 2022.

SAEKI, E. K. *et al.* Subinhibitory concentrations of biogenic silver nanoparticles affect motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 656984, 2021.

SALYERS, A.I. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.

SANCHEZ, G. V. Core elements of outpatient antibiotic stewardship. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 65, 2016.

SCAVIA, Gaia *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 1141-1146, 2008.

SCHAAR, V. *et al.* *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3845-3853, 2011.

SCHAAR, V. *et al.* Outer membrane vesicles shield *Moraxella catarrhalis* β -lactamase from neutralization by serum IgG. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 3, p. 593-600, 2013.

SCHOOLING, S. R.; BEVERIDGE, T. J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5945-5957, 2006.

SCHRADER, S. M.; VAUBOURGEIX, J.; NATHAN, C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Sci Transl Med* 12: eaaz6992. 2020.

SCHULZ, E. *et al.* Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. **Journal of Controlled Release**, v. 290, p. 46-55, 2018.

SCHUSTER, K. C. *et al.* Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 22, p. 5529-5534, 2000.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605-619, 2015.

SEGNEANU, A. E. *et al.* **Organic Compounds FT-IR Spectroscopy**. Romania: InTech, 2012.

SEYEDSAYAMDOST, M. R. *et al.* Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. **Organic Letters**, v. 12, n. 4, p. 716-719, 2010.

SHAMIR, E. R. *et al.* Nitazoxanide inhibits biofilm production and hemagglutination by enteroaggregative *Escherichia coli* strains by blocking assembly of AafA fimbriae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1526-1533, 2010.

SHANE, A. L. *et al.* Infectious Diseases Society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 12, p. e45-e80, 2017.

SHARIATI, A. *et al.* Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 75-80, 2018.

SHARIF, E.; EFTEKHARI, Z.; MOHIT, E. The effect of growth stage and isolation method on properties of ClearColi™ outer membrane vesicles (OMVs). **Current Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1602-1614, 2021.

SHEIKH, J. *et al.* A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 9, p. 1329-1337, 2002.

SHRIVASTAVA, S. RB.; SHRIVASTAVA, P. S.; RAMASAMY, J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76-77, 2018.

SIDDIQUE, I. Md. Exploring Functional Groups and Molecular Structures: A Comprehensive Analysis using FTIR Spectroscopy. **Development**, v. 1, p. 2, 2024.

SINGH, A. N. *et al.* Identifying size-dependent toxin sorting in bacterial outer membrane vesicles. **BioRxiv**, 2023.

SINGH, S. *et al.* Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, p. 1-19, 2021.

STEINER, T. S. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

STEWART, P. S. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 3, p. 261-272, 1998.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.

STONE, N. *et al.* Raman spectroscopy for early detection of laryngeal malignancy: preliminary results. **The Laryngoscope**, v. 110, n. 10, p. 1756-1763, 2000.

SUH, J. W. *et al.* Characterization of the Outer Membrane Vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* Exhibiting Growth Inhibition against *Acinetobacter baumannii*. **Biomedicines**, v. 12, n. 3, p. 556, 2024.

TAGLIABUE, L. *et al.* The yddV-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 477-484, 2010.

TAHERI, N. *et al.* Accumulation of virulence-associated proteins in *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles at human body temperature. **Journal of Proteomics**, v. 195, p. 33-40, 2019.

TASHIRO, Y. *et al.* Interaction of bacterial membrane vesicles with specific species and their potential for delivery to target cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 571, 2017.

TASHIRO, Y.; TAKAKI, K.; FUTAMATA, H. Targeted delivery using membrane vesicles in prokaryotes. **Biophysics and Physicobiology**, v. 16, p. 114-120, 2019.

THAWAL, N. D. *et al.* Effect of a novel podophage AB7-IBB2 on *Acinetobacter baumannii* biofilm. **Current Microbiology**, v. 65, p. 66-72, 2012.

THORN, C. R. *et al.* Bacterial lipase triggers the release of antibiotics from digestible liquid crystal nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 319, p. 168-182, 2020.

TORRES CRIGNA, A. *et al.* Inter-laboratory comparison of extracellular vesicle isolation based on ultracentrifugation. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 48-59, 2021.

TORRES-VANEGAS, J. D. *et al.* Production and purification of outer membrane vesicles encapsulating green fluorescent protein from *Escherichia coli*: a step towards scalable OMV technologies. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1436352, 2024.

TOYOFUKU, M. *et al.* Composition and functions of bacterial membrane vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 7, p. 415-430, 2023.

TOYOFUKU, M. *et al.* Membrane vesicle-mediated bacterial communication. **The ISME Journal**, v. 11, n. 6, p. 1504-1509, 2017.

TOYOFUKU, M.; NOMURA, N.; EBERL, L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 13-24, 2019.

TUANYOK, A. *et al.* *Burkholderia humptydooensis* sp. nov., a new species related to *Burkholderia thailandensis* and the fifth member of the *Burkholderia pseudomallei* complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, p. e02802-16, 2017.

TULKENS, J. *et al.* Increased levels of systemic LPS-positive bacterial extracellular vesicles in patients with intestinal barrier dysfunction. **Gut**, v. 69, n. 1, p. 191-193, 2020.

TUON, F. F.; GORTZ, L. W.; ROCHA, J. L. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 351-356, 2012.

TURNER, L. *et al.* *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1466, 2018.

TZIPILEVICH, E.; HABUSHA, M.; BEN-YEHUDA, S. Acquisition of phage sensitivity by bacteria through exchange of phage receptors. **Cell**, v. 168, n. 1, p. 186-199. e12, 2017.

VAN DER POL, L.; STORK, M.; VAN DER LEY, P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 11, p. 1689-1706, 2015.

VAN OOSTEN, M. *et al.* Targeted imaging of bacterial infections: advances, hurdles and hopes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 892-916, 2015.

VAN NEDERVEEN, V.; MELTON-CELSA, A. Extracellular components in enteroaggregative *Escherichia coli* biofilm and impact of treatment with proteinase K,

DNase or sodium metaperiodate. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, p. 1379206, 2024.

VASILYEVA, N. V. *et al.* Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 15, p. 3827-3835, 2008.

VATANSEVER, F. *et al.* Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species–bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 955-989, 2013.

VEERACHAMY, S. *et al.* Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 228, n. 10, p. 1083-1099, 2014.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012.

VIAL, L. *et al.* *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5339-5352, 2008.

VIDAL, O. *et al.* Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2442-2449, 1998.

VORREGAARD, M. **Comstat2-a Modern 3D Image Analysis Environment for Biofilms**. 2008. Dissertação de Mestrado. Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

WANG, D. Y. *et al.* Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 872, 2020a.

WANG, H. *et al.* Mechanism of positive electret inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. **IET Nanodielectrics**, v. 6, n. 4, p. 282-289, 2023.

WANG, M.; NIE, Y.; WU, X. L. Extracellular heme recycling and sharing across species by novel mycomembrane vesicles of a Gram-positive bacterium. **The ISME Journal**, v. 15, n. 2, p. 605-617, 2021.

WANG, Y. *et al.* *Burkholderia thailandensis* outer membrane vesicles exert antimicrobial activity against drug-resistant and competitor microbial species. **Journal of Microbiology**, v. 58, p. 550-562, 2020b.

WANG, Y. *et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2021.

WATT, S. R.; CLARKE, A. J. Isolation, purification, and characterization of the major autolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 1054-1062, 1997.

WELIN-NEILANDS, J; SVENSATER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 17, p. 5633-5638, 2007.

WELLINGTON, E. MH *et al.* The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

WESSEL, A. K. *et al.* Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 213-219, 2013.

WILDERMAN, P. J. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 17, p. 4792-4799, 2002.

WILSON, S. A. *et al.* An exhaustive multiple knockout approach to understanding cell wall hydrolase function in *Bacillus subtilis*. **Mbio**, v. 14, n. 5, p. e01760-23, 2023.

WITWER, K. W. *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p. 20360, 2013.

WOOD, T. L. *et al.* Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* disperse the biofilms of sulfate-reducing bacteria. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance**. World Health Organization, 2014.

WU, J. *et al.* A method for isolation and proteomic analysis of outer membrane vesicles from fecal samples by LC-MS/MS. **Journal of Proteomics & Bioinformatics**, v. 12, n. 2, p. 38, 2019.

WU, Y.; SEYEDSAYAMDOST, M. R. Synergy and target promiscuity drive structural divergence in bacterial alkylquinolone biosynthesis. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 12, p. 1437-1444. e3, 2017.

XIONG, M. H. *et al.* Delivery of antibiotics with polymeric particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 63-76, 2014.

YANG, X. *et al.* Eradicating intracellular MRSA via targeted delivery of lysostaphin and vancomycin with mannose-modified exosomes. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 454-467, 2021.

YASHROY, R. C. Outer membrane vesicles of gram-negative bacteria: nanoware for combat against microbes and macrobes. In: **Nanostructures for Antimicrobial Therapy**. Elsevier, 2017. p. 341-367.

YE, X. *et al.* Theranostic platforms for specific discrimination and selective killing of bacteria. **Acta Biomaterialia**, v. 125, p. 29-40, 2021.

YODA, I. *et al.* Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2014.

ZHANG, J. *et al.* ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 4350965, 2016.

ZHANG, T. *et al.* Can nanoparticles and nano–protein interactions bring a bright future for insulin delivery?. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 3, p. 651-667, 2021.

ZHANG, X. F.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Biologically synthesized gold nanoparticles ameliorate cold and heat stress-induced oxidative stress in *Escherichia coli*. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 731, 2016.

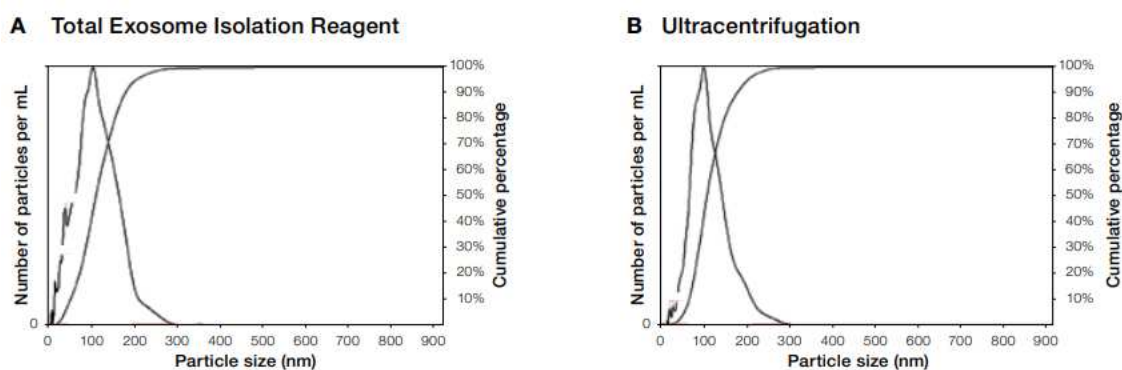
ZHANG, Y. *et al.* Plant cell wall hydrolysis process reveals structure–activity relationships. **Plant Methods**, v. 16, p. 1-10, 2020.

ZHAO, Z. *et al.* Regulation of the formation and structure of biofilms by quorum sensing signal molecules packaged in outer membrane vesicles. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 151403, 2022.

ZINGL, F. G. *et al.* Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. **MBio**, v. 12, n. 3, p. 10.1128/mbio.00534-21, 2021.

9 ANEXOS

Figura 9. Comparação da recuperação de células HeLa por meio do kit de isolamento de exossomos e por ultracentrifugação



Análise de exossomos recuperados do meio de células HeLa. (A) exossomos recuperados pelo uso do kit de isolamento e (B) exossomos recuperados pelo método de ultracentrifugação. Os perfis analisados pelo instrumento NanoSight LM10 demonstram que a maioria dos exossomos possuem tamanho entre 50-150 nm. Fonte: kit total exosome isolation reagent (invitrogen™)

Tabela 4. Macromoléculas de OMVs-UC identificadas por valores de deslocamento do Raman no laser de 532 nm por espectroscopia de micro-Raman

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição biológica	Referências
532	carotenoide	De Oliveira <i>et al.</i> , 2010
1509	carotenoide	De Oliveira <i>et al.</i> , 2010
1295	lipídios	Kruglik <i>et al.</i> , 2019

Tabela 5. Macromoléculas de OMVs-UC identificadas por valores de deslocamento do Raman no laser de 785 nm por espectroscopia de micro-Raman

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição biológica	Referências
641	tirosina	Stone <i>et al.</i> , 2000
641, 703 e 779	RNA/DNA	Manno <i>et al.</i> , 2021
703	lipídios e amida V	Kruglik <i>et al.</i> , 2019; Kuhar; Sil; Umapathy, 2021
779	timina	Mussi <i>et al.</i> , 2021

866	estrutura de polissacarídeo e fosfolipídios	Gniadecka <i>et al.</i> , 1997; Maquelin <i>et al.</i> , 2000; Kruglik <i>et al.</i> , 2019
939	proteínas	Kruglik <i>et al.</i> , 2019; Potter <i>et al.</i> , 2020
1096	carboidratos, DNA, proteínas e lipídios	Potter <i>et al.</i> , 2020; Chan <i>et al.</i> , 2006; Kruglik <i>et al.</i> , 2019
1165	fenilalanina, tirosina e ligações de lipídios C-C	Potter <i>et al.</i> , 2020
1239	amido III, bacteriorrodopsina e proteínas	Potter <i>et al.</i> , 2020; Manno <i>et al.</i> , 2021; Marcus; Lewis, 1978; Kruglik <i>et al.</i> , 2019
1322	C-N da amida III; adenina, guanina, tirosina, triptofano, lipídios e proteínas	Manno <i>et al.</i> , 2021; Potter <i>et al.</i> , 2020; Kamemoto <i>et al.</i> , 2010
1558	triptofano	Potter <i>et al.</i> , 2020

Tabela 6. Grupos funcionais de compostos orgânicos de OMVs-UC identificados pelos valores de absorção por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
839	C-C de alcanos, éster
1057	C-O de álcoois e fenóis; S=O (sulfóxido)
1140	C-O de álcool, éter e ácidos carboxílicos; C-N de aminas; C=S de tio-carbonila; P=O de óxido de fosfina e fosfato
1269	C-O de ácidos carboxílicos e éster; P=O de fosforamida
1422	S=O de sulfato
1523	C=C de aromático
1607	NH ₂ de aminas
2928	C-H de alcanos; O-H de ácidos carboxílicos

3334	O-H de álcool; N-H de aminas
------	------------------------------

Fonte: Segneanu *et al.*, 2012

Tabela 7. Grupos funcionais de compostos orgânicos de OMVs-Kit identificados pelos valores de absorção por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional
843	C-C de alcanos
961	N-O de óxido de amina
1060	S=O de sulfóxido
1060, 1112, 1148 e 1242	C-N de aminas
1278	C-O de ácidos carboxílicos
1342	S=O de ácido sulfônico
1467	C=C de aromático
1628	C=C de alcanos; C=O de amidas
2178	Si-H de silano
2696	(O=)PO-H de ácido fosfônico
2744	O-H de ácido carboxílico
2892	C-H de alcano
3337	O-H de álcool

Fonte: Segneanu *et al.*, 2012

Tabela 8. Resumo dos resultados de caracterização, atividade antibacteriana, atividade antibiofilme e ensaio de citotoxicidade

Análise	Resultados
Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	As OMVs-Kit apresentaram um diâmetro 2,83 vezes menor, quando comparadas às OMVs-UC.

Potencial Zeta	As OMVs-UC apresentaram uma carga de superfície quase 7 vezes mais negativa, quando comparadas às OMVs-Kit.
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	Foram observadas OMVs semelhantes em ambos os métodos, com diâmetro variando de 60 a 100 nm. Ademais, foram encontradas OMVs-Kit de menor diâmetro e densidade, resultando em dois padrões de vesículas por esse método de isolamento.
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	Foi constatado o formato bacilo de <i>B. thailandensis</i> , com comprimento de cerca de 2,5 µm, assim como foram observadas OMVs-Kit esféricas, com diâmetro de 60 a 100 nm. Não foi possível visualizar OMVs-UC.
Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	As OMVs-UC apresentaram diâmetro médio de 249 nm e concentração de $7,08 \times 10^8$ partículas/mL, enquanto as OMVs-Kit apresentaram diâmetro médio de 145,8 nm e concentração de $2,46 \times 10^8$ partículas/mL.
Espectroscopia de Micro-Raman	A análise não pôde ser realizada em OMVs-Kit. Em OMVs-UC, constatou-se a presença de carotenoides, material genético da célula progenitora, aminoácidos, proteínas e lipídios.
Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	Foram identificados em OMVs-UC e OMVs-Kit os grupos hidroxilas, nitro e halogênio. Também foram detectados em OMVs-UC, compostos aromáticos, grupo dióxido de enxofre, álcoois, fenóis ou grupo sulfóxido, e alquenos ou anéis aromáticos.
Ensaio de Gota-Difusão	Não houve inibição do crescimento

	bacteriano, mas foi observada uma redução da intensidade do crescimento.
Concentração Inibitória Mínima (CIM)	A CIM não foi encontrada, mas foi observada uma redução da turbidez do crescimento bacteriano na maior concentração de OMVs.
Concentração Bactericida Mínima (CBM)	A CBM não foi encontrada, visto que a CIM não pode ser determinada.
Contagem de Colônias	Houve a redução de quase 1 log no crescimento bacteriano após o tratamento com OMVs isoladas por ambos os métodos.
Ensaio de Inibição da Formação de Biofilme	OMVs-UC na concentração de $3,54 \times 10^8$ partículas/mL inibiu 95,86% da formação de biofilme de EAEC, enquanto OMVs-Kit na concentração de $1,23 \times 10^8$ partículas/mL resultou na inibição de 94,83% da formação de biofilme de EAEC.
Ensaio de Destruição de Biofilme Pré-Formado	OMVs-UC na mesma concentração do ensaio contra biofilme em formação, demonstraram ser capazes de reduzir 88,55% do biofilme pré-formado de EAEC, enquanto as OMVs-Kit na mesma concentração testada contra biofilme em formação, não demonstraram tanta eficácia, com redução de 62,52% do biofilme pré-formado.
Ensaio de Citotoxicidade	As vesículas obtidas por ambos os métodos demonstraram não apresentar efeito tóxico contra células VERO CCL-81.