



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Ciências Biológicas - UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

VICTOR HUGO MONTINI

AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE NANOPÁRTICULAS DE PRATA BACTERIOGÊNICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOFILME E ATIVIDADE UREOLÍTICA DE *Enterobacterales*

Londrina – Paraná
2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

VICTOR HUGO MONTINI

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL INIBITÓRIO
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
BACTERIOGÊNICAS SOBRE A PRODUÇÃO DE
BIOFILME E ATIVIDADE UREOLÍTICA DE
*Enterobacterales***

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Londrina
como um dos requisitos à obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Gerson Nakazato

Londrina – Paraná
2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Profa. Dra. Renata Kobayashi Takayama Katsuko
Me. Anastácia Nikolaos Deonas

Londrina, 03 de maio de 2024

DEDICATÓRIA

Dedico essa monografia à todos que depositaram a fé em mim. Dedico a meus
parentes, amigos e colegas de trabalho

AGRADECIMENTOS

Em ordem temporal, gostaria de agradecer a meus pais Márcia Máximo Ribeiro e Valdecir Montini por terem me incentivado ao longo de toda a minha vida e jamais terem feito eu me sentir que eu não era capaz de realizar qualquer feito.

Agradeço a todos os meus amigos da graduação, em especial ao Alisson, Carol, Dudu, Matheus e Pedrinho. Se eu estou aqui é porque a ajuda de vocês foi indispensável, principalmente durante nossos seminários. Ter me divertido com vocês será a primeira coisa que virá à minha cabeça quando me perguntarem “*o que havia de bom na sua graduação?*”.

Gostaria de agradecer à Prof. Dra. Lúcia Giuliano-Caetano e o Me. Luis Santana por terem me orientado durante minha breve estadia no Laboratório de Citogenética Animal e me introduzido no mundo da pesquisa. Jamais esquecerei de como foi difícil de visualizar e contar cromossomos de *Hypostomus topavae* e do infame episódio onde eu acidentalmente manchei o laboratório inteiro de nitrato de prata – o destino é curiosamente irônico, quem diria que anos depois eu iria trabalhar diretamente com o nitrato de prata...*e continuaria a me manchar com ele.*

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha por ter aberto as portas do Laboratório de Bacteriologia para mim e por ter permitido que eu me tornasse seu aluno de iniciação científica.

Gostaria de agradecer, do fundo do meu coração, a três pessoas que não foram apenas meus mentores, mas também grandes amigos pelo qual tive a sorte de trabalhar junto: o Me. Gustavo Henrique Migliorini Guidone, a Me. Luana Carvalho Silva e o Dr. Matheus Silva Sanches. Muito obrigado por terem me ensinado durante minha jornada de iniciação científica no Laboratório de Bacteriologia, por terem me incentivado enquanto pesquisador e, sobretudo, pelos diversos puxões de orelhas do qual hoje me fazem ser uma pessoa mais humilde e compreensiva não apenas com terceiros, mas comigo mesmo. Obrigado por terem me ensinado que está tudo bem errar e que ninguém precisa saber de tudo na ponta da língua de cor e salteado pois ninguém é uma Bíblia. Obrigado por terem feito meus anos no LABAC mais divertidos e coloridos, por todas as fofocas e conversas, e por, principalmente, terem me acolhido em momentos extremamente difíceis durante minha jornada na graduação. Também jamais esquecerei das nossas maravilhosas pausas para degustar um maravilhoso cafézinho ou um *tinows*.

Gostaria de agradecer a todos os integrantes do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada/NIP 3 por terem me auxiliado direto ou indiretamente desse meu trabalho, seja me oferecendo dicas ou me emprestando caldo Mueller-Hinton quando eu mais precisava. Embora todos tenham sido importante, gostaria de agradecer principalmente à Anastácia, Bruna Carolina, Débora Dahmer, Gabrielle, Giovana, Hellen, Jennifer, Lucas, Maria Luiza, Natália e Pedro.

Gostaria de agradecer ao Laboratório Multiusuário da UEL e ao Laboratório Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) por terem fornecido os equipamentos necessários para as análises.

E por fim, gostaria de agradecer ao amor e homem da minha vida, André Borges Ribeiro Filho. Não há palavras o suficiente para que eu possa expressar a gratidão que eu tenho por você. Desde o dia em que eu te conheci, não houve um dia sequer que eu não soubesse que eu era amado. Obrigado por ter ficado ao meu lado quando eu mais precisei, por ter sido minha base e alicerce, por te me levantando quando eu caía, enxugado minhas lágrimas quando eu só pensava em desistir, me incentivado e, sobretudo, por todos os “*eu te amo*” que aquecem meu coração.

“The mystery of life isn’t a problem to solve, but a reality to experience.”

Frank Herbert, Duna (1965)

RESUMO

A amônia (NH₃) é fundamental como fonte de nitrogênio para bactérias, mas sua toxicidade requer detoxificação em uréia para a manutenção a homeostase. A expressão da urease e sua atividade pode levar à alcalinização da urina em infecções do trato urinário (ITU), podendo gerar complicações como obstrução de cateteres e pielonefrite. Patógenos como *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii* são produtores de urease, exacerbando a condição patológica. Nanopartículas tem sido exploradas como inibidoras da urease e da formação de biofilme, mostrando-se como potencial solução na prevenção ou controle de ITUs e suas complicações. As nanopartículas de prata foram sintetizadas através do sobrenadante de *Escherichia coli* ATCC 25922, sendo caracterizadas através de UV-Vis, EDL, EEL e DRX. Cepas de *P. mirabilis* 7002 e *M. morganii* ATCC 8019 foram avaliadas quanto à sensibilidade, inibição de biofilme e inibição de atividade ureolítica em caldo urina pela prata. Os ensaios de caracterização demonstraram que as AgNP obtidas são na realidade nanopartículas de cloreto de prata (AgCl@NP), tendo demonstrado alta estabilidade, tamanho em nanoescala e alta atividade antibacteriana, com CIM de 62,5 µM e CBM 125 µM para as cepas utilizadas, alta atividade inibitória da formação de biofilme, inibindo 100% sua formação *in vitro*, e atividade inibitória sobre a atividade ureolítica. As AgCl@NP demonstraram baixa atividade hemolítica, implicando em baixa toxicidade para o hospedeiro. Por fim, as AgCl@NP obtidas apresentam-se como possíveis antimicrobianos para a prevenção da formação de biofilme cristalina por *P. mirabilis* e *M. morganii*, entretanto pesquisas futuras são necessárias para avaliar mais profundamente a eficácia antibiofilme e expor sua atividade antiurease

MONTINI, Victor Hugo. **Avaliação *in vitro* do potencial inibitório de nanopartículas de prata bacteriogênicas sobre a produção de biofilme e atividade ureolítica de Enterobacterales**. 2024. 72. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024

Palavras-chave: Biofilme; Inibição enzimática; *Proteaeae*; Síntese verde

ABSTRACT

Ammonia (NH₃) is crucial as a nitrogen source for bacteria, but its toxicity necessitates detoxification into urea to maintain homeostasis. Urease expression and activity can lead to urine alkalization in urinary tract infections (UTIs), potentially causing complications like catheter obstruction and pyelonephritis. Pathogens such as *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* are urease producers, exacerbating the pathological condition. Nanoparticles have been explored as urease and biofilm formation inhibitors, showing potential as a solution in preventing or controlling UTIs and their complications. Silver nanoparticles were synthesized using *Escherichia coli* ATCC 25922 supernatant and characterized via UV-Vis, EDL, EEL, and DRX. Strains of *P. mirabilis* 7002 and *M. morganii* ATCC 8019 were evaluated for sensitivity, biofilm inhibition, and ureolytic activity inhibition in urine broth by silver. Characterization assays showed that the obtained AgNPs are actually silver chloride nanoparticles (AgCl@NP), demonstrating high stability, nano-scale size, and high antibacterial activity, with MIC of 62.5 μM and MBC of 125 μM for the strains used, high inhibitory activity against biofilm formation, inhibiting 100% of its formation in vitro, and inhibitory activity on ureolytic activity. The AgCl@NPs showed low hemolytic activity, implying low toxicity to the host. Finally, the obtained AgCl@NPs appear as potential antimicrobials for preventing crystalline biofilm formation by *P. mirabilis* and *M. morganii*, however, further research is needed to more thoroughly evaluate antibiofilm efficacy and explore their antiurease activity.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Urease.....	13
2.1.1 Contexto histórico.....	13
2.1.2 Urease de <i>Proteus mirabilis</i>	14
2.1.3 Urease de <i>Morganella morganii</i>	15
2.1.4 Mecanismo de ação.....	15
2.1.5 Papel em patologias humanas.....	18
2.2 Biofilme.....	22
2.2.1 Estrutura do biofilme.....	22
2.2.2 Papel em uropatologias.....	25
2.2.3 Biofilme de <i>P. mirabilis</i> e <i>M. Morganii</i>	26
2.3 Nanopartículas de prata.....	30
2.3.1 Nanopartículas de prata.....	31
2.3.2 Métodos biológicos de síntese.....	35
2.3.3 Atividade antibacteriana.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Biossíntese de nanopartículas de prata.....	42
3.2 Caracterização das AgNP.....	42
3.2.1 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível.....	42
3.2.2 Espalhamento dinâmico e eletroforético da luz.....	42
3.2.3 Difração de raios-X.....	42
3.3 Cepas bacterianas.....	43
3.4 Atividade antibacteriana.....	43
3.4.1 Ensaio de microdiluição em caldo.....	43
3.5 Atividade antibiofilme.....	43
3.5.1 Inibição de crescimento em biofilme.....	43
3.6 Atividade antiureolítica.....	44
3.6.1 Inibição de atividade ureolítica.....	44
3.7 Biocompatibilidade.....	45
3.7.1 Hematotoxicidade frente a eritrócitos humanos.....	45

4. RESULTADOS.....	45
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A amônia (NH_3) é considerado o principal doador de nitrogênio no metabolismo bacteriano. Sua permeabilidade pela membrana celular e sua toxicidade em elevadas concentrações exigem sua detoxificação como manutenção da homeostase em organismos superiores, diminuindo a disponibilidade de NH_3 livre nos órgãos (Konieczna *et al.*, 2012; Paddapayil; Borger, 2023; Walker, 2014). Na ausência de NH_3 livre, tanto as bactérias da microbiota quanto as patogênicas competem por compostos doadores de nitrogênio com o hospedeiro e entre si, e a utilização de compostos nitrogenados menos usuais torna-se a diferença entre o sucesso ecológico ou a morte.

Nos animais ureotélicos, como o ser humano, NH_3 e sua forma protonada e mais encontrada no corpo humano à pH fisiológico, o íon amônio (NH_4^+), são detoxificados sob a forma de uréia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) pelo ciclo da ornitina (ou ciclo da uréia) no fígado, sendo excretada na urina, mas também sendo possível de ser encontrada no soro sanguíneo, suor e estômago (Konieczna *et al.*, 2012; Mobley; Hausinger, 1989; Paddapayil; Borger, 2023). A utilização de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ por bactérias requer a expressão da urease (uréia amidrohidrolase; EC 3.5.1.5), uma metaloenzima com centro de níquel capaz de catalisar a conversão de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ em NH_3 e ácido carbâmico (NH_2COOH) a qual é espontaneamente decomposto em NH_3 e CO_2 (Konieczna *et al.*, 2012; Mobley; Hausinger, 1989).

A expressão da urease nos órgãos do sistema urinário durante infecções do trato urinário (ITU) ocasiona a alcalinização da urina acima do pH de cristalização, onde há precipitação de sais de cálcio e magnésio (Jones *et al.*, 2005; Stickler, 2014), que associado à formação de biofilme pode gerar bloqueio do lúmen do cateter, urolitíase, pielonefrite aguda e condições mais críticas como pielonefrite enfisematosa, urosepse e hiperamonemia secundária à ITU, das quais podem resultar em sequelas ou na morte do paciente (Belyayeva; Jeong, 2022; Broomfield *et al.*, 2009; Mobley; Hausinger, 1989; Gorantla *et al.*, 2022; Ito *et al.*, 2023; Yohei; Takehiro; Ryusuke, 2018).

Dentre os patógenos bacterianos produtores de urease destacam-se principalmente *Proteus mirabilis*, o uropatógeno mais importante na obstrução de cateteres de demora e ITU associado a cateter e *Morganella morganii* (Nicolle, 2014;

Stickler, 2014).

Nesse quesito, a nanotecnologia tem se destacado no desenvolvimento e uso de nanopartículas com atividade antimicrobiana, de inibição enzimática e atividade antibiofilme, evidenciando seu potencial uso como estratégia na prevenção ou controle da evolução das ITU ou de patologias associadas através da inibição da urease ou da formação de biofilme (Kumar *et al.* 2023; Stickler, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Urease

2.1.1 Contexto

A urease (uréia amidrohidrolase; EC 3.5.1.5) é uma metaloenzima citoplasmática e multimérica capaz de hidrolisar $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ em NH_3 e CO_2 a uma taxa de 10^{14} vezes mais rápido que a reação não-catalisada (Balasubramanian; Ponnuraj, 2009; Konieczna *et al.*, 2012; Mobley; Hausinger, 1989).

É uma enzima de peso molecular variável, sendo praticamente ubíqua em todas as plantas (Hogan; Swift; Done, 1983; Polacco; Holland, 1993) e presente em diversos gêneros bacterianos dos filos Pseudomonadota, Bacillota, Fusobacteriota e Mycoplasmatota (Krajewska, 2009; Mekonnen *et al.*, 2021). Embora as ureases fúngicas e vegetais apresentem estrutura homohexamérica e ureases bacterianas multímeros de complexos com duas ou três subunidades, as ureases dos diferentes domínios apresentam alta similaridade, sugerindo estrutura primária conservada e mecanismos catalíticos iguais (Balasubramanian; Ponnuraj, 2009; Krajewska, 2009). Historicamente, em 1926 James Batcheller Sumner cristalizou e purificou, pela primeira vez, uma enzima ureolítica, obtida a partir de extratos de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e acetona fria, tendo sido um feito descreditado pela maioria dos bioquímicos da época (Kappaun *et al.*, 2018; Real-Guerra; Stanisçuaski; Carlini, 2013; Sumner, 1926). Segundo a Fundação Nobel (1964), a descoberta do método de cristalização de enzimas e a demonstração da natureza proteica da urease purificada levou à laureação de James B. Sumner com o prêmio Nobel de química em 1946, juntamente de John Howard Northrop e Wendell Meredith Stanley, ambos também laureados pela purificação de enzimas e proteínas virais.

Embora as pesquisas envolvendo a urease purificada só tenham ocorrido após

1926, as pesquisas com $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e a urease não purificada datam desde 1773, quando Hillaire M. Rouelle descobriu a $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (Kappaun *et al.*, 2018;Krajewska, 2009). Nos anos seguintes, em 1798, Antoine François de Fourcroy e Louis Nicolas Vauquelin descobrem que o NH_3 presente na urina provém do processo de “fermentação” de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Em 1828, Friedrich Wöhler sintetizou inorganicamente $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ a partir de diversas reações químicas utilizando cianato de amônia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) em um processo atualmente denominado síntese de Wöhler (Kappaun *et al.*, 2018; Krajewska, 2009). Em 1864, van Tiehem isolou o primeiro microrganismo ureolítico, o *Micrococcus ureae* (Kappaun *et al.*, 2018; Krajewska, 2009). Em 1874, o químico francês Frédéric Alphonse Musculus extrai, pela primeira vez, uma enzima ureolítica de urina pútrida, sendo posteriormente nomeada "urease" como proposto por Miquel em 1890 (Kappaun *et al.*, 2018; Krajewska, 2009). Futuramente, a descoberta da urease nas sementes da soja (*Glycine max*) por Takeuchi levaram à pesquisas que culminaram no desenvolvimento da enzimologia e nos estudos que levaram à confirmação das observações de Michaelis e Menten envolvendo taxas de reações enzimáticas e substrato (Real-Guerra; Stanisçuaski; Carlini, 2013; Van Slyke; Cullen, 1914). Um melhor entendimento do mecanismo catalítico da urease somente foi obtido em 1975, através dos estudos de inibição da urease de *Glycine max* com fosforamidatos realizados por Dixon e colaboradores (1975) que não apenas demonstraram que o sítio catalítico contém íons níquel como também demonstraram sua essencialidade para atividade catalítica da urease.

2.1.2 Urease de *Proteus mirabilis*

Cerca de 4 a 5,4 kb de DNA cromossomal são necessários para codificar a apoenzima urease de 253-322 kDa de *Proteus mirabilis*, uma enzima citoplasmática composta pelas subunidades estruturais UreA, UreB e UreC que se montam em homotrímeros de heterotrímeros em uma conformação do tipo $(\alpha\beta\gamma)_3$ (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Jones; Mobley, 1987). A enzima é cataliticamente ativa e funcional, *i.e.*, torna-se holoenzima, quando íons Ni^{2+} são incorporados na subunidade UreA por meio das proteínas acessórias UreD, UreE, UreF e UreG (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018). O fornecimento do níquel divalente é realizado principalmente pela UreE que contém uma cauda de histidina que possibilita o carregamento de Ni^{2+} (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018).

Embora a constante de Michaelis (K_m) da urease de *P. mirabilis* seja relativamente alta, de 13-60 mM de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, a urease de *P. mirabilis* funciona a V_{max} na urina humana, que contém ~400 mM de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, liberando 35-55 μmol de $\text{NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, o que representa uma atividade 6 a 25 vezes mais rápido que de outras espécies da tribo *Proteeae*, fornecendo uma possível explicação da maior frequência de desenvolvimento de urolitíase por *P. mirabilis* do que por *M. morganii* (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Jones; Mobley, 1987; Krajewska, 2009).

Geneticamente, o operon responsável pela expressão da urease de *P. mirabilis* é o operon *ureRDABCEFG*. Historicamente, o operon *ure* foi caracterizado a partir de um fragmento de DNA de *P. mirabilis* HI4320, com 7,6 kb e contendo seis fases de leitura aberta que codificavam seis polipeptídeos: UreD de 31 kDa, UreA de 11 kDa, UreB de 12,2 kDa, UreC de 61 kDa, Ure de, 17,9 kDa e UreF de 23 kDa (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018). Trabalhos posteriores revelaram a presença de um sétimo gene do operon, o *ureG*, que codifica o polipeptídeo UreG, necessário para a formação da apoenzima, e um oitavo gene, o *ureR*, que codifica UreR, um polipeptídeo de 33,4 kDa que atua como um ativador transcricional positivo tipo AraC/XylS responsável pela regulação positiva induzível do operon (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Coker; Bakare; Mobley, 2000; Dattelbaum *et al.*, 2003; Island; Mobley., 1995).

Na ausência do UreR, e portanto não havendo expressão do operon, proteínas estruturantes de nucleóide semelhante a histona repressora de gene (H-NS) encontram-se ligadas em uma sequência nucleotídica intergênica localizada entre *ureR* e *ureD*, 16 pb à montante do promotor do tipo σ^{70} do gene *ureR*, inibindo sua expressão (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Coker; Bakare; Mobley, 2000; Dattelbaum *et al.*, 2003; Island; Mobley., 1995). Na ausência de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e a 25 °C, a ligação por H-NS no sítio intergênico é favorecida, reprimindo a expressão do operon *ureRDABCEFG*. Na presença de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e à 37° C, a repressão de *ureR* pelo H-NS é aliviada, favorecendo a transcrição constitutiva do gene, expressando UreR que, formando dímeros de UreR-UreR, liga-se na região intergênica *ureR-ureD*, ativando a expressão do operon (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Coker; Bakare; Mobley, 2000; Poore; Mobley, 2003).

2.1.3 Urease de *Morganella morganii*

A urease citoplasmática de *M. morganii*, além de possuir maior afinidade por $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, com K_m de 0.7-0.8 mM, também é a de maior peso molecular dentre as ureases da tribo *Proteeae*, com peso molecular de 590-712 kDa e atividade de 0,4 μmol de $\text{NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Hu *et al.* 1990; Jones; Mobley, 1987; Young; Amid; Miller, 1996)

Estruturalmente, é composta por três subunidades estruturais com peso molecular de 63, 15 e 6 kDa em uma configuração de homotrímeros de heterotrímeros $(\alpha\beta\gamma)_3$.

O operon responsável pela urease de *M. morganii* é o operon *ureABCEFGD*, que não dispõe de um ativador transcricional como o operon *ureRDABCEFG* de *P. mirabilis*, sendo um operon constitutivamente expresso e não induzível (Chen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016).

A diferença genética entre ambos os operons também foi evidenciada por Hu e colaboradores (1990) que não observaram hibridização entre os *primers* de genes de urease de *Proteus* e *Providencia* com *Morganella*. Posteriormente, trabalhos como o de Young, Amide e Miller (1996) e Chen e colaboradores (2012) demonstraram que urease de *M. morganii* possui maior homologia com a urease de *Yersinia pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* tanto em nível nucleotídeo quanto de aminoácidos.

2.1.4 Mecanismo de ação

A proposta de mecanismo de reação de hidrólise de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ pela urease atualmente aceita é o mecanismo da “ponte de hidróxido”, descrito por Benini, Rypniewski e Wilson (1999), a qual descreve que a hidrólise de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ em NH_3 e NH_2COOH provém da ação nucleofílica da ponte de hidróxido que interliga ambos íons níquel e do resíduo de $\alpha\text{His}323$ que estabiliza a carga positiva formada pelo estado de transição e auxilia na liberação de NH_3 .

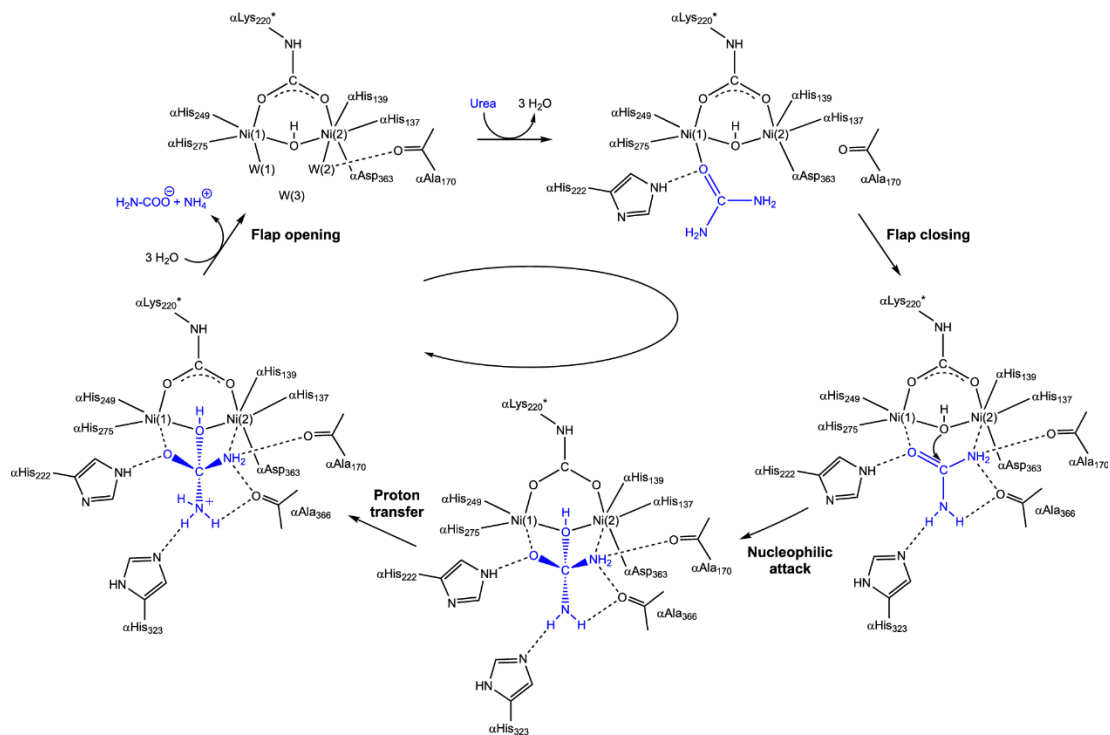
Para a entrada do substrato no sítio ativo da holoenzima, é necessário que a urease esteja com sua aba móvel (ou *flap*) em conformação aberta. Ao entrar no sítio ativo, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ substitui as moléculas de água W(1), W(2) e W(3) anteriormente ligadas aos íons níquel, ligando-se com o íon Ni(1) e com o grupamento -NH do resíduo de $\alpha\text{His}222$ através do oxigênio de sua carbonila.

Com a mudança conformacional do *flap* para fechado, o movimento de αHis323 do *flap* força o grupamento $-\text{NH}_2$ de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ a se aproximar de $\text{Ni}(2)$, gerando uma ligação bidentada estabilizada pela ligação entre $-\text{NH}_2$ e oxigênio da carbonila do resíduo de αAla366 e entre $-\text{NH}_2$ e oxigênio do resíduo de αAla170 que juntos aumentam a basicidade de Lewis do grupamento $-\text{NH}_2$ da $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, possibilitando que, em decorrência dessa assimetria de resíduos, os resíduos mais próximos de $\text{Ni}(1)$ tornam-se doadores de ligações de hidrogênio e àqueles próximos a $\text{Ni}(2)$ tornam-se aceptores dessas ligações.

A polarização entre as interações C-O e C-NH₂ de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ levam à aproximação do átomo de carbono de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ à ponte de hidróxido-níquel, que realiza um ataque nucleofílico, gerando uma ligação C-O entre o carbono de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e o oxigênio da ponte de hidróxido-níquel, formando um estado de transição tetraédrico cuja clivagem se dá pela transferência de um próton a partir do grupamento carboxilato de αAsp363 .

Após a transferência do próton, ocorre a abertura do *flap*, liberando NH_3 , NH_2COOH e permitindo a entrada de 3 moléculas de água. O NH_2COOH sofre um processo de decomposição espontânea, liberando NH_3 e CO_2 . O NH_3 produzido, em pH biológico, é então protonado formando NH_4^+ (figura 1).

Figura 1 – Mecanismo de ação da urease proposto por Benini e colaboradores (1999).



Fonte: Mazzei, Musiani e Ciurli (2020)

2.1.5 Papel em patologias humanas

A toxicidade da urease e processos patológicos associados à sua atividade se dá tanto pela alcalinização do meio quanto pela toxicidade associada ao NH_3 , ambos interferindo na homeostase do hospedeiro. Essa interferência está associada a quadros clínicos que variam a depender do sítio da infecção, atividade da urease e propriedades do patógeno.

Dentre os quadros clínicos associados à produção da urease encontra-se a urolitíase e bloqueio de cateter urinário, contribuindo diretamente na patogênese e mortalidade de pielonefrite, encefalopatia hepática, coma hepático e úlcera péptica (Konieczna *et al.*, 2012; Mobley; Hausinger, 1989; Rokita *et al.*, 1998).

A urina humana é um líquido que contém sais inorgânicos, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, sais orgânicos e outros compostos orgânicos, encontrando-se em um estado de estabilidade em relação a solubilidade de seus compostos (Rose *et al.*, 2015). Normalmente, a urina é levemente ácida em razão da atividade metabólica, com pH variando entre 5,5 a 6,5, todavia sua alcalinização ($\text{pH} > 7$), na maioria dos casos em decorrência do crescimento de microrganismos produtores de urease em função

clivagem de $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ em NH_3 , pode ocasionar a precipitação de ânions e cátions polivalentes dissolvidos na urina sob a forma de estruvita ($\text{MgNH}_4(\text{PO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$) e apatita carbonatada [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$], dando início a urolitíase (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Milani; Jialal, 2023; Stickler, 2014).

Durante a bacteriúria, *P. mirabilis* se adere ao cateter e se multiplica, formando biofilme sobre sua superfície externa ou interna. A subsequente expressão e atividade ureolítica ocasiona a precipitação de cristais que ligam-se à matriz polimérica do biofilme, formando um biofilme cristalino que não apenas protege a população bacteriana do sistema imune como também de antimicrobianos (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Flores-Mireles *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2005; Wilks; Fader; Keevil, 2015). Poucos são os estudos patofisiológicos a respeito das ITU e urolitíases ocasionadas por *M. morganii*, todavia é sabido que sua urease está relacionada à formação de cálculos de xantina, estruvita e apatita carbonatada (Jung *et al.*, 2023; Hu *et al.* 1990).

A produção de cálculos durante uma bacteriúria em pacientes cateterizados pode ocasionar incrustação do instrumento e o bloqueio de seu lúmen, sendo *P. mirabilis* o principal responsável pelo bloqueio de cateter em infecções do trato urinário associados à cateter urinário (ITU-AC).

O bloqueio do lúmen do cateter e conseqüentemente o bloqueio da urina ocasionam o refluxo da urina infectada para os rins, podendo levar a progressão do quadro clínico para pielonefrite (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Ao ascender para os rins, *P. mirabilis* e *M. morganii* podem ocasionar a pielonefrite e induzirem a alcalinização da urina nesse sítio. Os solutos, sob alcalinidade, precipitam sob formas cristalinas e iniciam um processo de nucleação e agregação, cuja explicação pode ser dada por suas teorias: a teoria de partículas livres, cuja mecanismo de agregação e crescimento se dá pela agregação dos cristais no interior dos túbulos renais, e a teoria das partículas fixadas, onde os cálculos formados se ligam às placas de Randall calcificadas, localizadas no interstício medular (Ratkalkar; Kleinman, 2011; Thakore; Liang, 2023). Após seu crescimento, os cálculos podem migrar e obstruir a passagem da urina em três localidades: próximo a junção ureteropélvica, em razão do diâmetro estreito, no cruzamento das ureteres sobre as veias ilíacas e na junção ureterovesical. O bloqueio do fluxo da urina gera uma tensão

luminal e hidronefrose, ocasionando a clássica cólica renal da urolitíase (Ratkalkar; Kleinman, 2011; Thakore; Liang, 2023). Os subsequentes danos teciduais ocasionados pelas toxinas e cristais possibilitam a bacteremia pela via hematogênica, com bactérias adentrando tanto a artéria renal quanto a veia renal (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

As ITU ocasionadas por *P. mirabilis* tendem a ser mais severas que aquelas ocasionadas por *M. morganii*, como evidenciado por Pearson e colaboradores (2011) que demonstraram que a atividade da urease e o processo de incrustação de cateter durante uma ITU por *P. mirabilis* induzia uma cistite mais severa. Também utilizando modelo murino, Gué e colaboradores (2001) demonstraram que *P. mirabilis* é a única espécie que causa alta incidência de cálculo renal em modelo murino, ocasionando maior lesão renais e cálculos renais que outras espécies produtoras de urease como *M. morganii*.

A importância da urease para a uropatogenicidade de *P. mirabilis* também foi evidenciada por Johnson e colaboradores (1993) que, utilizando um modelo murino de ITU ascendente com camundongos CBA/J, demonstraram que cepas mutantes de *ureC* possuíam uma dose infectante 50% (DI₅₀) maior, de 2.7×10^9 UFC, que as cepas selvagens possuíam, de 2.2×10^6 UFC, impactando tanto na persistência de *P. mirabilis* no trato urinário quanto nas patologias renais mais severas, com menor desenvolvimento de inflamação aguda, necrose tubular, pielonefrite aguda, inflamação intersticial aguda e abscessos em camundongos por parte das cepas mutantes.

A urease e o biofilme são um dos mecanismos de patogenicidade associados ao aumento da morbidade e mortalidade das ITU-AC, bem como tornarem-na a segunda principal causa etiológica de bacteremias secundárias à ITU (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Outra condição clínica associada à atividade ureolítica no sistema urinário são as manifestações de encefalopatias portossistêmicas como a hiperamonemia encefalopática, caracterizadas por alterações neurológicas e psicológicas causadas pelos elevados níveis de NH₃ no plasma (Ali; Nagalli, 2023; Gorantla *et al.*, 2022; Mobley; Hausinger, 1989; Mun *et al.*, 2021; Norenberg; Rao; Jayakumar, 2005).

Embora a etiologia mais comum sejam as desordens do ciclo da ornitina, cirrose hepática e uso de medicamentos, as causas não-hepáticas incluem uropatias

obstrutivas ocasionadas por infecções do trato urinário (ITU) (Gorantla *et al.*, 2022; Mun *et al.*, 2021).

Durante uma ITU obstrutiva, a estagnação da urina gera uma pressão intravesical, possibilitando a transferência de NH_3 para o plexo venoso vesical e circulação peri-vesical, aumentando os níveis séricos de NH_3 e ocasionando a condição de hiperamonemia, condição que possui alta mortalidade e morbidade mesmo na ausência de doenças hepáticas (Gorantla *et al.*, 2022).

O NH_3 presente na corrente sanguínea atravessa a barreira hematoencefálica, levando à hiperprodução de glutamato pelos astrócitos na tentativa de detoxificação da NH_3 (Gorantla *et al.*, 2022; Norenberg; Rao; Jayakumar, 2005). A hiperprodução de glutamato resulta na ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NDMA), um receptor ionotrópico que controla um canal iônico controlado por ligante. A ativação de receptores NDMA diminui a fosforilação da proteína quinase C, ativando canais Na/K-ATPase que levam à depleção de ATP (Ali; Nagalli, 2023; Jewett; Thapa, 2022).

Concomitante à depleção de ATP, a hiperprodução do glutamato, o estresse oxidativo, aumento da captação de piruvato, lactato, glutamina e diminuição da captação de corpos cetônicos, glutamato e glicose livre ocasiona inchaço dos astrócitos, ocasionando em edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e possivelmente herniação cerebral (Ali; Nagalli, 2023; Jayakumar, 2005; Norenberg; Rao).

Além das patologias no sistema urinário, a ação da urease em sítios como o trato gastrointestinal pode ocasionar doenças como a úlcera péptica, uma doença caracterizada pela descontinuidade do revestimento interno podendo se estender até a camada *muscularis propria* do epitélio gástrico, sendo uma condição que normalmente ocorre no estômago ou duodeno proximal e raramente o esôfago menor, duodeno distal ou jejuno (Baj *et al.*, 2020; Malik; Gnanapandithan; Singh, 2023; Mobley; Hausinger, 1989)

Com uma urease citoplasmática com atividade em pH de 2.5 a 6.5, *Helicobacter pylori* é capaz de neutralizar a acidez gástrica, possibilitando a colonização desse sítio e o desenvolvimento da ulceração péptica (Baj *et al.*, 2020; Malik; Gnanapandithan; Singh, 2023; Mobley; Hausinger, 1989).

Embora nenhuma das duas bactérias testadas neste trabalho estejam associadas à essa doença, os resultados obtidos por Young, Amid e Miller (1996) demonstraram que a urease de *M. morganii* é capaz de hidrolisar uréia em taxas

significativamente maiores sob condições acídicas, funcionando a pH ótimo (pH externo) de 2.0, possibilitando sua sobrevivência durante a passagem pelo estômago.

2.2 BIOFILME

2.2.1 Estrutura do biofilme

O biofilme é um dos modos de vida mais distribuído e bem-sucedidos adotado pelos microrganismos. É sistema complexo, de alta densidade celular (10^8 a 10^{11} g de células/peso úmido) e que coloniza, praticamente, todos os organismos superiores, podendo estar associado a infecções persistentes em plantas, humanos e contaminação de implantes e outros dispositivos médicos (Flemming *et al.*, 2016; Kwiecinska-Piróg *et al.*, 2014). O biofilme pode ser definido como uma comunidade de células microbianas ligadas à uma superfície e embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) autoproduzidas (Flemming *et al.*, 2016; Karygianni *et al.*, 2020; Lila *et al.*, 2023).

A matriz de SPE confere ao biofilme sua organização espacial (“*scaffold*”), gerando estratificações de macro e micronutrientes e, conseqüentemente, uma heterogeneidade metabólica e fenotípica das células residentes (Flemming *et al.*, 2016; Karygianni *et al.*, 2020). As SPE são composta de exopolissacarídeos, ácidos nucleicos (eDNA eRNA), proteínas, lipídeos e, majoritariamente e invariavelmente, água (tabela 1), conferindo à essa complexa estrutura suas propriedades reológicas, mecânicas e biológicas (Flemming *et al.*, 2016; Karygianni *et al.*, 2020; Kwiecinska-Piróg *et al.*, 2014).

A matrixoma do biofilme, *i.e.*, o inventário de biomoléculas do biofilme, sua diversidade molecular, estrutural, funcional, propriedades físico-químicas e virulentas, é composto principalmente de biomoléculas associadas à superfície celular, como flagelos, apêndices e amilóides funcionais que modulam adesão bacteriana, sua estabilidade mecânica e respostas autoimunes, e também por moléculas secretadas extracelularmente e que compõem o EPS, cuja variação de sua composição depende não apenas do microrganismo como também da tensão de cisalhamento local, disponibilidade de determinados substratos e ambiente do hospedeiro (Karygianni *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Classes de biomoléculas que compõem o EPS e suas respectivas funções dentro do biofilme.

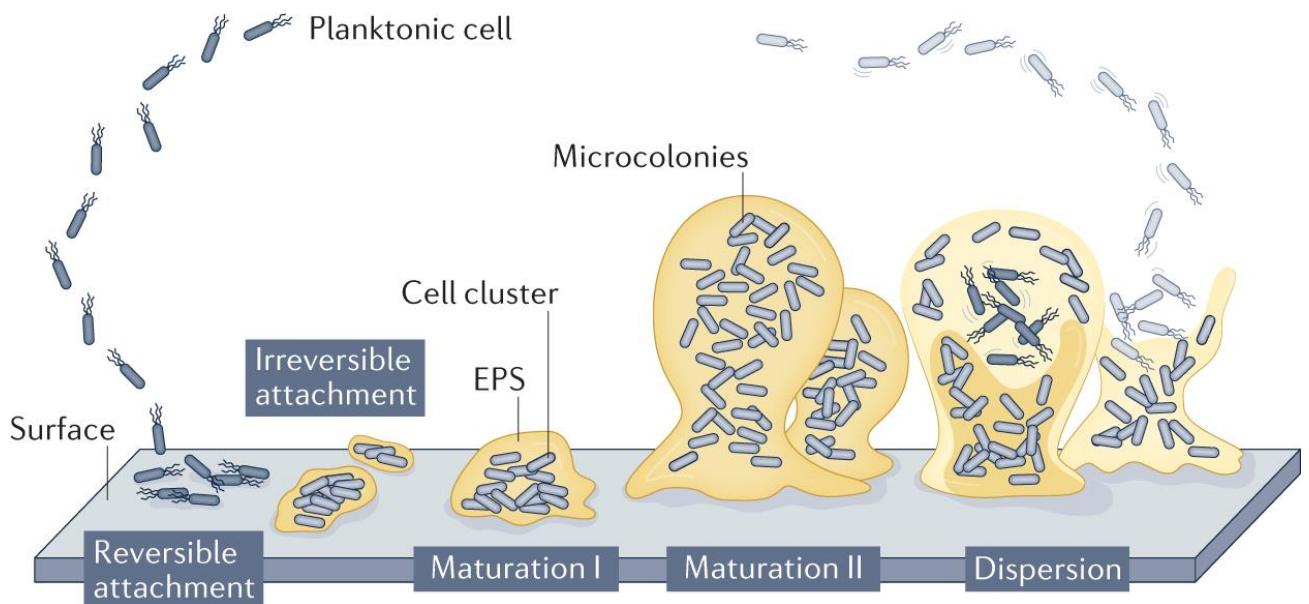
Classe	Função
Polissacarídeos	Adesão, coesão, estruturação, sorção, nutriente, proteção contra antimicrobianos, ambiente e sistema imune, ligação célula-a-célula e retenção de água.
Proteínas	Adesão, ligação célula-a-célula, evasão da resposta imune, motilidade pulsante, detecção mecânica, toxicidade e degradação do EPS.
Ácidos nucleicos	Adesão, coesão, fonte de nutriente, estruturação, reparo de dano no DNA, transferência de genes e interação com outros componentes da matriz.
Lipídeos	Adesão, coesão, proteção e evasão ao sistema imune.
Lipopolissacarídeos	Adesão, colonização, invasão do hospedeiro e ativação do sistema imune.

Fonte: elaborado pelo autor com base em KARYGIANNI *et al.*, 2020

O modelo de formação de biofilme amplamente utilizado é o modelo dos cinco estágios, descrito originalmente com base em investigação sobre a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse modelo, a formação de biofilme é constituída em cinco estágios: I) estágio de adesão reversível, onde células planctônicas ligam-se ao substrato por interações hidrofóbicas, eletrostáticas e forças de Van der Waals, sendo uma etapa facilmente afetada pelo meio de cultura, pH, temperatura, presença e concentração de solutos; II) estágio de ligação irreversível, mediado principalmente pelas interações das adesinas bacterianas ao substrato; III)

estágio de maturação I, ou de desenvolvimento inicial, onde ocorre o aumento da população sobre o substrato, acionando mecanismos de *quorum sensing* que ocasionam aumento da produção e secreção de polissacarídeos extracelulares e outros componentes da matriz do biofilme; IV) o estágio de maturação II, ou apenas estágio de maturação, com crescimento tridimensional da biomassa do biofilme, que passa a ser formada por células fenotipicamente persistente, sendo uma etapa de difícil erradicação e V) estágio de dispersão, onde o biofilme, por ação de enzimas ou outros mecanismos bacterianos, libera as células embebidas em forma de células planctônicas ou de microcolônias, que podem migrar para outro sítio, iniciando a formação de um novo biofilme (Lila *et al.*, 2023 Sauer *et al.*, 2022) (figura 2).

Figura 2 – Modelo dos cinco estágios de formação do biofilme tendo como modelo *P. aeruginosa*.



Fonte: Saur e colaboradores (2022)

Embora seja um modelo amplamente utilizado para descrever a formação de biofilme, o modelo das 5 etapas vem sendo criticado por suas limitações conceituais. Para Sauer e colaboradores (2022), essas limitações incluem a falta de classificação de estruturas estáticas formadas por outras bactérias que não *P. aeruginosa* como biofilmes, a não captura, pelo modelo, da variedade de arquitetura de biofilme em sistemas *in natura*, como tapetes microbianos, a não incorporação da diversidade dos mecanismos de agregação e desprendimento e a consideração da sucessão de

eventos em biofilmes que desenvolvem-se em sistemas abertos com influxo contínuo de novos colonizadores.

Como alternativa, Sauer e colaboradores (2022) propuseram um modelo de 3 estágios, composto da I) fase de agregação e ligação, onde as bactérias se agregam umas às outras ou se ligam à superfícies bióticas ou abióticas, II) fase de crescimento e acumulação, onde as bactérias agregadas ou ligadas se expandem e crescem, recrutando células próximas, e a III) fase de desagregação ou destacamento, onde bactérias liberam-se do biofilme como agregados ou células planctônicas, dependendo de seus mecanismos.

2.2.2 Papel em uropatologia

A produção de um biofilme pelos uropatógenos é considerado um importante fator na sua patogenicidade, especialmente em ITU-AC, responsáveis por 40% das infecções hospitalares (Lila *et al.*, 2023). O biofilme, em especial a matriz extracelular, atua como uma barreira física que dificulta a entrada de antibióticos e a ação do sistema imune, aumentando sua resistência a até 1000x quando comparado a células planctônicas conforme se desenvolve (Flores-Mireles *et al.*, 2015; Lila *et al.*, 2023). Sua persistência e a dispersão de novas células planctônicas levam à formação de novos biofilmes em tecidos adjacentes, levando a infecções crônicas e recorrentes (Lila *et al.*, 2023).

Muitos trabalhos já evidenciaram que a formação de um biofilme, bem como a regulação de seu viruloma (com regulação positiva de toxinas, exoenzimas e sideróforos), é orquestrada por um refinado sistema de comunicação que integra metabolismo, fisiologia e a genética do patógeno. Em Gram-negativos, esse refinado sistema de sinalização denominado *quorum sensing* é regulado por pela detecção de um grupo de moléculas denominadas N-acil-homoserina lactonas (Acyl-homoserine lactones; AHL) (Lila *et al.*, 2023). Conforme o aumento da densidade populacional, ocorre o acúmulo de AHLs e sua interação com seus receptores, levando ao controle da transcrição de genes associados à formação do biofilme e a regulação positiva de fatores de virulência que aumentam a patogenicidade do uropatógeno como a expressão de toxinas visando o máximo de dano tecidual possível a fim de ocorrer a liberação de nutrientes intracelulares e fatores de crescimento no sítio de infecção

(Lila *et al.*, 2023).

2.2.3 Biofilme de *P. mirabilis* *M. morganii*

Dos uropatógenos, a produção e formação de biofilme por *P. mirabilis* é clinicamente conhecida e preocupante, uma vez que o mesmo pode formar-se sobre materiais como silicone, látex, vidro e poliestireno, podendo formar biofilmes cristalinos *in vitro* em até 6 horas pós-inoculação (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018) e padrões de biofilme diferentes de acordo com a fonte de isolamento, sendo majoritariamente fortes e muito fortes em isolados humanos e de frango, mas fraco ou moderado em isolados de carnes bovinas e suínas (Oliveira *et al.*, 2021; Sanches *et al.*, 2021).

Tem sido demonstrado que a formação do biofilme e do biofilme cristalino de *P. mirabilis*, é influenciada principalmente pela expressão de urease, fímbrias, catalase, pelo sistema Rcs do tipo fosforelay e pelo sistema de transporte de alta afinidade de fosfato de alta afinidade Pst, pela produção de cápsula e polissacarídeos extracelular, lipopolissacarídeos, pela expressão de cinase polifosfato, chaperona de RNA Hfq, Glutamato-amônia-ligase adeniltransferase GlnE, proteína reguladora responsiva à leucina Lrp, nitrato-redutase NirB, bomba de efluxo Bcr, lipoproteína putativa PMI1551, PMI1608, proteína de membrana putativa PMI2861 e proteína de ligação ao DNA do tipo MuA PMI3402 (Armbruster; Mobley; Pearson, 2018).

Das fímbrias associadas à formação do biofilme e sua arquitetura encontram-se as fímbrias *mannose-resistant Proteus-like* (MR/P), *ambient temperature fimbriae* (ATF), *uroepithelial cell adhesin* (UCA), *P. mirabilis fimbriae* (PMF) e fímbria 10, cuja mutação nos genes *mrpA*, *pmfA*, *ucaA*, *atfA* e a subunidade fimbrial PMI2210, responsáveis pela expressão da subunidade estrutural maior das respectivas fímbrias, ocasionam alteração na arquitetura do biofilme, com formação de biofilmes menores nas cepas mutantes de *mrpA* e *atfA*, mais espessos nas cepas mutantes de *ucaA*, *pmfA* e PMI2210 quando comparados à cepa selvagem (Holling *et al.*, 2014; Scavone *et al.*, 2016).

Além das fímbrias, White e colaboradores (2021) observaram que cepas não produtoras de catalase tiveram redução na produção de SPE e, por consequência, redução na biomassa do biofilme, embora o papel da catalase na patogenicidade ainda não tenha sido experimentalmente determinado.

Existe evidência de que o sistema Rcs também exerce papel sobre a formação de biofilme. O *regulator of colonic acid capsule synthesis* (Rcs), ou regulador de síntese de cápsula de ácido colônico, é um sistema de transdução de sinal do tipo fosforelay que controla a diferenciação de células swarmer, reprimindo o operon *flhDC* e ativando o sistema de divisão celular *minCDE* responsável. Em seu trabalho, Howery, Clemmer & Rather (2016) observaram que cepas mutantes do gene *rscB*, responsável pela expressão do regulador de resposta RcsB, tiveram diminuição na formação de biofilme tanto em placas de poliestireno quanto em fragmentos de catéter de látex, tendo sido argumentado que esse impacto se deva ao fato de RcsB regular genes como *minCDE* e *speB* (responsável pela expressão da enzima agmatinase que converte agmatina em putrescina e uréia), operon *uca*, *pmf* e *mrp*, afetando também a aderência bacteriana.

O sistema Pst é um sistema de transporte de fosfato inorgânico composto pelos genes *pstS* (proteína de ligação ao fosfato), *pstC* (permease de membrana citoplasmática), *pstA* (permease de membrana citoplasmática), *pstB* (ATPase) e *phoU* (proteína reguladora *pho*). Mutações no gene *pstA* e *pstS* induzidas por O'May e colaboradores (2009) resultaram em significativa redução de biofilme *in vitro* quando comparados ao tipo selvagem.

A parede celular, os lipopolissacarídeos e os polímeros de cápsulas também apresentam importância na formação do biofilme, especialmente em decorrência da sua ligação a substratos no estágio I da formação do biofilme a qual é mediado por forças intermoleculares, interações eletrostáticas e hidrofobicidade, sendo o potencial Zeta e as cargas superficiais mais importantes para o processo de adesão que a hidrofobicidade (Czerwonka *et al.*, 2016; Lila *et al.*, 2023; Sauer *et al.*, 2022).

De acordo com o trabalho de Czerwonka e colaboradores (2016), a formação de biofilme por cepas de *P. mirabilis* foi maior naqueles com cargas superficiais mais negativas como a cepa PrK61/57 sorotipo O17 com O-polissacarídeo composto de $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fucp3NHb4Ac-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp3Ac-(1 \rightarrow) (Torzewska *et al.*, 2006).

Em *P. mirabilis*, a cápsula está principalmente associada ao crescimento *in vitro* de cristais de estruvita, sendo observado por Dumanski e colaboradores (1994) que a adição desses polissacarídeos de cápsula purificados em urina artificial promove a aceleração do processo de cristalização da estruvita, dessa forma afetando diretamente na produção do biofilme cristalino. Essa aceleração pode ser explicada pela baixa

afinidade do polissacarídeo purificado ao Mg^{2+} e sua natureza parcialmente aniônica, possibilitando a concentração de íons de magnésio e posterior crescimento dos cristais de estruvita.

Mutações no gene *pmrl*, responsável por codificar o UDP-ácido glucurônico descarboxilase que modifica a estrutura do LPS, resultaram na significativa redução da formação *in vitro* de biofilme quando comparados à cepa selvagem (Jiang *et al.*, 2010).

Análises realizadas por Izquierdo e colaboradores (2002) demonstraram que a mutação no gene *waaE*, que codifica uma glicosiltransferase do cerne interno do LPS, ocasionaram a redução do *swarming* e da habilidade *in vitro* de formação do biofilme, sendo sugerido que a redução da formação de biofilme por mutantes *waaE* se deva ao fenótipo *swarming* alterado bem como a diminuição da molhabilidade (propriedade em que um líquido, geralmente água, mantém-se em contato com uma superfície sólida) da superfície celular.

A polifosfato cinase, codificada pelo gene *ppk*, é uma das principais enzimas envolvidas na síntese de polifosfato inorgânico a partir do ATP, estando associada à resistência ao estresse e a virulência em diversas bactérias. Através da mutação do gene *ppk*, Peng e colaboradores (2015) demonstraram que cepas mutantes tiveram resistência reduzida ao estresse oxidativo, estresse hiperosmótico e estresse térmico, bem como a atenuação do fenótipo *swarming* e da formação de biofilme. Esses dados, segundo os autores, podem ser explicados pela *down*-regulação de receptores dependentes de TonB, proteína de estresse universal G, proteína fimbrial manose - resistente *Proteus*-like maior, proteína de choque térmico, proteína flagelar capping, proteínas putativas de membrana e proteínas de efluxo de multidrogas.

A proteína Hfq é um regulador pós-transcricional envolvido na riboregulação de genes através da ligação de sRNA com mRNA, sendo responsável por processos como resposta a estresse, homeostase de ferro e regulação de proteínas de membrana externa. Como demonstrado por Wang e colaboradores (2014), a chaperona Hfq é crítica para o sucesso da colonização da bexiga e rim em modelo murino de ITU por *P. mirabilis* e cuja mutação afeta negativamente a habilidade de detoxificação de H_2O_2 , de resistência ao estresse osmótico e crescimento em temperaturas de 50 °C, bem como atenuação da virulência com redução do número de flagelos, menor expressão de hemolisinas, menor tendência à formação de

biofilme, aderência e adesão à célula uroepiteliais.

Nos ensaios conduzidos por Holling e colaboradores (2014), a interrupção dos genes *glnE*, que codifica a glutamato-amônia-ligase adenililtransferase, *bcr*, que codifica resistência a biciclomicina, do gene localizado no locus PMI3402 que codifica uma proteína de ligação ao DNA do tipo MuA e o gene *rsbA* que codifica uma cinase sensorial do sistema de dois componentes ocasionaram o aumento da formação de biofilme quando comparados à cepa selvagem, enquanto a interrupção do gene *gltS*, que codifica uma proteína carreadora do simporte sódio/glutamato, genes localizados nos locos PMI1551, uma lipoproteína putativa de função desconhecida, PMI2861, proteína putativa de membrana de função desconhecida, o gene *lrp*, um regulador leucina-responsivo, e o gene *nirB*, responsável por codificar a subunidade maior da nitrato redutase, tiveram redução na capacidade de formação de biofilme.

Ainda que haja conhecimento sobre quais genes mutados ocasionam a redução ou aumentam a formação de biofilme, ainda não há a completa elucidação de como esses genes se integram em um mecanismo molecular e seu papel na formação e maturação do biofilme, também havendo pouquíssima informação a respeito do matrixoma de *P. mirabilis* (Gmitter; Kaca, 2022).

Em relação aos componentes da matriz extracelular, Zhang e colaboradores (2009) identificaram, por meio de FTIR, os grupos funcionais do tipo carboxila, hidroxila e grupos aminos na substância polimérica extracelular extraída e purificada a partir do biofilme produzido por uma cepa de *P. mirabilis* produtor de floculante e cultivado em meio com glicose e peptona como fontes de carbono (Xia *et al.*, 2007).

Como observado por Jones e colaboradores (2007) que *P. mirabilis* cultivados em meios ricos como caldo Luria-Bertani formam biofilmes com típico formato de cogumelo e contendo canais de nutrientes, enquanto biofilmes cultivados em urina artificial formaram apenas uma camada delgada em função da baixa quantidade de nutrientes.

Comparativamente a *P. mirabilis*, pouquíssimo é conhecido sobre o biofilme de *M. morgani*, sabendo-se apenas que os padrões de formação de biofilme mais frequentes são moderados, fracos, fortes e muito fortes, em ordem decrescente (Silva *et al.*, 2023).

2.3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

2.3.1 Nanopartículas de prata

Nanopartículas podem ser definidas como objetos com tamanho variando de 1 a 100 nm, sendo classificadas em diferentes categorias a depender de sua morfologia, tamanho e natureza química (Dhananjayan *et al.*, 2019). Podem ser agrupadas em nanopartículas inorgânicas que incluem as nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas cerâmicas; nanopartículas orgânicas como dendrímeros, lipossomas e micelas e nanopartículas à base de carbono que incluem fulerenos, grafenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono e carbono negro (Beyene *et al.*, 2017; Dhananjayan *et al.*, 2019; Zahoor *et al.*, 2021).

No caso das nanopartículas metálicas, podem formar-se átomo por átomo a partir da aglomeração de átomos metálicos e estabilizados por ligantes, surfactantes, polímeros ou dendrímeros (Dhananjayan *et al.*, 2019). As nanopartículas metálicas mais conhecidas incluem as nanopartículas de Cd, Al, Cu, Co, Au, Fe, Ag, Zn e Pb e que, graças à suas elevadas áreas de superfície, podem adquirir novas propriedades físico-químicas, ópticas, magnéticas, catalíticas e antimicrobianas se comparados aos átomos que as compõem ou ao seu material bruto em macroescala (Beyene *et al.*, 2017; Dhananjayan *et al.*, 2019; Zahoor *et al.*, 2021).

A prata (Ag) é um metal de transição de número atômico 47, com densidade de 10,49 g/cm³ e massa atômica de 107,8682 u, contendo 1 elétron em sua camada de valência. Seus estados de oxidação são o +1, o mais estável e podendo ser encontrado na forma de AgNO₃, +2, altamente oxidante e podendo ser encontrado sob a forma de AgF₂ e +3, extremamente oxidante e podendo ser encontrado sob a forma de KAgF₄.

Os íons de Ag⁺ podem ser estabilizados biologicamente em nanopartículas de prata (AgNP) sob diversas espécies químicas como Ag⁰, Ag₂O e AgCl (Archana; Sharma; Srivastava, 2020; Beyene *et al.*, 2017; Dhananjayan *et al.*, 2019; Trinh; Nguyen; Nguyen, 2015).

As AgNP são uma das nanopartículas mais extensivamente estudadas, exibindo propriedades antivirais, antifúngicas, antibacterianas, antitumorais, ópticas, elétricas e térmicas que possibilita sua aplicação em dispositivos médicos, sensores ópticos, cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos da indústria alimentícia

(Beyene *et al.*, 2017; Dhananjayan *et al.*, 2019).

2.3.2 Métodos biológicos de síntese

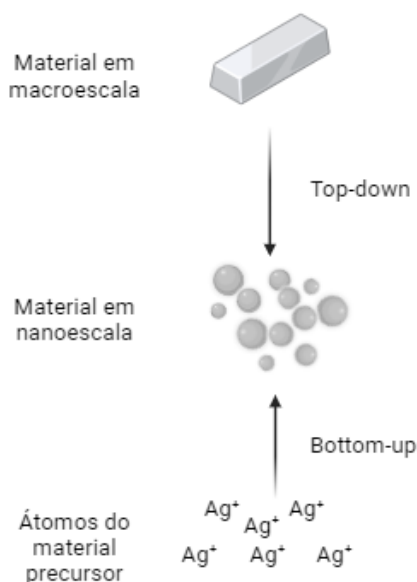
A obtenção de nanomateriais como as AgNP pode ser efetuada através de duas abordagens: o *bottom-up* e *top-down*. A abordagem *bottom-up* consiste na aglomeração de diversos átomos de um determinado metal, no caso de nanopartículas metálicas, unidos por moléculas estabilizantes. A abordagem *top-down*, por outro lado, consiste na utilização de energia para reduzir materiais macroscópicos em nanomateriais (Lee; Jun, 2019).

Os principais métodos de obtenção dos nanomateriais envolve os métodos físicos, como a evaporação-condensação e ablação a laser, os métodos químicos, como a redução química - a abordagem mais utilizada -, técnicas de microemulsão e síntese assistida por microondas, e os métodos biológicos como a síntese microbiana e utilizando extratos vegetais (Beyene *et al.*, 2017).

A síntese biológica (síntese verde ou síntese química verde) de nanopartículas metálicas utiliza entidades biológicas como microrganismos e extratos de plantas para reduzir e estabilizar sais precursores de metais em nanopartículas, sendo um método mais conveniente de produção comparada à síntese química e física em razão da simplicidade, rapidez, baixa pegada de carbono, e sobretudo a não utilização e produção de substâncias tóxicas e ecologicamente agressivas (Beyene *et al.*, 2017; Lee; Jun, 2019; Zahoor *et al.*, 2021).

A síntese utilizando a abordagem *bottom-up* de nanopartículas metálicas se inicia pela adição de um sal precursor contendo o metal de interesse (figura 3). No caso das AgNP, o sal precursor mais utilizado é o nitrato de prata (AgNO_3), embora também sendo possível a utilização do sulfeto de prata Ag_2S e Ag_2O (Singh *et al.*, 2015). Após sua adição em um determinado solvente, o sal precursor libera o metal sob sua forma iônica, o Ag^+ , que sofre processo de redução no solvente, sendo reduzido a sua forma zero-valente Ag^0 . Após sua redução, ocorre a nucleação e a aglomeração em agrupamentos oligoméricos que formam a prata coloidal (Singh *et al.*, 2015; Lee; Jun, 2019). Os parâmetros de nucleação e crescimento podem ser controlados por variáveis como temperatura, pH, concentração do extrato e de sal precursor, tipo de precursor, tipos de agentes redutores e estabilizantes e a razão molar entre surfactante/estabilizante e o sal precursor (Lee; Jun, 2019).

Figura 3 – Abordagem top-down e bottom-up para a síntese de nanopartículas de prata.



Fonte: o próprio autor

A síntese bacteriogênica, bacteriológica, assistida ou mediada por bactérias, de AgNP pode ser realizada através de sínteses extracelulares, sínteses intracelulares e sínteses utilizando componentes bacteriogênicos (Singh *et al.*, 2015).

Na síntese extracelular, os íon Ag^+ são reduzidos a Ag^0 e se acumulam extracelularmente, podendo ser recuperados via centrifugação, razão pelo qual é um método mais vantajoso comparado à síntese intracelular que exige métodos de sonicação e de lise celular para a recuperação de AgNP citoplasmáticas ou periplasmáticas (Singh *et al.*, 2015). A síntese extracelular pode ser realizada utilizando a biomassa bacteriana ou o sobrenadante bacteriano onde biomoléculas como açúcares, aminoácidos (em especial arginina, aspartato, cisteína, glutamato, lisina e metionina), peptídeos contendo pontes dissulfeto, proteínas e enzimas auxiliam no processo de redução dos íons de prata à AgNP (Singh *et al.*, 2015; Javaid *et al.*, 2017; Mabey *et al.*, 2018; Mikhailova, 2020).

No caso das proteínas associadas à superfície, a interação eletrostática entre seus grupamentos carboxílicos e os íons Ag^+ levam ao aprisionamento da prata sobre

a superfície celular e seu posterior acúmulo (Javaid *et al.*, 2017; Mikhailova, 2020; Singh *et al.*, 2015).

A teoria mais apoiada por pesquisadores em relação a identificação de quais são as principais biomoléculas na produção extracelular de AgNP é a da nitrato redutase NAD(P)H-dependente que atua como uma catapulta de elétrons, transferindo elétrons do nitrato para o íon Ag^+ (Javaid *et al.*, 2017; Mabey *et al.*, 2018; Mikhailova, 2020 Singh *et al.*, 2015).

O mecanismo de redução via nitrato redutase envolve a doação de dois elétrons NAD(P)H para o sítio ativo da enzima contendo molibdênio por meio de agrupamentos ferro-enxofre. Subsequentemente, o nitrato se liga covalentemente ao molibdênio e sofre redução ao nitrito (Mabey *et al.*, 2018). Na presença do íon Ag^+ , NAD(P)H e/ou NADH são oxidados à NADP^+ e NAD^+ , reduzindo o Ag^+ a Ag^0 , a qual posteriormente é secretado pela célula (Javaid *et al.*, 2017; Mabey *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2015).

Embora seja uma teoria elegante, Hietzschold e colaboradores (2019) demonstraram que o NADPH sozinho tem potencial redutor o suficiente para reduzir Ag^+ e produzir AgNP, sendo que, na realidade, a própria presença da nitrato redutase gera um decréscimo na cinética de redução e o aumento no diâmetro das nanopartículas quando comparadas à síntese utilizando somente o NADPH.

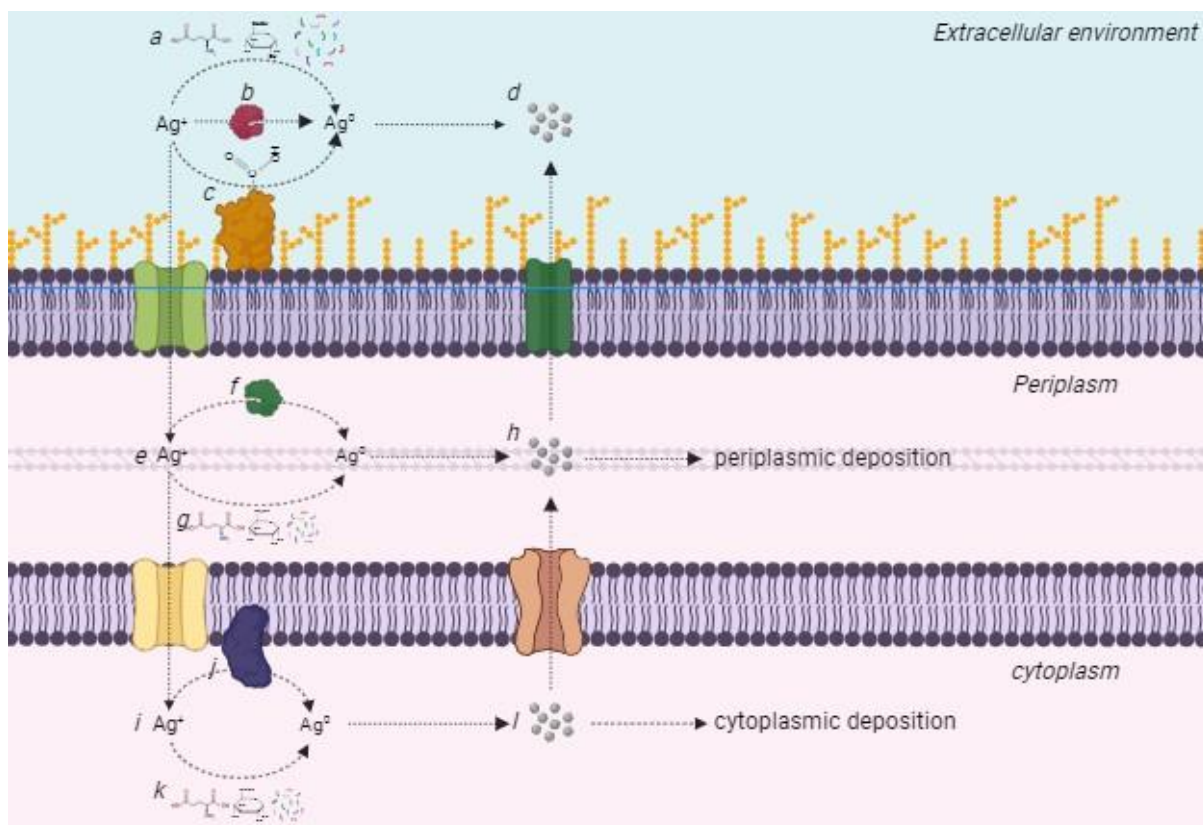
Além do uso da biomassa, outro método extracelular utilizado para a biossíntese é o uso do sobrenadante bacteriano, geralmente de cultivos de 24 -48 h, podendo ser sobrenadante centrifugado e/ou filtrado (Singh *et al.*, 2015). Nesse método, açúcares, peptídeos, metabólitos primários, secundários e subprodutos em geral podem reduzir Ag^+ se possuírem potencial redutor o suficiente. Em pH alcalino, por exemplo, anéis de monossacarídeos são cataliticamente abertos, formando aldeídos de cadeia aberta que reduzem Ag^+ a Ag^0 . Também em condições alcalinas, a tirosina pode ser convertida à semiquinona após a ionização de seu grupo fenol e o triptofano é convertido em radical triptofila, ambos Ag^+ a Ag^0 (Singh *et al.*, 2015).

Na síntese intracelular, sais de prata são acrescentados a uma cultura em crescimento. Os sais são reduzidos no citoplasma ou periplasma, acumulando-se dentro das células, o que torna necessário técnicas de ultrasonicação, autoclavação ou uso de detergentes para lise e recuperação das AgNP (Singh *et al.*, 2015).

Notadamente, as bactérias mais empregadas para a síntese intracelular de

AgNP são as resistentes à prata. Isso decorre da presença de maquinaria enzimática para sequestro e detoxificação do íon Ag^+ sob a forma reduzida Ag^0 . Um dos operons responsáveis pela resistência à prata e por sua síntese intracelular é o operon *sil*. O gene *silE* codifica uma proteína periplasmática de ligação à prata que contém sítio de histidina a qual Ag^+ se liga, sendo ativamente captado. Os íons captados são posteriormente acumulados, podendo complexar-se à proteínas, em especial metaloproteínas ricas em resíduos de cisteína e biomoléculas com grupamentos tiol, ou serem reduzidos por nitrato redutases, nitrogenases, hidrogenases, amilases, lacases, peroxidases, lisozimas, glutatona, tioredoxinas cuja localização citoplasmática ou periplasmática determina a localização da deposição das AgNP (Durán *et al.*, 2015; Mabey *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2015). Até mesmo proteínas desnaturadas, com grupamentos S-S e S-H expostos são capazes de reduzir Ag^+ a Ag^0 e formar AgNP (Durán *et al.*, 2015) (figura 4)

Figura 4 – Possível mecanismo de síntese de AgNP por métodos bacteriogênicos. Os íons Ag^+ são reduzidos por **a)** aminoácidos, açúcares e peptídeos, **b)** pela ação catalítica em enzimas na superfície ou **c)** pela interação com grupamentos carboxílicos de proteínas superficiais, sendo convertido a Ag^0 que pode se aglomerar e **d)** depositar extracelularmente; Os íons Ag^+ podem ser **e)** internalizados para o periplasma, sendo reduzidos a Ag^0 pela **f)** atividade catalítica de enzimas ou pela **g)** interação com aminoácidos, açúcares e peptídeos, podendo se aglomerar e **h)** serem depositados no periplasma; os íons Ag^+ podem ser **i)** internalizados para o citosol, sendo **j)** reduzidos por enzimas citosólicas ou ligadas à superfície interna da membrana citoplasmática ou **k)** reduzidos a Ag^0 pela interação com macromoléculas. Os íons Ag^0 podem se aglomerar e **l)** se depositar citoplasmaticamente.



Fonte: o próprio autor

2.3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

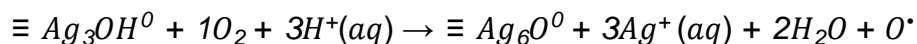
As AgNP são conhecidas por possuírem um amplo espectro de ação antibacteriana, possuindo atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias (Bondarenko *et al.*, 2018; Duran *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2013; Quintero *et al.*, 2018; Radzig *et al.*, 2013; Ramalingam *et al.*, 2016; Seong; Lee, 2017; Yin *et al.*, 2020; Zahoor *et al.*, 2021).

Utilizando AgNP estabilizadas por citrato, Liu e Hart (2010) demonstram que o processo de dissolução oxidativa, i.e., a liberação de íons Ag^+ , requer tanto tensões de O_2 quanto H^+ dissolvidos, resultando em peróxidos intermediários (H_2O_2) que rapidamente reagem com Ag^0 , oxidando-os a Ag^+ na seguinte reação:

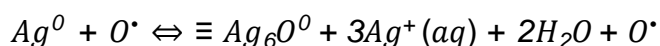


Futuramente ao trabalho de Liu e Hart (2010), Molleman e Hiemstra (2015) observaram que conforme as AgNP reagem com o O_2 , ocorre a formação de uma camada de $\equiv Ag_3O$ subvalente, posteriormente removido pela ação da dissolução

oxidativa, gerando simultaneamente espécies reativas de oxigênio (EROs).



O radical O^{\bullet} gerado cria um processo circular de dissolução da camada de $\equiv Ag_3O$, liberada sob a forma de Ag^+ , expondo as camadas mais internas de Ag^0 que reagem com radicais O^{\bullet} , gerando um octaedro de Ag_6O^0 subvalente que atua protegendo as AgNP de futuras oxidações.



A formação de outras espécies reativas de oxigênio pode ocorrer se, conforme a liberação de Ag^+ , o O^{\bullet} não reaja instantaneamente com Ag^0 no interior das AgNP, mas sim entre si, gerando espécies reativas como OH^{\bullet} e H_2O_2 (Molleman; Hiemstra, 2015).

Molleman e Hiemstra (2017) analisaram o papel do tempo, pH e tamanho na dissolução oxidativa das AgNP, tendo observado que AgNP menores liberam proporcionalmente mais íons Ag^+ em função da estabilidade superficial, também tendo observado que a dissolução oxidativa também pode ser aumentada por ligantes fortes como moléculas com grupamentos Cl-, N- e S-, que podem substituir grupamentos -OH quando ligarem-se à superfície das AgNP, alterando sua estabilidade e potencialmente sua estrutura. Por outro lado, ligantes com baixa atividade como aqueles contendo -COOH, podem ligar-se à superfície das AgNP, mas não alterá-la.

Ao final do experimento, Molleman e Hiemstra (2017) desenvolveram um modelo cinético de Langmuir na qual a taxa de liberação de Ag^+ é governada pelo oxigênio molecular adsorvido pela superfície e a qual pode ser ativado através de íons H^+ , razão pelo qual há menor liberação de Ag^+ em pH alcalino.

Embora o mecanismo antibacteriano das AgNP não tenha sido completamente elucidado, sua ação é atualmente e principalmente atribuída aos íons Ag^+ , liberados a partir da dissolução oxidativa (Dong; Sun, 2019; Liu; Hart, 2010; Molleman; Hiemstra, 2015; Molleman; Hiemstra, 2017). A literatura evidencia que o mecanismo de ação das AgNP tem como principais alvos a disrupção da parede celular e membrana citoplasmática, desnaturação de biomoléculas, interrupção da produção de ATP, inativação da cadeia transportadora de elétrons e perfuração física da membrana (Dong; Sun, 2019; Singh *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2020).

Ramalingam e colaboradores (2016), utilizando microscopia de força atômica, observaram alterações ultraestruturais e das propriedades nanomecânicas da superfície de *E. coli* and *P. aeruginosa*, com desordem da membrana citoplasmática com oxidação de ácidos graxos, proteínas e carboidratos demonstrada por técnica de infravermelho por transformada de Fourier.

Buscando compreender os efeitos da exposição de AgNP sobre a membrana externa e interna de *S. enterica* serotype typhimurium, Seong e Lee (2017) observaram alteração da permeabilidade da membrana citoplasma em uma resposta dose-dependente, enquanto a permeabilidade da membrana externa não foi alterada pela exposição à AgNP, dados corroborados por Bondarenko e colaboradores (2018) que também observaram que a membrana plasmática foi o principal alvo das AgNP também não observando efeito sobre a membrana externa de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Uma explicação para esse fenômeno pode se dar pela importação de íons Ag⁺ por porinas, principalmente OmpF e OmpC, visto que podem translocar cátions. Utilizando cepas de *E. coli*, Radzig e colaboradores (2013) observaram que cepas mutantes de porinas OmpF e OmpC eram de 4-8 vezes mais resistentes à AgNP comparadas às cepas selvagens.

Dessa forma, é hipotetizado que os íons liberados pelas AgNP penetram pelas porinas, interagindo inespecificamente com enzimas contendo grupamento sulfidríla localizadas na membrana, inibindo a respiração celular e despolarizando a membrana citoplasmática, como evidenciado pela liberação de K⁺ (Bondarenko *et al.*, 2018).

A ação de íons Ag⁺ sobre *E. coli* já foram analisadas por Holt e Bard (2005) que observaram alteração da permeabilidade da membrana e diminuição da força próton-motiva. Em função do colapso da força próton-motiva, os autores observaram um efeito de desacoplamento da respiração da síntese de ATP, isto é, a respiração se tornou independente da síntese de ATP e não sendo determinada pela disponibilidade de ADP, agindo apenas na função de restaurar o gradiente eletroquímico. Os autores também argumentam que pela improbabilidade da razão do desacoplamento ser em função da interação com as porções hidrofóbicas da membrana, e sim pela interação com proteínas de transporte e respiratórias, como futuramente corroborado por Bondarenko e colaboradores (2018).

Em fato, utilizando a redução de ferricianeto e espectroscopia de Raman amplificada por superfície, Holt e Bard (2005) observaram que os íons Ag^+ , além de dificultarem a passagem de elétrons do complexo I para as moléculas de ferricianeto, também observaram sua interação com grupamentos flavinas, corroborando a ação de Ag^+ sobre o complexo I.

A ação oligodinâmica do Ag^+ também pode ser explicada pela sua ligação à enzimas de baixo potencial, o que resulta na produção maciça de EROs em razão da não transferência de elétrons para a oxidase terminal, resultando na produção de O_2^- e $\bullet\text{OH}$ (Holt; Bard, 2005).

Embora seja considerado um dos mecanismos de ação das AgNP, o mecanismo de morte causado pelas EROs não está totalmente elucidado. Ainda que as células possuam mecanismos de detoxificação de EROs, o desbalanço entre as EROs e os sistemas antioxidantes ocasiona o fenômeno denominado de estresse oxidativo onde há subsequente acúmulo de EROs como O_2^- , H_2O_2 e $\bullet\text{OH}$ e a oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos.

No caso das proteínas, a oxidação de grupamentos tióis e a formação de grupamentos carbonila podem alterar conformacional e funcionalmente enzimas e proteínas (Seixas *et al.*, 2021). As proteínas mais suscetíveis incluem aquelas contendo resíduos de cisteínas e metionina. A cisteína, por ser altamente nucleofílica (em razão de seu grupamento $-\text{SH}$), pode reagir com O_2^- e $\bullet\text{OH}$, produzindo radicais tiil ($\text{RS}\bullet$) que, também reagindo com $\bullet\text{OH}$, podem formar ácidos sulfênicos, uma espécie química altamente reativa capaz de formar ligações dissulfeto com resíduos de cisteína proximais ou irreversivelmente serem oxidados a ácido sulfínico ($-\text{SO}_2\text{H}$) e ácido sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$) (Ezraty *et al.*, 2017). O átomo de enxofre da metionina também pode ser oxidado à sulfóxido-metionina (Met-O), a qual pode ser irreversivelmente oxidado a sulfona-metionina (Met- O_2). Em ambos os casos, seja na oxidação da cisteína ou da metionina, a alteração redox desses aminoácidos pode ocasionar alteração tridimensional da proteína e da enzima, alterando sua função biológica (Ezraty *et al.*, 2017).

A alteração conformacional gerada pela interação proteína-AgNP foi estudada do ponto de vista proteômico por Wigginton e colaboradores (2010) que observaram que a triptofanase (TNase), embora em baixa concentração citosólica em *E. coli*, possui alta afinidade pela AgNP independentemente de sua modificação

superficial. Nesse estudo, os autores sugerem que a diminuição da atividade enzimática, de 50 a >90%, da TNase pelas AgNP se deve pela distorção da estrutura tridimensional gerada pela ligação AgNP-proteína.

Além das proteínas, a oxidação dos lipídios em peróxidos lipídicos, a qual afeta principalmente ácidos graxos poliinsaturados, pode ocasionar alteração da permeabilidade da membrana e sua fluidez, afetando proteínas de transporte, sistemas de sinalização e a homeostase celular (Seixas *et al.*, 2021). Em células procarióticas, entretanto, a vasta maioria dos lipídeos é composto de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, portanto, sendo menos propensos à peroxidação lipídica como observada em eucariotos (Imlay, 2013).

Embora as EROs O_2^- e H_2O_2 não danifiquem diretamente o DNA, sua ação mutagênica provém principalmente da Reação de Fenton, um uma reação química mediada por íons Fe^{2+} em associação com o H_2O_2 que ocasiona a formação de Fe^{3+} , HO^- e $\bullet OH$. Quando $\bullet OH$ é produzido próximo ao DNA, sua interação pode danificar tanto as bases nitrogenadas quanto grupamentos desoxirriboses, ocasionando mutação e quebra da fita dupla (Fasnacht; Polacek, 2021). A sensibilidade dos ácidos nucleicos as EROs decorrem da reatividade dos átomos de nitrogênio e oxigênio. Das quatro bases nitrogenadas, a mais propensa a oxidação é a guanina dado seu menor potencial de redução, podendo ser oxidada a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-G) (Fasnacht; Polacek, 2021; Seixas *et al.*, 2021).

Como observado por Quinteros e colaboradores (2018), a incubação de cepas de *E. coli* e *S. aureus* na presença de AgNP pode ocasionar o aumento de marcadores de estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA) e de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), sendo este último também um marcador de estresse de guanina e, portanto, DNA. Os mesmos autores também observaram que, através do agente quelante de superóxido 2,2-bipiridil (BIP) e da enzima catalase (CAT), os principais agentes responsáveis pela peroxidação lipídica são os radicais O_2^- e $\bullet OH$.

Além dos ácidos desoxirribonucleicos, as EROs também exibem atividade oxidante sobre os ácidos ribonucléicos, dos quais tendem a ser mais sensíveis ao estresse oxidativo que o DNA (Fasnacht; Polacek, 2021). A sensibilidade do RNA as EROs se deve não apenas por sua concentração exceder em porcentagem homérica ao DNA, mas também por ser de fita simples, logo tendo bases mais expostas, menor associação à proteínas e a falta de mecanismos de reparo (Seixas *et al.*, 2021).

Além do supracitado 8-oxo-G, o \bullet OH gerado pelas reações de Fenton oxidam RNA retirando o hidrogênio de ligações C-H, gerando adutos como 8-oxo-7,8-dihidroadenosina (8-oxo-A), 5-hidroxiuridina (5-HO-U) e 5-hidrocitosina (5-HO-C) (Seixas *et al.*, 2021). Por ter um tempo de meia-vida rápido, os efeitos da oxidação do RNA sobre a homeostase celular é negligenciado, embora sua oxidação possa levar à defeitos na montagem de ribossomos, a incorporação incorreto de aminoácidos, erros em processos de acilação de aminoácidos e alteração de sítios de reconhecimento (Fasnacht; Polacek, 2021; Seixas *et al.*, 2021).

Mesmo RNAs altamente estruturados como rRNA e tRNA podem sofrer oxidação pelas EROs.

A oxidação de bases nitrogenadas de mRNA, por exemplo, podem alterar o processo de tradução do mRNA na adoção de conformação ativa da subunidade menor do ribossomo durante o processo de leitura dos códons (Fasnacht; Polacek, 2021). A etapa mais afetada pela oxidação do mRNA é a elongação uma vez que mRNAs oxidados tendem a aumentar o número de ribossomos paralisados (Seixas *et al.*, 2021).

No caso dos rRNA, embora alguns autores argumentam que, embora seja oxidável, sua oxidação enquanto dentro do ribossomo não necessariamente interfere na atividade de síntese proteica, podendo, na realidade, acelerar as taxas *in vitro* de tradução (Fasnacht; Polacek, 2021), outros argumentam que oxidações em resíduos específicos da subunidade 23S podem afetar desde o processo de formação das ligações peptídicas à ligação do tRNA ao ribossomo (Seixas *et al.*, 2021).

A oxidação do tRNA também ocasiona profundas alterações estruturais e, portanto, na tradução, mais especificamente nos processos de decodificação do códon e na aminoacilação (Fasnacht; Polacek, 2021; Seixas *et al.*, 2021).

Globalmente, a morte oxidativa ocasionada pela AgNP não provém apenas da produção de EROs e seus respectivos subprodutos oxidados, mas na realidade está associada a alterações morfofisiológicas e, sobretudo, respostas SOS que induzem a morte programada.

A morte celular programada, por definição, refere-se a processo geneticamente codificados que levam ao seu icídio celular. Após ser danificada, a célula bacteriana responderá aos danos induzindo sistemas toxina-antitoxina, como o sistema MazFE, e mecanismos de reparo, como sistema SOS, que induzem o estado um quiescência,

também denominada bacteriostase, que maximiza recursos na tentativa de manutenção e reparo dos danos. Nessa etapa, a atividade da holina CidA encontra-se inibida pela antiholina LrgA. Se os danos forem irreparáveis, a atividade de CidA é iniciada por mecanismos desconhecidos, levando a uma cascata sinalizadora que ativa a hidrolases de peptidoglicano e nucleases como a BapE (Bayles, 2014).

As células bacterianas que sofrem morte programada podem sofrer a autólise, com dissolução da membrana externa e liberação de conteúdo citoplasmático, e processos de morte semelhantes a apoptose, com encolhimento celular, condensação e fragmentação do DNA, despolarização cálcio-dependente da membrana citoplasmática e exposição extracelular de fosfatidilserina (Bayles, 2014). Autores observaram que a deleção da RecA é capaz de bloquear processos semelhantes a apoptose, sugerindo que esses processos, portanto, estão sob controle do sistema SOS (Bayles, 2014).

Em seu trabalho, Kim e Lee (2021), buscando expandir informações sobre processos de morte semelhantes a apoptose induzidos pelas AgNPs e o papel da proteína *dinF* nesses mesmos processos, observaram aumento de marcadores de estresse oxidativo como 8-OHdG e EROs como $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 , com respectivo aumento de enzimas antioxidantes como a catalase, mas a inativação funcional da glutathione peroxidase (GPx) e diminuição da concentração de glutathione, o antioxidante de menor peso molecular mais importante na célula, também responsável por detoxificar EROs. Concomitante ao aumento de 8-OHdG, os autores observaram que a exposição à AgNP levou à fragmentação do DNA, todavia, células tratadas previamente quelante de H_2O_2 não tiveram esse fenômeno, sugerindo o papel do H_2O_2 na fragmentação do DNA. Os autores observaram que a filamentação celular, um processo induzido pelo sistema SOS, também havia sido induzido pelo H_2O_2 produzido pelas AgNP, além de terem observados clássicas alterações fenotípicas do processo de morte semelhante à apoptose como aumento da despolarização da membrana citoplasmática, externalização de fosfatidilserina e ativação de proteínas semelhantes a caspase.

Por fim, utilizando quelantes de OH, os autores observaram que a morte semelhante a apoptose não é, portanto, induzida por $\bullet\text{OH}$, mas sim o H_2O_2 , cujo dano severo ao DNA induz respostas SOS que levam a ativação da proteína RecA que se altera conformacionalmente, iniciando o processo de apoptose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BIODISSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

As nanopartículas de prata (AgNP) foram preparadas a partir do sobrenadante livre de células de *Escherichia coli* ATCC® 25922, acrescido de uma solução de AgNO₃.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AgNP

3.2.1 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A dispersão de AgNP obtida, o sobrenadante filtrado e a solução de AgNO₃ foram analisados em Espectrômetro UV-Vis 2600 (Shimadzu) na faixa de ondate 200 a 600 nm no Laboratório de Espectroscopia da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da PROPPG/UEL.

3.2.2 ESPALHAMENTO DINÂMICO E ELETROFORÉTICO DA LUZ

Tamanho (em nm) e potencial Zeta (em kV) foram determinados através de Litesizer 500 (ANTON PAAR) utilizando a metodologia de espalhamento dinâmico da luz (EDL) e dispersão eletroforética da luz (EEL) no Laboratório Multiusuário do Campus Londrina da Universidade Tecnológica Federla do Paraná.

3.2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Para determinar a presença de elemento prata e o tamanho do cristalino, amostras da suspensão liofilizada de AgNP foram submetidas à Difração de Raios X (XRD) realizadas no Laboratório de Difração de Raios X do LARX (Laboratório Multiusuário da Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação) da UEL, em um difratômetro da marca PANalytical modelo X'Pert PRO MPD, com radiação CuK α , utilizando a técnica conhecida como θ -2 θ , com tensão e corrente de 40 KV e 30 mA, respectivamente, intervalo de varredura 2 θ de 5 a 80 ° com passo angular de 0,0394 ° e tempo de contagem por ponto foi de 89,0 s.

Para poder desprezar possíveis orientações preferenciais no processo de

preparação das amostras e homogeneizar a medida na superfície das amostras, o liofilizado foi girado ciclicamente.

Tamanho do analito de AgNP foi obtido através da equação de Scherrer com análise de padrão de Si para correção de potencial influência da parte instrumental no tamanho do cristalito e microdeformação da amostra.

3.3 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas as cepas produtoras de urease *Proteus mirabilis* ATCC® 7002 e *Morganella morganii* ATCC® 8019 gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina (LABAC-UEL).

3.4 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

3.4.1 ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Atividade antibacteriana foi determinada através do método de microdiluição em caldo descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018), utilizando placas de microtitulação de 96 poços e concentrações finais de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 e 7.8125 μmol^{-1} em volume final de 100 μL . A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente, sendo definida como sendo a menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento microbiano. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada adicionando alíquotas 10 μL do conteúdo de poços em ágar Mueller-Hinton (AMH, Kasvi®) e incubando a placa por 24 h a 37 °C. A CBM foi acatada pelo não crescimento de colônias, sendo definida como a menor concentração capaz de reduzir 99,9% do inóculo final (NCCLS, 1999).

3.5 ATIVIDADE ANTIBIOFILME

3.5.1 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO EM BIOFILME

A inibição do crescimento bacteriano em biofilme foi realizada adicionando 200 μL de inóculo bacteriano a 5×10^5 UFC/mL diluído em caldo Mueller-Hinton contendo, ou não, AgNP a 4x CIM, 2x CIM e CIM, em sextuplicata, em placas de poliestireno de 96 poços. Placas foram cultivadas *overnight* a 37 °C.

A diminuição da biomassa do biofilme foi quantificado através da metodologia

descrita por Kwiecinska-Piróg *et al.* (2014) utilizando solução de cristal violeta a 0,1% e a diminuição da viabilidade celular das células aderidas foi quantificada através de redução de sal tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo dedifeniltetrazólio), ambos com leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro com comprimento de onda em 570 nm.

A taxa de inibição de biofilme pelas AgNP foi quantificada através das seguintes fórmulas:

Ensaio colorimétrico com solução de cristal violeta a 0,1%

$$\text{Redução de biomassa (\%)} = 100 - \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right)$$

Ensaio colorimétrico com redução de MTT

$$\text{Redução de viabilidade celular (\%)} = 100 - \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right)$$

3.6 ATIVIDADE ANTIUREOLÍTICA

3.6.1 INIBIÇÃO DE ATIVIDADE UREOLÍTICA

A inibição de atividade ureolítica pela exposição das cepas às AgNP será realizada em placas de poliestireno de 96 poços com volume final de 100 µL e utilizando urina artificial (U.A.; cloreto de cálcio (0,049% m/v), cloreto de magnésio hexahidratado (0,065% m/v), cloreto de sódio (0,46% m/v), di-sulfato de sódio (0,23% m/v), citrato de trissódio di-hidratado (0,065% m/v), oxalato de di-sódio (0,002% m/v), fosfato de potássio di-hidrogenado (0,28% m/v), cloreto de potássio (0,16% m/v), cloreto de amônio (0,1% m/v), ureia (2,5% m/v), caldo de soja triptona (0,1% m/v), gelatina (0,5% m/v)). Primeiramente, o inóculo bacteriano crescido em ágar Mueller-Hinton será ajustado para 0,5 na Escala McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL) em solução salina 0,9%. Inóculo foi diluído para 10⁶ UFC/mL em urina artificial e 50 µL do inóculo ajustado será transferido para 50 µL de caldo urina contendo diferentes concentrações de AgNP (4x CIM, 2x CIM e CIM). A placa de poliestireno foi incubada a 37 °C por 24 h.

Após o período de incubação, uma alíquota de 5 µL foi submetido ao ensaio de nitrofenol descrito por Weatherburn (1967) e a redução da atividade ureolítica será

quantificada segundo a equação:

$$\text{Redução de atividade ureolítica (\%)} = 100 - \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right).$$

3.7 BIOCAMPATIBILIDADE

3.7.1 HEMATOTOXICIDADE FRENTE A ERITRÓCITOS HUMANOS

A atividade hemolítica das AgNP foi determinada utilizando a metodologia descrita por Izumi et al. (2012) com modificações. O sangue foi coletado a partir de um doador humano saudável e com consentimento voluntário utilizando tubos heparinizados Vacutainer® (BD). Eritrócitos foram centrifugados a 5000 g por 5 min a 4 °C e foram utilizados para o preparo de uma suspensão a 6% (v/v) em 0,1 M de salina tamponada com fosfato (pH 7,2). Foi adicionado 100 µL de 6% eritrócitos humanos a 100 µL de salina tamponada com fosfato contendo concentrações finais de AgNP a 4x CIM, 2x CIM e CIM em placas de poliestireno de 96 poços. Placas foram incubadas por 3 h a 37 °C e o sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm para avaliar a liberação de hemoglobina.

O Controle positivo (100% de atividade hemolítica) foi construído utilizando solução de Triton X-100 a 1% e controle negativo (0% de atividade hemolítica) foi construído adicionando 100 µL de PBS a 100 µL de dispersão.

A taxa hemolítica será quantificada através da equação:

$$\text{Taxa hemolítica (\%)} = \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right) * 100$$

O ensaio de hemólise foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 47661115.0.0000.5231, N° 1.268.019).

4. RESULTADOS

Após o período padronizado para síntese, a dispersão de AgNP obtida apresentou coloração acastanhada, indicando a redução dos sais de AgNO₃ em Ag⁰ (imagem 1).

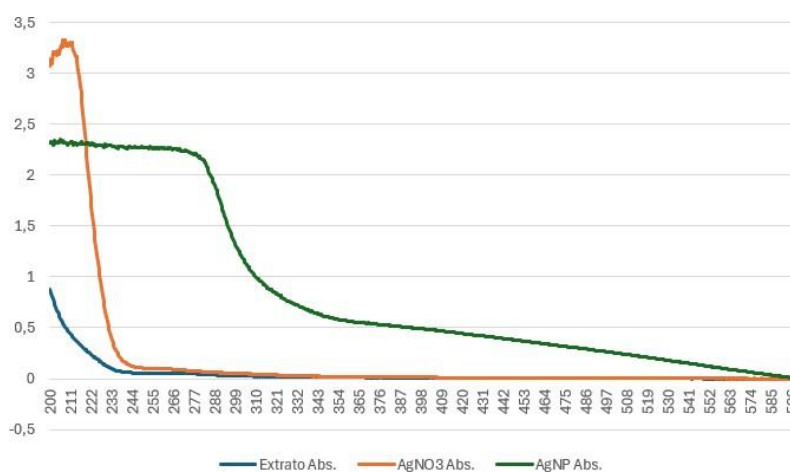
Imagem 1 – Imagem da dispersão de AgNP obtida.



Fonte: o próprio autor

A análise por UV-Vis da solução de AgNO_3 demonstrou picos de absorvância próximos a 211 nm; a solução do extrato demonstrou pico em 200 nm seguido de queda e a dispersão de AgNP indicou um platô de 200 a 288 nm com subsequente queda (figura 5).

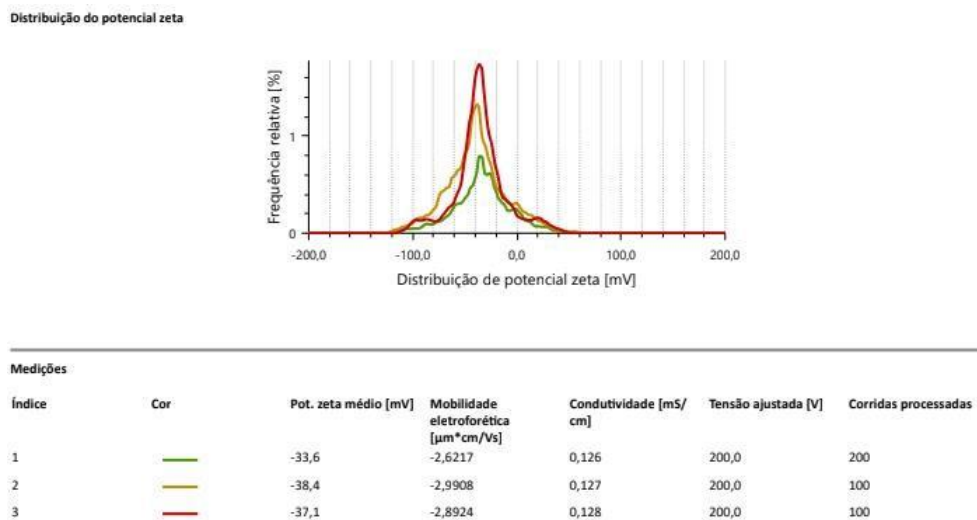
Figura 5 – Espectros de absorvância ultravioleta-visível das soluções de extrato (em azul), de AgNO_3 (em laranja) e da dispersão de AgNP (em verde).



Fonte: o próprio autor

A ausência da formação de precipitado também indica a estabilidade coloidal, corroborada pela técnica de EEL que demonstrou um potencial Zeta médio de $-36,4 \pm 2$ mV (figura 6). Partículas com potencial entre $\pm 0-10$ mV, $\pm 10-20$ mV, $\pm 20-30$ mV e $> \pm 30$ mV podem ser consideradas altamente instáveis, razoavelmente instável, moderadamente estável e altamente estável (Bhattacharjee, 2016). Utilizando esses critérios, as AgNP produzidas podem ser classificadas como altamente estável.

Figura 6. Distribuição do potencial Zeta das AgNP obtidas.

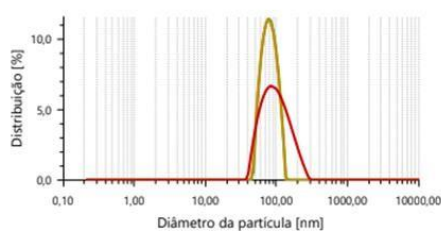


Fonte: o próprio autor

O tamanho em nanoescala foi evidenciado pela técnica de EDL, demonstrando tamanho hidrodinâmico médio de $88,3 \pm 6,4$ nm (figura 7). No que tange a uniformidade do tamanho hidrodinâmico das AgNP, o índice de polidispersidade, *i.e.*, índice que representa a distribuição do tamanho da população dentro de uma amostra, foi de $0,132 \pm 0,09$. Amostras cuja valor excedem 0,7 (70%) são consideradas polidispersas, portanto, as AgNP produzidas nesse trabalho podem ser classificadas como monodispersas (Danaei *et al.*, 2018).

Figura 7. Distribuição do tamanho hidrodinâmico das AgNP obtidas.

Distribuição do tamanho de partícula - Intensidade



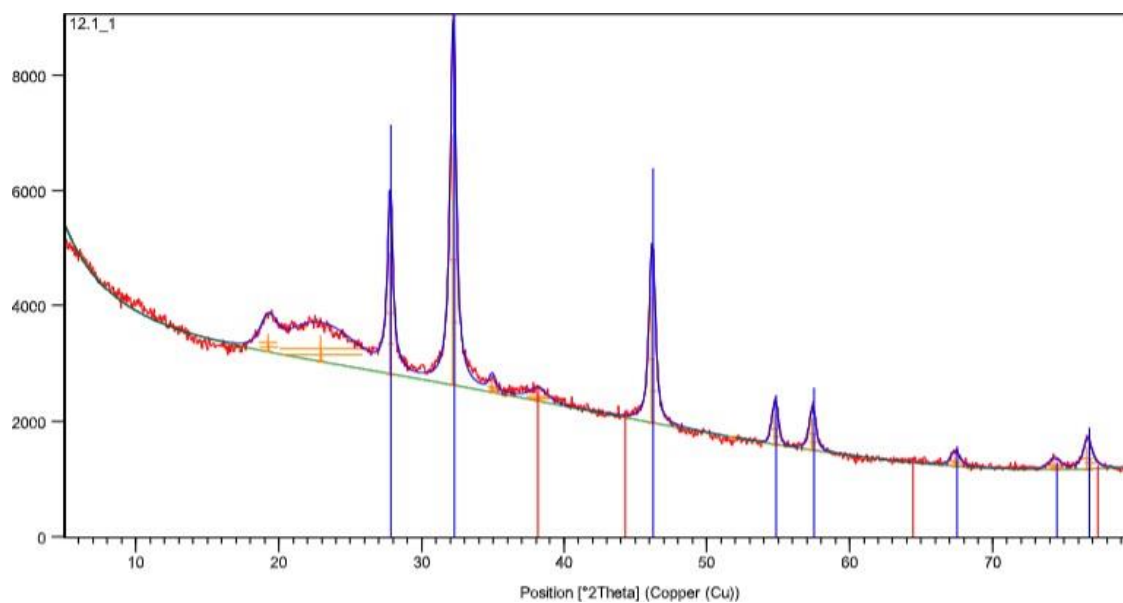
Medições - Intensidade

Índice	Cor	Diâm. hidrod. [nm]	Índice de polidispersão [%]	Pico 1 [nm]	Pico 2 [nm]	Pico 3 [nm]	Transmitância [%]
1	—	84,25	4,7	81,79 (Intensidade)	-(Intensidade)	-(Intensidade)	89,0
2	—	83,27	10,8	80,82 (Intensidade)	-(Intensidade)	-(Intensidade)	89,3
3	—	97,26	24,1	105,12 (Intensidade)	-(Intensidade)	-(Intensidade)	89,3

Fonte: o próprio autor

As análises por DRX evidenciaram a presença de 93,4% cloroargirita (AgCl; código de referência 96-901-1667) e 6,6% de prata (Ag; código de referência 01-087-0597) (figura 8). Em relação aos tamanhos, através da equação de Scherrer observou-se que o AgCl identificado apresentou tamanho de 16,3 nm, enquanto a Ag identificada apresentou tamanho de 4,3 nm, ambos confirmando a natureza nanocristalina da amostra e a presença do elemento prata.

Figura 8. Difratoograma da suspensão de AgNP liofilizada.



Fonte: o próprio autor

Nos ensaios de microdiluição em calda foi possível determinar a CIM e CBM contra as cepas *P. mirabilis* ATCC 7002 e *M. morganii* ATCC 8019, bem como seus respectivos índices CBM:CIM de 2 (tabela 2)

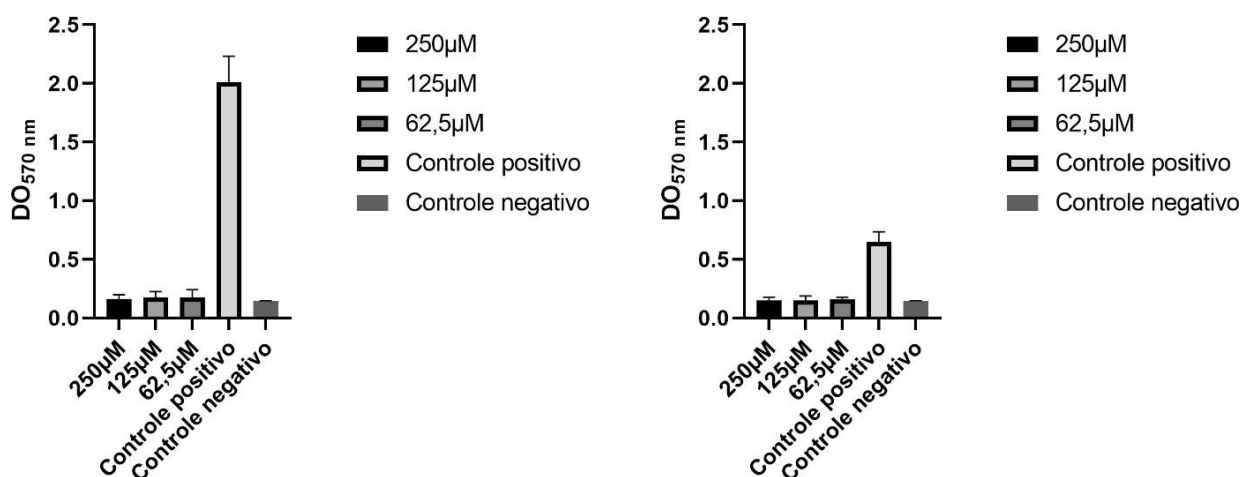
Tabela 2 - Concentração inibitória e bactericida mínima das AgNP frente as cepas testadas.

Cepa	CIM	CBM	Índice CBM:CIM
<i>abilis</i> ATCC7002	62,5 µM	125 µM	2
<i>rganii</i> ATCC8019	62,5 µM	125 µM	2

Fonte: o próprio autor

Através dos ensaios de inibição de biofilme estático de *P. mirabilis*, foi possível quantificar os valores brutos do biofilme tratado com concentrações 4x CIM, 2x CIM, CIM e não tratado. Através do uso da solução de cristal violeta, a densidade óptica obtida foi de $0,16283 \pm 0,03$ (4x CIM), $0,17583 \pm 0,05$ (2x CIM), $0,17683 \pm 0,065$ (CIM), $2,01 \pm 0,22$ (não tratado) e $0,14425 \pm 0,004$ (controle negativo); através do uso do sal tetrazólio MTT, a densidade óptica obtida foi de $0,06516 \pm 0,004$ (4x CIM), $0,066 \pm 0,002$ (2x CIM), $0,074 \pm 0,002$ (CIM), $0,8075 \pm 0,01$ (não tratado) e $0,0535 \pm 0,004$ (controle negativo) (figura 9).

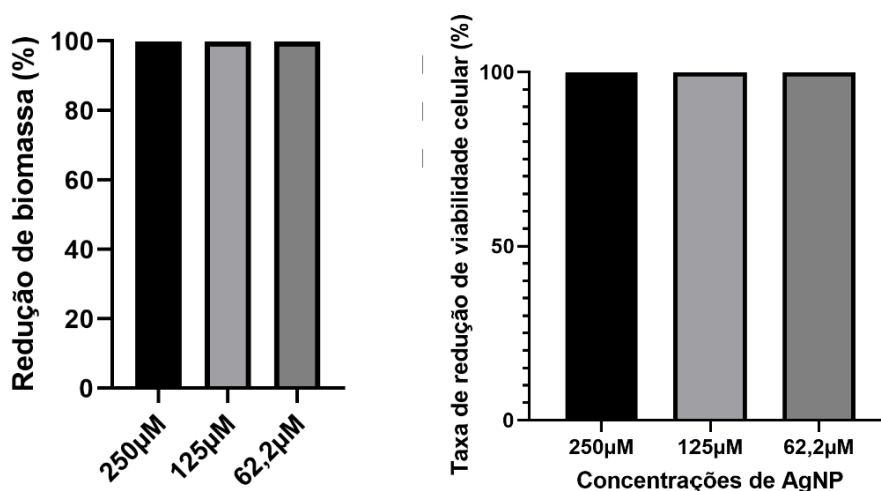
Figura 9 – Valores absolutos da inibição de biofilme de *P. mirabilis* pelas AgNP obtida através da coloração por a) solução de cristal violeta e b) pela redução do sal tetrazólio MTT.



Fonte: o próprio autor

Utilizando a fórmula descrita na seção 3.4.2, foi possível quantificar a taxa de inibição do biofilme estático através de ambas as DO obtidas. Para *P. mirabilis*, a taxa de redução da biomassa foi de 99,94% (4x CIM), 99,904% (2x CIM) e 99,903% (CIM), enquanto a taxa de redução da viabilidade celular do biofilme foi de 100% para todas as concentrações testadas (figura 10).

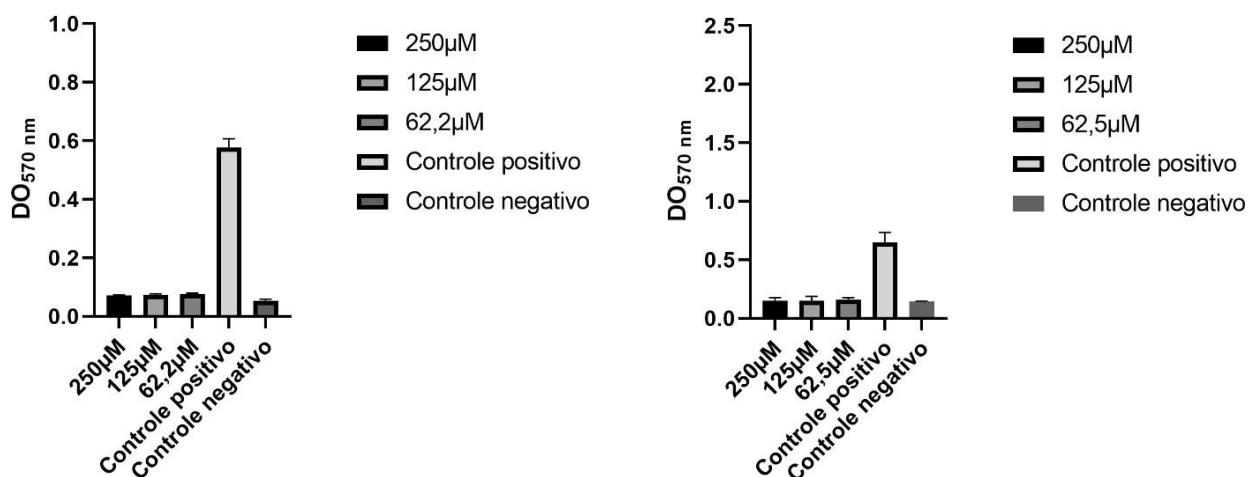
Figura 10 – a) Taxa de redução da biomassa do biofilme estático de *P. mirabilis* pelas AgNP e b) taxa de redução da viabilidade celular do biofilme estático de *P. mirabilis* pelas AgNP.



Fonte: o próprio autor

Para *M. morganii*, a densidade óptica obtida foi de $0,136\pm 0,003$ (4x CIM), $0,1483\pm 0,017$ (2x CIM), $0,1662\pm 0,02$ (CIM), $0,6514\pm 0,08$ (não tratado) e $0,14425\pm 0,004$ (controle negativo); através do uso do sal tetrazólio MTT, a densidade óptica obtida foi de $0,07175\pm 0,002$ (4x CIM), $0,07375\pm 0,003$ (2x CIM), $0,0773\pm 0,002$ (CIM), $0,5782\pm 0,02$ (não-tratado) e $0,0535\pm 0,004$ (controle negativo) (figura 11).

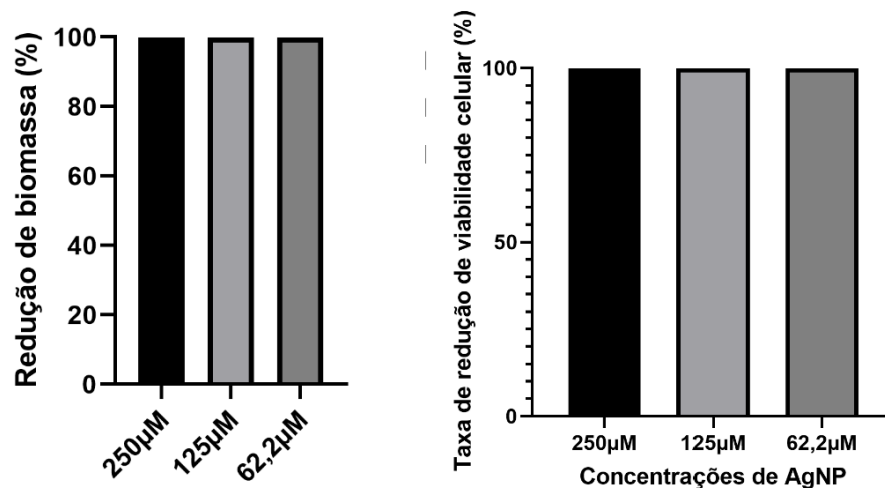
Figura 11 – Valores absolutos da inibição de biofilme pelas AgNP obtida através da coloração por a) solução de cristal violeta e b) pela redução do sal tetrazólio MTT.



Fonte: o próprio autor

Para *M. morganii*, a taxa de redução da biomassa foi de 99,984% (4x CIM), 99,987% (2x CIM) e 99,969% (CIM). A taxa de redução da viabilidade celular foi de 100% para todas as concentrações testadas (figura 12).

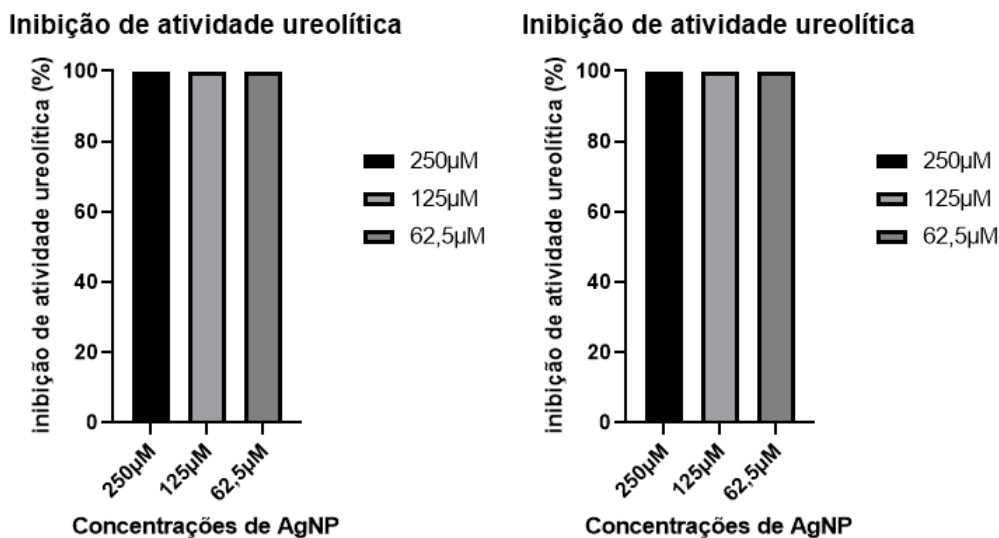
Figura 12 – a) Taxa de redução da biomassa do biofilme estático de *M. morganii* pelas AgNP e b) taxa de redução da viabilidade celular do biofilme estático de *M. morganii* pelas AgNP.



Fonte: o próprio autor

Foi observado uma redução de 99,83% (4x CIM), 99,79% (2x CIM) e 99,69% (1x CIM) para *P. mirabilis* (figura 13a) e 99,45% (4x CIM), 99,35% (2x CIM) e 99,26% (CIM) para *M. morganiii* (figura 13b). Embora tenha ocorrido a diminuição na DO quando comparado ao controle negativo, essa diminuição não foi substancial o suficiente para impedir que o caldo urina se alcalinizasse e ocorresse a precipitação de sais.

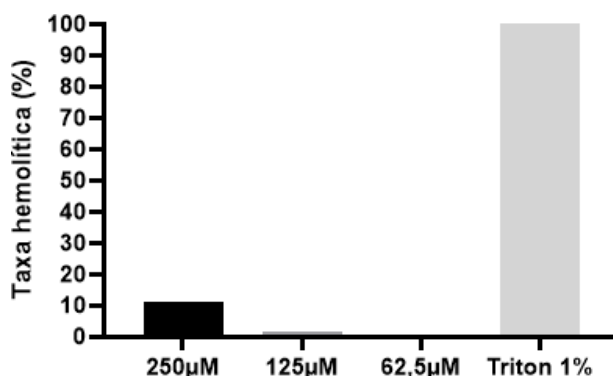
Figura 13 – a) taxa da redução da atividade ureolítica pelas de *P. mirabilis* pelas AgNP e b) taxa da redução da atividade ureolítica de *M. morganiii* pelas AgNP.



Fonte: o próprio autor

A toxicidade das AgNP frente aos eritrócitos humanos foi avaliada através de sua taxa hemolítica. A maior concentração hemolítica foi de 250 μ M, de aproximadamente 11%, as concentrações de 125 μ M e 62,5 μ M foram menores que 2% comparadas ao controle positivo (Triton a 1%) (figura 14)

Figura 14 – a) Taxa hemolítica da AgNP em concentrações de 250 μ M, 125 μ M e 62,5 μ M.



Fonte: o próprio autor

5. DISCUSSÃO

Esse foi o primeiro trabalho descrito que faz uso do sobrenadante de *E. coli* ATCC 25922 para a obtenção de nanopartículas de prata. A síntese bacteriogênica de AgNP utilizando *E. coli* já foi relatada na literatura, especificamente através da biomassa bacteriana (Muthukkumarasamy *et al.*, 2012). Embora seja uma metodologia eficaz, o uso da biomassa bacteriana está associado ao risco de potencial liberação de lipopolissacarídeos e outras substâncias imunogênicas relacionadas à parede bacteriana ainda que o organismo utilizado não seja necessariamente virulento, como a *E. coli* ATCC 25922, um microrganismo de nível 1 de biossegurança segundo especificações da American Type Culture Collection.

A presença de picos próximos a 300 nm (figura 1) pode ser atribuída a possível presença de AgCl@NP, uma vez que AgCl@NP apresentam uma ressonância plasmônica de superfície (RPS) entre 250 e 290 nm (Bajrami *et al.*, 2024). A presença de AgCl é comprovada através dos padrões de difrações obtidas pelo DRX (figura 5).

A diferença no tamanho de AgCl@NP obtida pelo EDL e pela equação de Scherrer pode ser explicada pelas diferenças de medições, uma vez que o EDL analisa o tamanho hidrodinâmico de uma partícula *virtualmente* esférica, dessa forma, o tamanho pode ser superestimado tendo em vista que a película de estabilizantes também é analisada. Além disso, uma vez que a partícula analisada é *virtualmente* esférica, a diferença entre o tamanho-real e o tamanho informado pode ser em função da morfologia da nanopartícula. Embora o "padrão ouro" para a determinação do tamanho de nanopartículas seja a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), seu tamanho aproximado – em relação ao TEM - pode ser estimado através da equação de Scherrer com menos de 0,4 nm de diferença, com o tamanho do cristalito sendo subestimado (Ali *et al.*, 2023).

Em relação a atividade antimicrobiana das AgCl@NP obtidas, trabalhos na literatura utilizando isolados clínicos de *P. mirabilis* AgNP biogênicas obtidas através de *Fusarium oxysporum* com tamanho médio de 126,3 nm também relatam uma CIM de 62,5µM (Saikawa *et al.*, 2024). Outros trabalhos evidenciam valores de CIM de até 7.8 µg/mL de AgNP (Kakian *et al.*, 2024). Por outro lado, pouquíssimos trabalhos avaliaram a atividade das AgNP contra *M. morganii*, tendo sido relatado CIM de 8 a 64 µg/mL de AgNP (Arsene *et al.*, 2016).

As AgNPs exercem sua ação antibiofilme principalmente prevenindo a adesão das células planctônica a uma superfície. Essa prevenção pode ocorrer diretamente pela inibição do crescimento bacteriano ou danos que ocasionam a própria lise celular.

A urease é um fator de virulência crucial para as infecções associadas à cateteres por *Proteus mirabilis*, o que torna sua urease um possível candidato para a atenuação ou limitação de suas patogenias.

Os íons Ag⁺ são conhecidos por terem a capacidade de inibir enzimas, principalmente se ligando a resíduos contendo cisteína. Esse fenômeno não seria diferente para a urease. Os íons Ag⁺ são capazes de se ligar principalmente nos resíduos αCys322 e αHis323 localizados no flap móvel do sítio catalítico, e no resíduo αMet367 da urease de *Sporosarcina pasteurii*, inibindo sua atividade através do bloqueio da movimentação do flap, necessário para a atividade hidrolítica da enzima (Mazzei *et al.*, 2018). Nenhum trabalho na literatura elucidou o mecanismo de inibição das AgNP sobre as ureases, entretanto, dado o tamanho da enzima (~4 nm), a alteração estrutural gerada pela interação física com a nanopartícula não pode ser

descartada como uma possível hipótese.

Nesse trabalho em questão, ainda que tenha havido diminuição de até >90% da densidade óptica no ensaio do fenol-nitroprussiato (ou indofenol), e portanto da concentração de amônia, a inibição da enzima propriamente dita não pode ser afirmada, uma vez que a ação pode não ter sido necessariamente sobre a proteína, mas sim ter agido sobre a célula bacteriana de tal forma que tenha alterado seu nível transcricional. Semelhante a este trabalho, Gurkok e Ozdal (2023) avaliaram a inibição da urease de *P. mirabilis* através da quantificação de amônia liberada por uma cultura em caldo nutriente contendo solução de ureia e AgNP. Dados semelhantes não foram encontrados para *M. morganii*, tendo em vista que é um patógeno oportunista de menor frequência nas ITUs. Entretanto, uma vez que *M. morganii* tenha levado à precipitação na urina artificial, sua potencial atividade de bloqueio não pode ser negligenciada.

Os autores supracitados observaram uma inibição de até 100% enquanto nesse trabalho a maior inibição foi de 99,83%. Essa diferença pode ter surgido do uso de caldo urina invés do de caldo nutriente suplementado com ureia, uma vez que a maioria dos ânions, como Cl⁻ e -OOC-COO⁻, utilizados na formulação do meio podem quelar os íons Ag⁺ livres, diminuindo a efetividade da prata, uma vez que os íons Ag⁺ são mais reativos que a prata reduzida na forma de Ag⁰, AgO ou AgCl.

Ainda nas maiores inibições, 99,83% para *P. mirabilis* e 99,43% para *M. morganii*, o caldo urina foi alcalinizado o suficiente pela amônia presente, precipitando os sais. É possível que isso tenha ocorrido porque a relação DO e concentração de NH₄ não é linear, sendo necessário, dessa forma, a construção de uma curva de calibração para quantificar corretamente a quantidade de amônia liberada e, assim, utilizá-la para avaliar a inibição da urease invés do uso da densidade óptica bruta.

Embora a maior concentração, de 250µM, tenha atingido 11% de taxa hemolítica, esse valor é levemente menor comparado aos de Huang e colaboradores (2016) que também analisaram as diferenças de taxa hemolítica entre AgNP@citrato e AgNP@PVP, indicando que o revestimento das AgNP também exerce efeito sobre sua atividade biológica *in vitro*.

O tamanho das nanopartículas é outro fator crucial na determinação da nanotoxicidade aos eritrócitos visto que a alta reatividade e transportabilidade de AgNP pequenas gerando danos mais severos na membrana citoplasmática dos

eritrócitos (Chen *et al.*, 2015).

O Scientific Committee for Consumer Safety estabelece que a determinação da atividade hemolítica é necessária para a aprovação de itens de consumo para humanos. A American Society for Testing and Materials considera que materiais com atividade hemolítica abaixo de 5% tem atividade hemolítica considerada nula, abaixo de 10%, baixa atividade hemolítica e acima, marcadamente hemolítica (Gómez *et al.*, 2021). Utilizando esse critério, podemos considerar que a atividade hemolítica das AgNP aqui sintetizadas também é dose-dependente e que as concentrações abaixo de 250µM tem atividade hemolítica nula.

6. CONCLUSÕES

Conforme resultados apresentados, foi possível sintetizar nanopartículas de cloreto de prata (AgCl@NP) a partir de um extrato de *Escherichia coli* atcc 25922, sendo essas nanopartículas de confirmada natureza cristalina, tamanho diminuto e alta estabilidade coloidal. As AgCl@NP também apresentaram atividade antimicrobiana para *P. mirabilis* e *M. morgani* semelhante à encontrada na literatura. Sua capacidade de inibir o processo de adesão e, portanto, inibição de biofilme e sua atividade antiurease também a torna potencial candidato para a prevenção de formação de biofilme em cateteres urinários. Futuros trabalhos são necessários para confirmar sua atividade antibiofilme e elucidar sobre sua atividade antiurease.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. et al. Analysis of Crystallographic Structures and Properties of Silver Nanoparticles Synthesized Using PKL Extract and Nanoscale Characterization Techniques. **ACS Omega**, v. 8, n. 31, p. 28133-28142, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01261>>. DOI:10.1021/acsomega.3c01261.
- ALI, R.; NAGALLI, S. Hyperammonemia. **StatPearls**, 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491436>>.
- ARCHANA; SHARMA, S. N.; SRIVASTAVA, R. Silver oxide nanoparticles synthesized by green method from *Artocarpus Hetrophyllus* for antibacterial and antimicrobial applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 28, p. 332–336, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221478532030986X>> .

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017>>.

DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.

Arsene *et al.* Antimicrobial activity of phytofabricated silver nanoparticles using *Carica papaya* L. against Gram-negative bacteria. **Veterinary World**, 2016. Disponível em: www.veterinaryworld.org/Vol.16/June-2023/17.pdf.

BAJRAMI, D.; HOSSAIN, S. I.; BARBAROSSA, A.; SPORTELLI, M. C. scalable route to quaternary ammonium-functionalized AgCl colloidal antimicrobials inhibiting food pathogenic bacteria and biofilms. **Heliyon**, v. 10, n. 3, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25260>>. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e25260.

BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of urease from jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 65, n. Pt 9, p. 949–951, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1107/S1744309109031662>>.

BAYLES, K. W. Bacterial programmed cell death: making sense of a paradox. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 63–69, 2014.

BELYAYEVA, M.; JEONG, J. M. Acute Pyelonephritis. **StatPearls**, 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30137822>>.

BENINI, S.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. Urease. In: KRETSINGER, R. H.; UVERSKY, V. N.; PERMYAKOV, E. A. **Encyclopedia of Metalloproteins**. New York (NY): Springer, 2013, p. 2287-2292. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6>>. DOI:10.1007/978-1-4614-1533-6.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W. R.; WILSON, K. S.; et al. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels. **Structure**, v. 7, n. 2, p. 205–216, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80026-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80026-4)>. DOI:10.1016/S0969-2126(99)80026-4.

BEYENE, H. D.; WERKNEH, A. A.; BEZABH, H. K.; AMBAYE, T. G. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. **Sustainable**

Materials and Technologies, v. 13, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214993717300106>>.
DOI:[10.1016/j.susmat.2017.08.001](https://doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001).

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>. DOI:[10.1016/j.jconrel.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017).

BONDARENKO, O. M. *et al.* Plasma membrane is the target of rapid antibacterial action of silver nanoparticles in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 6779– 6790, 2018. Disponível: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S177163>>. DOI:[10.2147/IJN.S177163](https://doi.org/10.2147/IJN.S177163).

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>>.

BROOMFIELD, R. J.; MORGAN, S. D.; KHAN, A.; STICKLER, D. J. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. **Journal of medical microbiology**, v. 58, p. 1367–1375, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.012419-0>>. DOI:[10.1099/jmm.0.012419-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.012419-0).

CHEN, Y.-T.; PENG, H.-L.; SHIA, W.-C.; *et al.* Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT pathogenicity-related genes. **BMC genomics**, v. 13 Suppl 7, n. Suppl 7, p. S4, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S7-S4>>. DOI:[10.1186/1471-2164-13-S7-S4](https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S7-S4).

COKER, C.; BAKARE, O. O.; MOBLEY, H. L. H-NS is a repressor of the *Proteus mirabilis* urease transcriptional activator gene ureR. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 9, p. 2649–2653, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2649-2653.2000>> DOI:[10.1128/JB.182.9.2649-2653.2000](https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2649-2653.2000).

CZERWONKA, G.; GUZY, A.; KAŁUŻA, K.; *et al.* The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 9, p. 877–884, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00203-016-1249-x>>. DOI:[10.1007/s00203-016-1249-x](https://doi.org/10.1007/s00203-016-1249-x).

DANA EI, *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027495/>>.

DOI:0.3390/pharmaceutics10020057

DANILO DE OLIVEIRA, W.; LOPES BARBOZA, M. G.; FAUSTINO, G.; et al. Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. **Microbial pathogenesis**, v. 152, p. 104642, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104642>>.

DOI:[10.1016/j.micpath.2020.104642](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104642).

DATTELBAUM, J. D.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. T. UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. **Infection and immunity**, v. 71, n. 2, p. 1026–1030, 2003. Disponível em:<<https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.1026-1030.2003>>. DOI:10.1128/IAI.71.2.1026 - 1030.2003.

DE REUSE, H.; SKOULOUBRIS, S. Nitrogen Metabolism. In: H. L. T. Mobley; G. L. Mendz; S. L. Hazell. **Helicobacter pylori: Physiology and Genetics**. Washington (DC): ASM Press, 2001. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290714>>.

DHANANJAYAN, V.; RAVICHANDRAN, B.; SEN, S.; PANJAKUMAR, K. Source, effect, and risk assessment of nanoparticles with special reference to occupational exposure. In: GRUMEZESCU, A. M. **Nanoarchitectonics in Biomedicine**. [s.l.]: Elsevier, 2019. p.643 - 676. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128162002000049>>. Acesso em: 06 jan. 2024.

DIXON et al. Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetoxhydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 97, p. 4130-4131, 1975. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ja00847a044>>. DOI:10.1021/ja00847a044.

DONG, Y.; SUN, X. Antibacterial Mechanism of Nanosilvers. **Current Pharmacology Reports**, v. 5, n.6, p. 401–409, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40495-019-00204-6>>. DOI:10.1007/s40495-019-00204-6.

DUMANSKI, A. J.; HEDELIN, H.; EDIN-LILJEGREN, A.; BEAUCHEMIN, D.; MCLEAN, R. J. Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in

infectious urinary calculi. **Infection and immunity**, v. 62, n. 7, p. 2998–3003, 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.62.7.2998-3003.1994>>. DOI:[10.1128/iai.62.7.2998-3003.1994](https://doi.org/10.1128/iai.62.7.2998-3003.1994).

DURÁN, M.; SILVEIRA, C. P.; DURÁN, N. Catalytic role of traditional enzymes for biosynthesis of biogenic metallic nanoparticles: a mini-review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 5, p. 314-323, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0054>>. DOI:0.1049/iet-nbt.2014.0054.

EZRATY, B.; GENNARIS, A.; BARRAS, F.; COLLET, J.-F. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 385–396, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>>. DOI:doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26.

FASNACHT, M.; POLACEK, N. Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 8, p. 671037, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037>>. DOI:[10.3389/fmolb.2021.671037](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037).

FILIPPOV et al. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. **Materials Horizons**, v. 10, p. 5354-5370, 2023. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/mh/d3mh00717k>>. DOI:[10.1039/D3MH00717K](https://doi.org/10.1039/D3MH00717K).

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>>. DOI: [10.1038/nrmicro.2016.94](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94).

FLORES-MIRELES, A. L.; WALKER, J. N.; CAPARON, M.; HULTGREN, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>>. DOI:[10.1038/nrmicro3432](https://doi.org/10.1038/nrmicro3432).

Fundação Nobel. Nobel Lectures Chemistry 1942-1962. Amsterdam: Elsevier, 1964.

GMITER, D; KACA, W. Into the understanding the multicellular lifestyle of *Proteus mirabilis* on solid surfaces. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 864305, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141711>>. DOI:[10.1371/journal.pone.0141711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141711)

GORANTLA, A.; KISHORE, A.; ZAMAN, A.; et al. Hyperammonemic Encephalopathy

Secondary to Urinary Tract Infection. **Cureus**, v. 14, n. 11, p. e31754, 2022. Disponível em: <<http://doi.org/10.7759/cureus.31754>>. DOI:10.7759/cureus.31754.

GUÉ, M.; DUPONT, V.; DUFOUR, A.; SIRE, O. Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR study of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. **Biochemistry**, v. 40, n. 39, p. 11938–11945, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/bi010434m>>. DOI: 10.1021/bi010434m.

HIETZSCHOLD, S. et al. Does Nitrate Reductase Play a Role in Silver Nanoparticle Synthesis? Evidence for NADPH as the Sole Reducing Agent. **Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, p. 8070-8076, 2019. Disponível: <<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00506>>. DOI:10.1021/acssuschemeng.9b00506.

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, v. 22, n. 3, p. 663–667, 1983. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86958-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86958-7)>. DOI:10.1016/S0031-9422(00)86958-7.

HOLLING, N.; LEDNOR, D.; TSANG, S.; et al. Elucidating the genetic basis of crystalline biofilm formation in *Proteus mirabilis*. **Infection and immunity**, v. 82, n. 4, p. 1616–1626, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01652-13>>. DOI:[10.1128/IAI.01652-13](https://doi.org/10.1128/IAI.01652-13).

HOLT, K. B.; BARD, A. J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. **Biochemistry**, v. 44, n. 39, p. 13214–13223, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi0508542>>. DOI:10.1021/bi0508542.

HOWERY, K. E.; CLEMMER, K. M.; RATHER, P. N. The Rcs regulon in *Proteus mirabilis*: implications for motility, biofilm formation, and virulence. **Current genetics**, v. 62, n. 4, p. 775–789, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00294-016-0579-1>>. DOI:[10.1007/s00294-016-0579-1](https://doi.org/10.1007/s00294-016-0579-1).

HU, L. T.; NICHOLSON, E. B.; JONES, B. D.; LYNCH, M. J.; MOBLEY, H. L. *Morganella morganii* urease: purification, characterization, and isolation of gene sequences. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3073–3080, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.172.6.3073-3080.1990>>. DOI:10.1128/jb.172.6.3073-3080.1990.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative

stress: lessons from a model bacterium. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n.7, p. 443–454, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>>. DOI:10.1038/nrmicro3032.

ISLAM, M. S.; LARIMER, C.; OJHA, A.; NETTLESHIP, I. Antimycobacterial efficacy of silver nanoparticles as deposited on porous membrane filters. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 33, n. 8, p. 4575–4581, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.013>>. DOI:10.1016/j.msec.2013.07.013

ISLAND, M. D.; MOBLEY, H. L. *Proteus mirabilis* urease: operon fusion and linker insertion analysis of ure gene organization, regulation, and function. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 19, p. 5653–5660, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5653-5660.1995>>. DOI:10.1128/jb.177.19.5653 - 5660.1995.

ITO, H.; NAKASHIMA, T.; OSHIDA, J.; et al. Obstructive pyelonephritis caused by the accidental malpositioning of a urethral catheter into the ureter: A case report. **JEM Reports**, v. 2, n. 2, p. 100041, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jemrpt.2023.100041>>. DOI:10.1016/j.jemrpt.2023.100041.

IZUMI et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2994–3001, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jm201451h>>. DOI:10.1021/jm201451h.

JAVAID, A.; OLOKETUYI, S. F.; KHAN, M. M.; KHAN, F. Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 8, p. 43-59, 2018. Disponível: <<https://doi.org/10.1007/s12668-017-0496-x>>. DOI:10.1007/s12668-017-0496-x.

JEWETT, B. E.; THAPA, B. Physiology, NMDA Receptor. **StatPearls**, 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30137779>>.

JIANG, S.-S.; LIU, M.-C.; TENG, L.-J.; et al. *Proteus mirabilis pmrl*, an RppA-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 1564–1571, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01219-09>>. DOI:[10.1128/AAC.01219-09](https://doi.org/10.1128/AAC.01219-09).

JOHNSON, D. E.; RUSSELL, R. G.; LOCKATELL, C. V.; et al. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model

of ascending urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 61, n. 7, p. 2748–2754, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/iai.61.7.2748-2754.1993>>.

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

JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6414–6422, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6414-6422.1989>>. DOI:10.1128/jb.171.12.6414 - 6422.1989.

JONES, G. L.; RUSSELL, A. D.; CALISKAN, Z.; STICKLER, D. J. A strategy for the control of catheter blockage by crystalline *Proteus mirabilis* biofilm using the antibacterial agent triclosan. **European urology**, v. 48, n. 5, p. 838–845, 2005. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.07.004>>. DOI:10.1016/j.eururo.2005.07.004.

JONES, S. M.; YERLY, J.; HU, Y.; CERI, H.; MARTINUZZI, R. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. **FEMS microbiology letters**, v. 268, n. 1, p. 16–21, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00587.x>>. DOI:[10.1111/j.1574-6968.2006.00587.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00587.x).

JUNG, H. D.; CHO, S.; LEE, J. Y. Update on the Effect of the Urinary Microbiome on Urolithiasis. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 5, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13050951>>. DOI:[10.3390/diagnostics13050951](https://doi.org/10.3390/diagnostics13050951).

KAKIAN *et al.* Determining the cytotoxicity of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of silver and zinc oxide nanoparticles in ESBL and carbapenemase *producing Proteus mirabilis* isolated from clinical samples in Shiraz, Southwest Iran. **BMC Research Notes**, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-023-06402-2>>. DOI:10.1186/s13104-023-06402-2.

KAPPAUN, K.; PIOVESAN, A. R.; CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties - A review. **Journal of advertising research**, v. 13, p. 3–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>>. DOI:10.1016/j.jare.2018.05.010.

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668–681, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>>. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016.

KIM, S.; LEE, D. G. Silver nanoparticles-induced H₂O₂ triggers apoptosis-like death and is associated with *dinF* in *Escherichia coli*. **Free radical research**, v. 55, n. 2, p. 107–118, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1866178>>. DOI:10.1080/10715762.2020.1866178.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 9–21, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>>. DOI:10.1016/j.molcatb.2009.01.003.

KONIECZNA, I. *et al.* Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. **Current protein & peptide science**, v. 13, n. 8, p. 789–806, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.2174/138920312804871094>>. DOI:10.2174/138920312804871094

KWIECINSKA-PIRÓG *et al.* *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1415-1421, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000400037>>. DOI:10.1590/S1517-83822014000400037.

LEE, S. H.; JUN, B-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20040865>>. DOI:10.3390/ijms20040865.

LESLIE, S. W.; SAJJAD, H.; MURPHY, P. B. Bladder Stones. **StatPearls**, 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

LILA, A. S. A.; RAJAB, A. A. H.; ABDALLAH, M. H.; *et al.* Biofilm Lifestyle in Recurrent Urinary Tract Infections. **Life**, v. 13, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390/life13010148>>.

LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 6, p. 2169–2175, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es9035557>>. DOI:10.1021/es9035557.

LIU, H.; ZHU, J.; HU, Q.; RAO, X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. **International journal of infectious diseases**, v. 50, p. 10–17, 2016.

GOMEZ, R. L. V.; ARELLANO, E.; GARCÍA-RAMOS, J. C.; RADILLA-CHÁVEZ, P. Hemolysis of Human Erythrocytes by Argovit™ AgNPs from Healthy and Diabetic Donors: An In Vitro Study. **Materials**, v. 14, n. 11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ma14112792>> DOI:10.3390/ma14112792

MABEY, T.; CRISTALDI, D. A.; OYSTON, P.; LYMER, K. P.; STULZ, E.; WILKS, S. Bacteria and nanosilver: the quest for optimal production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1555130>>.

DOI:10.1080/07388551.2018.1555130.

MALIK, T. F.; GNANAPANDITHAN, K.; SINGH, K. Peptic Ulcer Disease. **StatPearls**, 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30521213>>.

MAZZEI et al. Structure of urease inactivated by Ag(I): a new paradigm for enzyme inhibition by heavy metals. **Dalton Transactions**, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8DT01190G>>. DOI:10.1039/C8DT01190G.

MAZZEI, L.; MUSIANI, F.; CIURLI, S. The structure-based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 25, p. 829–845, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s00775-020-01808-w>>. DOI:10.1007/s00775-020-01808-w.

MEKONNEN, E.; KEBEDE, A.; NIGUSSIE, A.; KEBEDE, G.; TAFESSE, M. Isolation and Characterization of Urease-Producing Soil Bacteria. **International journal of microbiology**, v. 2021, p. 8888641, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2021/8888641>>. DOI:10.1155/2021/8888641.

MIKHAILOVA, E. O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 4, p. 84, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/jfb11040084>>. DOI:10.3390/jfb11040084.

MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989. Disponível em: <<http://doi.org/10.1128/mr.53.1.85-108.1989>>.

DOI:10.1128/mr.53.1.85-108.1989.

MOLLEMAN, B.; HIEMSTRA, T. Surface Structure of Silver Nanoparticles as a Model for Understanding the Oxidative Dissolution of Silver Ions. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 31, n. 49, p. 13361–13372, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03686>>. DOI:10.1021/acs.langmuir.5b03686.

MOLLEMAN, B.; HIEMSTRA, T. Time, pH, and size dependency of silver nanoparticle dissolution: the road to equilibrium. **Environmental Science: Nano**, v. 4, p. 1314, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/c6en00564k>>. DOI:10.1039/c6en00564k.

MUN, B. G.; LEE, J. H.; PARK, Y. S.; JUNG, J. A Case of Severe Hyperammonemic Encephalopathy Caused by Urinary Tract Infection in Obstructive Uropathy. **Childhood Kidney Diseases**, v. 25, n. 2, p. 112–116, 2021. Korean Society of Pediatric Nephrology. Disponível em: <<https://chikd.org/journal/view.php?id=10.3339/jkspn.2021.25.2.112>>.

MUTHUKUMARASAMY, S. et al. Extracellular synthesis of polygonal silver nanoparticles using extract of *Escherichia coli* ATCC 25922 and its antibacterial activities. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, v. 7, n. 4, p. 1419-1426, 2012. Disponível em: https://www.chalcogen.ro/1419_Muthukumarasamy.pdf ,

NICOLLE, L. E. Catheter associated urinary tract infections. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 3, p. 23, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1186/2047-2994-3-23>>. DOI:0.1186/2047-2994-3-23

NORENBERG, M. D.; RAO, K. V. R.; JAYAKUMAR, A. R. Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. **Metabolic brain disease**, v. 20, n. 4, p. 303–318, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-005-7911-7>>.

OKYAY, Tugba Onal; RODRIGUES, Debora Frigi. High throughput colorimetric assay for rapid urease activity quantification. Journal of microbiological methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 324-326, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.018>>. DOI:10.1016/j.mimet.2013.09.018.

O'MAY, G. A.; JACOBSEN, S. M.; LONGWELL, M.; et al. The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 5, p. 1523–1535, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.026500-0>>. DOI:10.1099/mic.0.026500-0.

PADAPPAYIL, R. P.; BORGER, J. Ammonia Toxicity. **StatPearls**, 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31536283>>.

PEARSON, M. M.; YEP, A.; SMITH, S. N.; MOBLEY, H. L. T. Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression. **Infection and immunity**, v. 79, n. 7, p. 2619–2631, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05152-11>>. DOI:[10.1128/IAI.05152-11](https://doi.org/10.1128/IAI.05152-11).

PENG, L.; JIANG, Q.; PAN, J.-Y.; et al. Involvement of polyphosphate kinase in virulence and stress tolerance of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **Medical microbiology and immunology**, v. 205, n. 2, p. 97–109, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00430-015-0430-1>>. DOI:[10.1007/s00430-015-0430-1](https://doi.org/10.1007/s00430-015-0430-1).

POORE, C. A.; MOBLEY, H. L. T. Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 12, p. 3383–3394, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/mic.0.26624-0>>. DOI: 10.1099/mic.0.26624-0.

POLACCO, J. C.; HOLLAND, M. A. Roles of Urease in Plant Cells. In: K. W. Jeon; J. Jarvik (Orgs.); **International Review of Cytology**. v. 145, p.65–103, 1993. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608604258>>.

QUINTEROS, M. A.; VIVIANA, C. A.; ONNAINTY, R.; et al. Biosynthesized silver nanoparticles: Decoding their mechanism of action in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 104, p. 87–93, 2018. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272518301997?via%3Dihub>>. DOI:0.1016/j.biocel.2018.09.006.

RADZIG, M. A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; et al. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 300–306, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512004341?via%3Dihub>>. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.07.039

RAMALINGAM, B.; PARANDHAMAN, T.; DAS, S. K. Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 7, p. 4963–4976, 2016. Disponível: <<https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161>>. DOI:[10.1021/acsami.6b00161](https://doi.org/10.1021/acsami.6b00161)

.RATKALKAR, V. N.; KLEINMAN, J. G. Mechanisms of Stone Formation. **Clinical reviews in bone and mineral metabolism**, v. 9, n. 3-4, p. 187–197, 2011. Disponível: <<https://doi.org/10.1007/s12018-011-9104-8>>. DOI: 10.1007/s12018-011-9104-8.

REAL-GUERRA, R.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Soybean Urease: Over a

Hundred Years of Knowledge. *In*: BOARD, James E. A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships. **InTech**, 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/3245>>.

ROKITA, E.; MAKRISTATHIS, A.; PRESTERL, E.; ROTTER, M. L.; HIRSCHL, A. M. *Helicobacter pylori* urease significantly reduces opsonization by human complement. **The Journal of infectious diseases**, v. 178, n. 5, p. 1521–1525, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/314459>. DOI: 10.1086/314459.

ROSE, C.; PARKER, A.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 45, n. 17, p. 1827–1879, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10643389.2014.1000761>>. DOI:10.1080/10643389.2014.1000761.

RUTHERFORD, J. C. The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004062>>. DOI:10.1371/journal.ppat.1004062.

SAIKAWA et al. Green-Synthesized Silver Nanoparticles in the Prevention of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Infection and Incrustation of Urinary Catheters BioAgNPs Against *P. mirabilis* Infection. **Current Microbiology**, v. 81, n. 100, 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-024-03616-w#Sec17>>. DOI:10.1007/s00284-024-03616-w

SANCHES, M. S.; RODRIGUES DA SILVA, C.; SILVA, L. C.; et al. *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. **Microbial pathogenesis**, v. 158, p. 105098, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105098>>. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105098](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105098).

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>>. DOI: [10.1038/s41579-022-00767-0](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0).

SCAVONE, P.; IRIBARNEGARAY, V.; CAETANO, A. L.; et al. Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 5, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw033>>. DOI:10.1093/femspd/ftw033.

SEONG, M.; LEE, D. G. Silver Nanoparticles Against *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium: Role of Inner Membrane Dysfunction. **Current microbiology**, v. 74, n. 6, p. 661–670, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-017-1235-9>>. DOI:10.1007/s00284-017-1235-9.

SEIXAS, A. F.; QUENDERA, A. P.; SOUSA, J. P.; et al. Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation. **Frontiers in genetics**, v. 12, p. 821535, 2021.

SILVA, L. C.; SANCHES, M. S.; GUIDONE, G. H. M.; et al. Clonal relationship, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Morganella morganii* isolated from community-acquired infections and hospitalized patients: a neglected opportunistic pathogen. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10123-023-00400-x>>. DOI:10.1007/s10123-023-00400-x.

SINGH, A. K.; SINGH, M.; VERMA, N. Extraction, Purification, Kinetic Characterization and Immobilization of Urease from *Bacillus sphaericus* MTCC 5100. **Biocatalysis and Agricultural biotechnology**, v. 12, p. 341-347. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.020>>. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.10.020.

SINGH, R.; SHEDBALKAR, U. U.; WADHWANY, S. A.; CHOPADE, B. A. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4579-4593, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>>. DOI:10.1007/s00253-015-6622-1.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 12, p. 341-347, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.10.020>>. DOI:10.1016/j.bcab.2017.10.020.

STICKLER, D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **Journal of internal medicine**, v. 276, n. 2, p. 120–129, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/joim.12220>>. DOI:10.1111/joim.12220.

STICKLER, D. J. *Proteus mirabilis* biofilm formation and catheter design. In: J. Denstedt; A. Atala (Orgs.); **Biomaterials and Tissue Engineering in Urology**. p.157–190, 2009. Woodhead Publishing. Disponível

em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845694029500075>>.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **The Journal of biological chemistry**, v. 69, n. 2, p. 435–441, 1926. Elsevier BV. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818845604>>.

THAKORE, P.; LIANG, T. H. Urolithiasis. **StatPearls**, 2023. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

TORZEWSKA, A.; GRABOWSKI, S.; KONDAKOVA, A. N.; et al. Structures and serology of the O-antigens of *Proteus* strains classified into serogroup O17 and former serogroup O35. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 54, n. 4, p. 277–282, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00005-006-0031-1>>. DOI:[10.1007/s00005-006-0031-1](https://doi.org/10.1007/s00005-006-0031-1).

TRINH, N. D.; NGUYEN, T. T. B.; NGUYEN, T. H. Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 4, p. 045011, 2015. IOP Publishing. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6262/6/4/045011>>. DOI:10.1088/2043-6262/6/4/045011.

VAN SLYKE, Donald D.; CULLEN, Glenn E. The mode of action of urease and of enzymes in general. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 19, n. 2, 1914. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)88300-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)88300-4)>. DOI:10.1016/S0021-9258(18)88300-4.

WALKER, V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. **Advances in clinical chemistry**, v. 67, p. 73–150, 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.09.002>>. DOI:10.1016/bs.acc.2014.09.002.

WANG, M.-C.; CHIEN, H.-F.; TSAI, Y.-L.; LIU, M.-C.; LIAW, S.-J. The RNA chaperone Hfq is involved in stress tolerance and virulence in uropathogenic *Proteus mirabilis*. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85626, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085626>>. DOI:[10.1371/journal.pone.0085626](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085626).

WAYNE P. CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 11th ed. standard. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018

WAYNE P. NCCLS. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline**. 1st ed. standard. CLSI document M26-

A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971–974, 1967. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac60252a045>>. DOI:10.1021/ac60252a045.

WHITE, A. N.; LEARMAN, B. S.; BRAUER, A. L.; ARMBRUSTER, C. E. Catalase Activity is Critical for *Proteus mirabilis* Biofilm Development, Extracellular Polymeric Substance Composition, and Dissemination during Catheter-Associated Urinary Tract Infection. **Infection and immunity**, v. 89, n. 10, p. e0017721, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00177-21>>. DOI:10.1128/IAI.00177-21.

WILKS, S. A.; FADER, M. J.; KEEVIL, C. W. Novel Insights into the *Proteus mirabilis* Crystalline Biofilm Using Real-Time Imaging. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0141711, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141711>>. DOI: 10.1371/journal.pone.0141711.

XIA, S.; ZHANG, Z.; WANG, X.; et al. Production and characterization of a bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6520–6527, 2008. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407009662>>

YIN, I. X.; ZHANG, J.; ZHAO, I. S.; et al. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International journal of nanomedicine**, v. 15, p. 2555–2562, 2020.

YOHEI, K.; TAKEHIRO, O.; RYUSUKE, D. Hyperammonemic encephalopathy with septic shock caused by obstructive urinary tract infection. **IDCases**, v. 14, p. e00436, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.idcr.2018.e00436>>. DOI:10.1016/j.idcr.2018.e00436.

YOUNG, G. M.; AMID, D.; MILLER, V. L. A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6487–6495, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jb.178.22.6487-6495.1996>>. DOI: 10.1128/jb.178.22.6487-6495.1996.

ZAHOOR, M. et al. A Review on Silver Nanoparticles: Classification, Various Methods of Synthesis, and Their Potential Roles in Biomedical Applications and Water Treatment. **WATER**, v. 13, n. 16, p. 2216, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/13/16/2216>>. DOI:10.1016/j.susmat.2017.08.001.

ZHANG, Z.; XIA, S.; WANG, X.; et al. A novel biosorbent for dye removal: extracellular

polymeric substance (EPS) of *Proteus mirabilis* TJ-1. **Journal of hazardous materials**, v. 163, n. 1, p. 279–284, 2009. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.096>>.DOI:[10.1016/j.jhazmat.2008.06.096](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.096)