



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO CALDO
FERMENTADO DE *PAENIBACILLUS POLYMYXA* E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Luís Fernando Rocha Oliveira

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

bolsista CAPES, 88887.495797/2020-00

**São Carlos – SP
2023**

Luís Fernando Rocha Oliveira

**NANOFIBRAS ELETROFIADAS CONTENDO CALDO FERMENTADO DE
PAENIBACILLUS POLYMYXA E NANOPARTÍCULAS DE PRATA:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
Embrapa Instrumentação São Carlos - SP

Prof^a. Dra. Luiza Amim Mercante
Universidade Federal da Bahia - BA

Prof^a. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos -SP

São Carlos
2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Rosana e Roberto, que me deram a vida, educação e condições para estar onde estou. Sempre me incentivaram a seguir meus caminhos e nunca se opuseram nas minhas decisões. Mesmo quando o resultado não era o esperado, estavam ali para me apoiar. Se conclui mais uma etapa na minha vida, foi graças a vocês.

Em seguida agradeço a minha irmã, Maria Clara, que sempre foi uma das minhas melhores amigas mesmo de longe e foi muito importante ao longo desses anos de mestrado. Agradecer ao Matheus e o Lucas, meus amigos que foram minha família em São Carlos durante a pandemia e ajudaram a suavizar momentos difíceis. Citando família, não posso deixar de agradecer ao Guilherme, que foi um dos maiores incentivos para mim nessa reta final, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Daniel Corrêa, muito obrigado pela orientação ao longo desses anos, aprendi muito não só como pesquisador, mas também como pessoa. Sem dúvidas foi um período de muito crescimento e fico feliz de fazer parte desse grupo de pesquisa, que também me auxiliou muito e devo muitos agradecimentos a todos, em especial para as Dra. Rafaela Andre e Kelcilene Teodoro, que me deram apoio quando mais precisei durante o trabalho.

A Prof^a Dra. Cristina Paiva e seu grupo de pesquisa, agradeço muito pela ajuda e incentivo durante meu trabalho, além da colaboração com o fornecimento das cepas aqui utilizadas. Muito obrigado também aos membros da banca que aceitaram fazer parte desse ponto crucial para minha formação.

Muito obrigado a todos os funcionários da EMBRAPA, às técnicas e técnicos de laboratório que sempre foram muito solícitos e pessoas agradáveis e aos funcionários da limpeza e manutenção, que nos propiciam um ambiente adequado de trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.495797/2020-00.

Oliveira, Luís Fernando Rocha. **Nanofibras Eletrofiadas Contendo Caldo Fermentado de *Paenibacillus polymyxa* e Nanopartículas de Prata: Produção, Caracterização e Avaliação da Atividade Antimicrobiana**. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023.

RESUMO

Feridas crônicas não possuem tempo definido para recuperação, ocasionando complicações que podem eventualmente levar o paciente a óbito. Este cenário, somado ao crescente número de casos de bactérias multirresistentes, tem fortalecido o interesse na pesquisa de novos antimicrobianos e em formas mais eficientes para aplicá-los. Mantas formadas por nanofibras eletrofiadas são plataformas interessantes para aplicações na liberação lenta de fármacos e em curativos, pois possuem características como grande área superficial e porosidade, facilitando a adesão e motilidade de células na região da ferida. Neste trabalho foi realizada a incorporação do caldo fermentado liofilizado de *Paenibacillus polymyxa* (CFP) em mantas dos polímeros poli(álcool vinílico) e poli(caprolactona), polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, produzidas através da técnica de eletrofiação. As mantas bicamadas de PVA/PCL eletrofiadas com CFP apresentaram menos defeitos nas fibras e através da técnica de FTIR foi possível constatar que houve incorporação do CFP, porém as amostras apresentaram baixa atividade antimicrobiana mesmo nas concentrações mais altas de CFP. Visando melhorar a bioatividade, foram realizadas modificações superficiais nas mantas usando nanopartículas de prata (AgNPs), nanoestruturas já conhecidas pela sua potente atividade antimicrobiana. Entre as amostras modificadas por aspersão e imersão, as últimas apresentaram uma melhor resposta antimicrobiana, porém o método levava a diluição PVA. Ao remover o PVA da formulação, foram obtidas mantas de PCL/CFP25%, que modificadas com AgNP por imersão, apresentaram a melhor atividade antimicrobiana do trabalho. Além disso, a incorporação do CFP apresentou melhorias nas características do PCL, como uma melhor molhabilidade e formação de fibras mais homogêneas, indicando o potencial dessas nanofibras para continuidade dos estudos para aplicações em curativos de pele.

Palavras-chave: Caldo fermentado; Antimicrobiano; Nanofibras; Eletrofiação.

Oliveira, Luís Fernando Rocha. **Electrospun Nanofibers Containing *Paenibacillus polymyxa* Fermented Broth and Silver Nanoparticles: Production, Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity.** 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2023

ABSTRACT

Chronic wounds do not have a defined time for recovery, causing complications that can eventually lead patients to death. This scenario, added to the growing number of cases of multidrug-resistant bacteria, has strengthened interest in researching new antimicrobials and in more efficient ways to apply them. Mats formed by electrospun nanofibers are interesting platforms for applications in slow release of drugs and in wounds dressings, as they have characteristics such as large surface area and porosity, facilitating the adhesion and motility of cells in the wound region. In this work, the lyophilized fermented broth of *Paenibacillus polymyxa* (CFP) was incorporated into polymeric mats of poly(vinyl alcohol) and poly(caprolactone), biocompatible and biodegradable polymers, produced through the electrospinning technique. PVA/PCL bilayer electrospun mats loaded with CFP showed fewer fiber defects and through the FTIR technique, it was possible to verify that the CFP was successfully merged into the mats produced of PVA/PCL/CFP, however, the samples showed low antimicrobial activity even at the highest concentrations of CFP. In order to improve bioactivity, surface modifications were made on the mats using silver nanoparticles (AgNPs), nanostructures already known for their potent antimicrobial activity. Among the samples modified by spraying and immersion, the latter showed a better antimicrobial response, however the method led to PVA dilution. By removing the PVA from formulation, PCL/CFP25% mats were obtained, which modified with AgNP by immersion, showed the best antimicrobial activity of the work. In addition, the incorporation of CFP showed improvements in the characteristics of PCL, such as better wettability and formation of more homogeneous fibers, indicating the potential of these nanofibers for further studies for applications in skin dressings.

Keywords: Fermented broth; Antimicrobial; Nanofibers; Electrospinning.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema de um sistema de eletrofiação (Reproduzido com permissão da referência Mercante *et al.*, 2021) [1748](#)
- Figura 2:** Estrutura química dos polímeros **A)** PCL e **B)** PVA. [1920](#)
- Figura 3:** Fluxograma da produção do caldo fermentado obtido através do cultivo misto de *Paenibacillus polymyxa* e *Staphylococcus aureus*. Após 24h de reativação em meio líquido na estufa, as bactérias são plaqueadas e crescem em estufa por 48h. Em seguida, colônias isoladas são selecionadas e transferidas para novo cultivo em meio líquido por 24h, mas em shaker com rotação em 180rpm. Por fim, 5% (v/v) de *P. polymyxa* e 0,1% (v/v) são transferidos para o mesmo erlenmeyer, permanecendo em agitação de 180 rpm por 168h. Os meios descritos na imagem são Caldo Triptona de Soja (TSB), Ágar Triptona de soja (TSA) e *International Streptomyces Project-2* (ISP2). [2324](#)
- Figura 4:** Representação da placa de 96 poços utilizadas para o teste de micro diluição. Na Linha **A** foi feito o controle de esterilidade do meio; a linha **B** foi usada para verificar a viabilidade da bactéria; na linha **C** foi realizada diluição seriada de solução de sulfato de estreptomicina como controle positivo; enquanto na linha **D** foi realizada diluição seriada do CFP para verificar a esterilidade da amostra; por fim, das colunas **E** até **G** foram realizadas as triplicadas para o ensaio de concentração inibitória mínima. Na diluição seriada, é colocado no primeiro poço de cada linha a maior concentração do caldo, que vai sendo diluído nos poços seguintes. Fonte: Cavicchioli 2020. [2526](#)
- Figura 5:** Fotografia digital (vista superior) do frasco contendo o caldo fermentado do cultivo de *P. polymyxa* em conjunto com *S. aureus* após liofilização. [3334](#)
- Figura 6:** Resultados do teste de CIM contra **A)** *E. coli* e **B)** *S. aureus*. A coloração rosa representa presença de atividade celular. A concentração do CFP na primeira coluna foi de 20 mg/mL, sendo reduzida pela metade a cada coluna e feito em triplicata, nas linhas **E**, **F** e **G**. A linha **B** onde foi colocado apenas o microrganismo testado comprovou a viabilidade através da coloração, enquanto as linhas **A**, **C** e **D** - esterilidade do meio, controle positivo e esterilidade da amostra, respectivamente - não apresentaram crescimento de microrganismos. [3435](#)
- Figura 7:** Espectros de FTIR de **A)** CFP, PVA e PVA/CFP; **B)** CFP, PCL e PCL/CFP. [3637](#)
- Figura 8:** Imagens de MEV com magnificação de x10.000. **A)** PVA 10%; **B)** PCL 10%; **C)** PVA 25%; **D)** PCL 25%. [3839](#)
- Figura 9:** Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão da manta PVA/PCL/CFP 25% (de **A** até **D**) e controles (**E** até **H**). Na primeira coluna estão as placas dos ensaios contra *E. coli* e na segunda coluna contra *E. aureus*. [3940](#)

Figura 10: Imagens de MEV-FEG das mantas de nanofibras após imersão por 24 horas. **A)** C20@iCAg (x 10.000); **B)** C25@iCAg (x10.000) ; **C)** C10@iC (x20.000). [4142](#)

Figura 11: Imagens de MEV de mantas após imersão. Tanto as amostras das imagens **A)** PCL puro quanto **B)** PCL/CFP 25% ficaram imersas em água por 24 horas (ambas x 5000); **C)** Manta de PVA após 2 horas de imersão em água (x500) **D)** Manta de PCL após 24 h. [4243](#)

Figura 12: Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das amostras C25@iAg (**A** e **B**), C25@iCAg (**C** e **D**) e controles (**E** a **G**). Nas placas contendo 6 discos, os 3 superiores são de discos com o lado do PVA em contato com o ágar, enquanto os 3 inferiores estão com o lado do PCL. [4445](#)

Figura 13: Imagens de MEV de mantas de nanofibras após procedimento de aspersão. As figuras **A)** e **B)** são imagens em diferentes magnificações (x500 e x5000, respectivamente) da amostra C25@aCAg; **C)** e **D)** são imagens da amostra C25@aAg nas mesmas magnificações. [4546](#)

Figura 14: Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das amostras C25@aCAg (Figuras **A** e **B**), C25@aAg (Figuras **C** e **D**) e controles (**E** a **H**). Nas placas contendo 6 discos, os 3 superiores são de discos com o lado do PVA em contato com o ágar, enquanto os 3 inferiores estão com o lado do PCL. [4647](#)

Figura 15: Espectros de FTIR **A)** da manta de PCL/CFP 25% e das amostras **B)** PPag, **C)** PPcf e **D)** PPcf+ag. [4748](#)

Figura 16: Espectros de FTIR **A)** da manta de PCL e das amostras **B)** Pag, **C)** Pcf e **D)** Pcf+ag. [4849](#)

Figura 17: Imagens de MEV das mantas **A)** PCL/CFP 25% e **B)** PCL, ambas na magnificação de x10.000. [4849](#)

Figura 18: Imagens de MEV das amostras **A)** PPc, **B)** PPag e **C)** PPcf+ag na magnificação de x10.00. **D)** Imagens de MEV com Magnificação de x2.500 da amostra PPcf+ag. [4950](#)

Figura 19: Angulo de contato das mantas de PCL/CFP 25% e PCL. As Figuras **A)** e **B)** mostram a manta de PCL nos momentos 4,52s e 59,52s, respectivamente. As Figuras **C)** e **D)** foram capturadas nos mesmos momentos de medição para as mantas de PCL/CFP 25%. [5054](#)

Figura 20: Fotografias das placas do teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das mantas **A)** PCL/CFP 25% e **E)** PCL, além das amostras **B)** PPcf, **C)** PPcf+ag, **D)** PPag, **F)** Pcf, **G)** Pcf+ag e **H)** Pag. [5152](#)

Figura 21: **A)** Amostra PPag em placa contendo *E. coli* foi capaz de formar um pequeno halo de inibição **B)** com tamanho aproximado de 1,5cm, conforme é possível visualizar na figura acima. [5253](#)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros de eletrofição utilizados para produzir mantas de PCL adaptados do trabalho de Santos *et al.* (2018). Mantas sem o caldo fermentado também passaram pelas mesmas condições de produção.....27
- Tabela 2:** Parâmetros de eletrofição utilizados para produzir mantas de PVA. Adaptados do trabalho de Santos *et al.* (2020). As mantas de PVA produzidas sem o caldo fermentado foram fiadas usando uma voltagem de 18kV.....28
- Tabela 3:** Composição das amostras de mantas bicamada (PVA/PCL) modificadas por imersão. Na primeira coluna estão as mantas usadas para produção das amostras, contendo CFP no interior das fibras em diferentes concentrações descritas em % (m/m), seguida pela composição da solução em que a manta foi imergida e por fim, o nome da amostra. A porcentagem de CFP no bulk é dada em relação a massa de polímero na solução.....29
- Tabela 4:** Composição das soluções utilizadas para modificar a superfície de mantas de PCL/CFP e PCL. Na primeira coluna está o nome da manta usada, em seguida, a solução em que ficaram imersas por 24 horas e por fim, o nome da amostra.....30
- Tabela 5:** Composição das mantas bicamada modificadas aspensão. Na primeira coluna estão as mantas usadas para produção das amostras, contendo CFP no interior das fibras em diferentes concentrações descritas em % (m/m), seguida pela composição da solução em que a manta foi imergida e por fim, o nome da amostra. A porcentagem de CFL no bulk é dada em relação a massa de polímero na solução.....31
- Tabela 6:** Parâmetros utilizados no equipamento de fiação por sopro para aspensão das soluções nas mantas. Para todas as amostras, foram utilizados os mesmos parâmetros32
- Tabela 7:** Medidas das nanofibras de PVA e PCL das mantas produzidas com diferentes concentrações do CFP.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – Peptídeo antimicrobiano

CTT - Cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio

CFP – Caldo fermentado liofilizado de *Paenibacillus polymyxa* (produzido em co-cultivo com *S. aureus*).

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

ISP2 - *International Streptomyces Project-2*

MEV - Microscópio eletrônico de varredura.

MEV-FEG - microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

PCL - Policaprolactona

PVA – Poli(álcool vinílico)

Ti – Temperatura Inicial

Tf – Temperatura Final

Tmax – Temperatura Máxima

TG – Termogravimetria

dTG – Termogravimetria Derivada

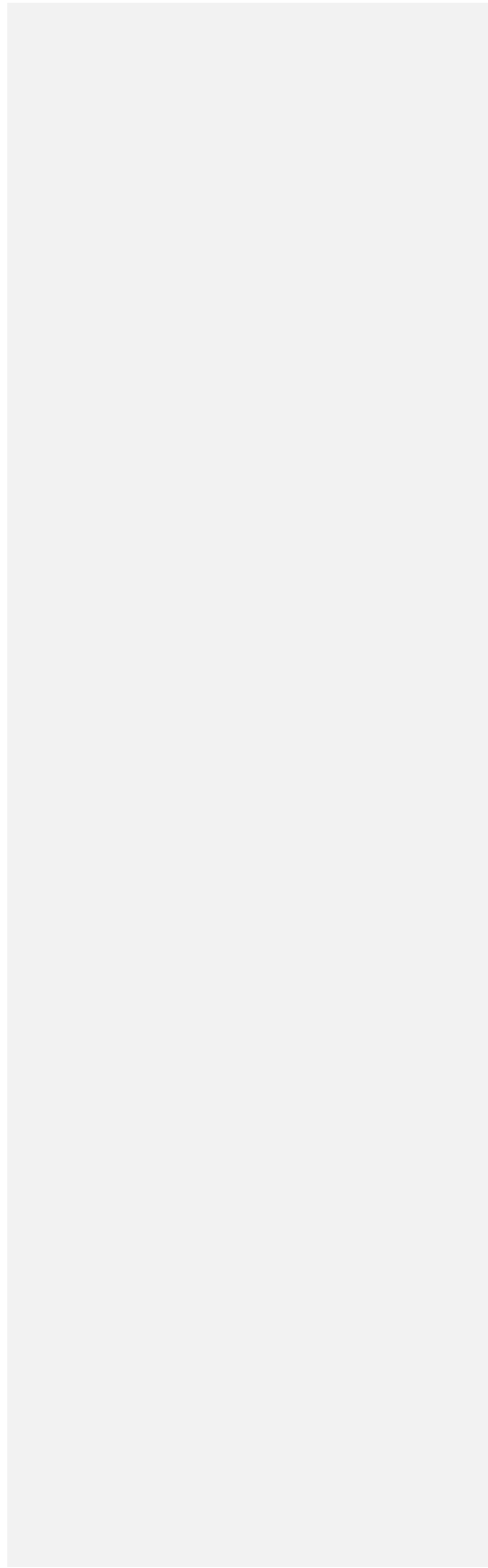
TGA – Análise Termogravimétrica

TSA – Ágar Triptona de soja

TSB – Caldo Triptona de soja

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1044
1.1. Referencial Teórico	1243
1.1.1. Antimicrobianos	1243
1.1.2. Produtos Naturais e Novas abordagens	1344
1.1.3. Nanopartículas de Prata	1546
1.1.4. Mantas de nanofibras eletrofiadas para liberação lenta de compostos ativos	17
1.2. Objetivos	2024
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	2122
2.1. Materiais.....	2122
2.2. Condições de cultivo e produção do caldo fermentado de <i>P. polyxmyxa</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	2122
2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	2324
2.4. Preparo das soluções poliméricas e das mantas eletrofiadas.....	2526
2.5. Produção de nanopartículas de prata (AgNP).....	2728
2.6. Modificação Superficial das Mantas	2728
2.6.1. Modificação por imersão	2728
2.6.2. Modificação por aspersão	2930
2.7. Caracterização das mantas de nanofibras	31
2.7.1. Caracterização físico-química	31
2.7.2. Caracterização microbiológica	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	3334
3.1. Obtenção do caldo fermentado liofilizado e teste CIM	3334
3.2. Caracterização Físico-química e Microbiológica	3536
3.2.1. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP (Sem modificação superficial)	3536
3.2.2. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP modificadas por imersão.....	4044
3.2.3. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP modificadas por aspersão.....	4546
3.2.4. Caracterização de mantas de PCL/CFP modificadas por imersão	4748
4. Considerações Finais	5354
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	5455



1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, tendo aproximadamente 2 m² de área e espessura média de 2,5 mm. Intimamente ligada ao endo esqueleto subjacente, esse órgão compreende 3 camadas: epiderme, derme e hipoderme (Ambekar e Kandasubramanian, 2019; Graça e Melo-Diogo, 2021). Suas funções são diversas: regulação térmica, prevenção de perda de água e fluidos, percepção sensorial, dentre outras. Adicionalmente, devido à sua localização, age também como uma barreira física entre o corpo e o ambiente, protegendo contra infecção de microrganismos e danos químicos e mecânicos (Rigopoulos *et al.*, 2010; Graça e Melo-Diogo, 2021).

Quando acontece um choque físico, químico ou mecânico contra a pele, danificando sua estrutura e consequentemente impedindo o órgão de desempenhar seu papel biológico, tem-se a formação de uma ferida (Ambekar e Kandasubramanian, 2019; Lazarus, 1994). As feridas mais comuns são aquelas classificadas como agudas, que se recuperam em menos de 12 semanas, seguindo normalmente o processo de cicatrização do corpo (Percival, 2002; Zeng *et al.*, 2018). Já as feridas classificadas como crônicas são aquelas que não possuem um tempo determinado de recuperação, podendo acompanhar o paciente por anos (Ambekar e Kandasubramanian, 2019). Elas acontecem quando os mecanismos de recuperação estão comprometidos, sejam por fatores ambientais, como surgimento de infecções, ou por problemas na fisiologia natural do corpo, como em pessoas com diabetes mellitus (Gizaw *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2018). Apesar de parecerem inofensivas, feridas, principalmente as crônicas, representam um grave problema de saúde, ocasionando anualmente elevados gastos governamentais e afetando a vida de milhões de pessoas (Renwick *et al.*, 2015; Sen *et al.*, 2009).

Existem poucos estudos que demonstrem os danos, os custos e a ocorrência real de feridas crônicas globalmente, principalmente por que a definição dessa nomenclatura não é um consenso, além de cada país usar formas e métodos diferentes de avaliação (Kyaw *et al.*, 2018; Werdin *et al.*, 2009). Em uma análise de dados globais, Martinengo e colaboradores (2018) fizeram um levantamento de diversos trabalhos e relatórios contendo dados sobre o acometimento de feridas crônicas na população. Eles concluíram que

feridas crônicas no geral podem atingir cerca de 0,22% da população global, entretanto ressaltam que esses valores podem não ser reais, uma vez que não foram encontrados muitos trabalhos, principalmente de países em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, dados de 2015 apontam que as feridas crônicas podem custar anualmente cerca de US\$ 20 bilhões e afetar em média 5,7 milhões de pessoas, sendo que o aumento de casos de diabetes, obesidade e o envelhecimento da população levam a prever que esses números irão aumentar em um futuro próximo (Boateng e Catanzano, 2015; Järbrink *et al.*, 2017; Menke *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2009).

Diante desse cenário, novas estratégias para tratamento de feridas têm sido estudadas, buscando principalmente a redução de custo e respostas mais adequadas para o paciente. O processo de eletrofição, por exemplo, é uma técnica de baixo custo, capaz de produzir mantas com características similares às fibras de tecidos biológicos, além de serem bons carreadores de fármacos tanto no seu interior quanto na sua superfície (Santos *et al.*, 2020a; Xue *et al.*, 2019). Essas características têm atraído o interesse para o uso de mantas eletrofiadas, principalmente aquelas obtidas a partir de materiais biocompatíveis e biodegradáveis como curativos inteligentes (Ballesteros e Correa, 2020; Locilento *et al.*, 2019).

Levando em consideração as informações dadas acima, este trabalho buscou produzir mantas nanofibras poliméricas constituídas por PVA e PCL, além do caldo fermentado da bactéria *Paenibacillus polymyxa* e por fim, foi realizada modificação superficial com soluções de nanopartículas de prata e CFP. A cepa de *P. polymyxa* faz parte da biblioteca de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Esse caldo é rico em peptídeos antimicrobianos (PAMs), compostos produzidos naturalmente por vários seres vivos e que apresentam potencial de atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Cavicchioli, 2018). O trabalho visa verificar o potencial de incorporação do caldo nas mantas de nanofibras e avaliar sua atividade antibacteriana contra bactérias usualmente associadas a infecções de pele.

1.1. Referencial teórico

1.1.1. Antimicrobianos

Em 1928, o cientista escocês Alexander Flemming descobriu por acaso a penicilina, um antibiótico liberado por fungos do gênero *Penicillium*, capaz de inibir o crescimento de bactérias próximas de sua colônia em uma placa de cultura (Tan e Tatsumura, 2015). O composto capaz de matar bactérias Gram-negativas causou uma grande mudança na comunidade científica pela forma como eram vistas e tratadas as doenças infecciosas, entretanto, apenas em 1940 ele começou a ser produzido em larga escala por Howard Florey e Ernst Chain, durante a segunda guerra mundial (Montemayor *et al.*, 2014; Tan e Tatsumura, 2015).

Em 1945, Flemming recebeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por sua descoberta, juntamente com Florey e Chain. Eles alertaram sobre os riscos dos antibióticos: com a pressão evolutiva da seleção natural, essas bactérias poderiam se tornar resistentes ao medicamento, principalmente se usado de forma inadequada. (Christaki, *et al.*, 2020; Flemming, 1945; Roope *et al.*, 2019). Somado ao alerta, pesquisadores já haviam notificado, antes mesmo da aplicação terapêutica da penicilina, sobre bactérias resistentes a este composto. Dessa forma, empresas e pesquisadores foram incentivados a buscar novos antibióticos, como a metilicina, sendo que apenas um ano depois já foram reportadas as primeiras cepas de *Staphylococcus* resistentes ao medicamento, e em sequência também apareceram cepas resistentes à vancomicina, outro antibiótico descoberto alguns anos depois. No final do século XX, em 1996, a levofloxacina começou a ser utilizada terapêuticamente, e no mesmo ano, *pneumococcus* resistentes foram identificados (Levine, 2006; Sengupta *et al.* 2013).

Até 1980, diversos antibióticos foram identificados, isolados e aplicados no tratamento de doenças, produções agropecuárias e industriais, sendo essa época conhecida como a “era dourada” em relação ao descobrimento de novos antibióticos. Após esse período, houve uma grande queda na descoberta de novos antibióticos e até mesmo no investimento de pesquisas relacionadas

nesta área (Renwick *et al.*, 2015; Roope *et al.*, 2019). Com o aumento da resistência bacteriana nos últimos anos, causada principalmente pelo amplo uso inadequado desses medicamentos, as pesquisas neste campo voltaram a crescer (Christaki, *et al.*, 2020). Mesmo assim, novas classes de antibióticos não têm surgido facilmente, uma vez que os compostos antibióticos mais facilmente isolados já foram descobertos no passado (O' Niell, 2016).

O número crescente de cepas bacterianas resistentes a antibióticos se tornou um problema de saúde pública global e tem demandado grandes esforços da comunidade científica (Loureiro *et al.*, 2016). A falta de antibióticos eficientes ainda afeta outras áreas da medicina, já que são aplicados em procedimentos como cirurgias e quimioterapias. Dessa forma, é importante buscar novas fontes de antimicrobianos eficientes, além de novas estratégias para a aplicação desses medicamentos.

1.1.2. Produtos naturais e novas abordagens

Assim como a penicilina, até os dias de hoje moléculas produzidas por organismos vivos são usadas para a produção de novos medicamentos antimicrobianos, não apenas com o uso direto da substância e de formas alteradas, mas também funcionando como base para a criação de novos compostos sintéticos (Chen *et al.*, 2019; Schneider, 2021). Produtos naturais servem não apenas para a produção de antibióticos, mas com frequência são usados como compostos primários na produção de novas drogas, principalmente devido à grande diversidade química de estruturas encontradas e das variadas fontes, podendo ser extratos e óleos de plantas, bem como metabolitos secundários bioativos de origem microbiana (Huang *et al.*, 2022; Martinez-Klimova *et al.*, 2016). Em análise realizada por Newman e Cragg (2020), cerca de 32% das drogas que surgiram entre 1981 e setembro de 2019 eram produtos naturais ou compostos derivados, enquanto 35% eram produtos sintéticos semelhante a naturais e 33 % eram drogas puramente sintéticas.

Quanto à produção de antibióticos, fungos e bactérias são as fontes mais comuns de produtos metabólicos aprovados para uso medicinal. Ainda assim, pesquisa com produtos naturais como novos antibióticos tem encontrado barreiras, como a dificuldade de encontrar compostos com novas

estruturas e alvos nas células para evitar resistência cruzada, além da dificuldade de se isolar e cultivar alguns microrganismos, ou ainda, genes que são silenciados fora das condições naturais (Genilloud, 2019; Schneider, 2021).

Quando cultivados em laboratório, esses organismos se encontram em um ambiente sem competição ou interação, que são fatores importantes para desencadear a produção de metabólitos secundários específicos (Genilloud, 2019; Zhang *et al.*, 2018). O cultivo misto ou co-cultivo é uma abordagem muito utilizada para ativação de genes silenciados ou aumento da produção de compostos produzidos em baixa quantidade por fungos e bactérias (Li *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2019). Isto torna o ambiente do organismo similar ao que acontece na natureza, seja pela divisão de tarefas no consumo de recursos, o que aumenta a biomassa; por alimentação cruzada, quando o metabólito secundário de um microrganismo funciona como indutor de rotas metabólicas em outro, ou pela competição, ativando mecanismos de defesa relacionados à produção de metabólitos secundários (Zhang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2016).

No trabalho de Hu e colaboradores (2021) foram realizados cultivos mistos de *Xanthobacter variabilis* com outros 72 microrganismos, com o objetivo de aumentar a produção de proteínas de interesse, e em 31% desses cultivos houve aumento no crescimento celular da bactéria. Especificamente, houve destaque no cultivo com *Shinella sp.* NM-101, que aumentou 11.4 ± 3.5 vezes a contagem de células de *Xanthobacter variabilis* e aumentou a produção de proteínas e aminoácidos essenciais em $24 \pm 2\%$ e $28 \pm 11\%$, respectivamente, em relação ao monocultivo.

Outra abordagem muito comum para encontrar novas drogas antimicrobianas é a bioprospecção de microrganismos de ambientes pouco explorados, como ecossistemas marinhos, microbiomas de insetos, ambientes extremos e em interações ecológicas com plantas (Genilloud, 2019; Rutledge e Challis, 2015). Microrganismos que vivem em simbiose com plantas são conhecidos como endofíticos, e compreendem boas fontes de metabólitos bioativos capazes de combater bactérias e fungos patogênicos, sendo também uma fonte de exploração sustentável para produção de materiais

biotecnológicos e desenvolvimento humano (Martinez-Klimova et al., 2016, Polanco, 2018).

O gênero *Paenibacillus* compreende mais de oitenta e nove espécies de bactérias, caracterizadas por serem bacilos Gram-positivos facultativamente anaeróbicos, formadores de endósporos e com baixa quantidade dos nucleotídeos guanina e citosina no seu material genético (Daud et al., 2019; Raza et al., 2008). As bactérias da espécie *Paenibacillus polymyxa* são microrganismos endofíticos capazes de auxiliar no crescimento de plantas através da produção de metabolitos semelhantes a hormônios vegetais, além de produzir compostos antimicrobianos peptídicos capazes de proteger as plantas contra fungos patogênicos, oomicetos e bactérias (Jeong et al., 2019; Schneider et al., 2021). Os grupos de peptídeos antimicrobianos (PAM) encontrados mais comumente nessa espécie são as polimixinas e as fusaracinas, além de outros PAMs específicos das cepas encontradas em diferentes ambientes (Li et al., 2020; Raza et al., 2008; Ek-Ramos et al., 2019).

Serrano (2009) isolou uma cepa desta bactéria a partir de folhas de *Prunus spp.*, no Cerrado de São Carlos, a qual nomeada como *P. polymyxa* RNC-D. Estudando sua atividade, foi verificado que o caldo fermentado produzido por essa cepa foi capaz de inibir *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A posterior caracterização bioquímica desse caldo mostrou a presença de diversos peptídeos antimicrobianos, e além de compostos comuns para a espécie como fusaricidina A e poliximina E, novas moléculas foram identificadas. Uma delas foi chamada AMP-Pp, um dos menores peptídeos naturais com atividade antimicrobiana já reportado, com uma massa molar de 463 Da. O outro composto, nomeado de polycerradin, corresponde a um íon que foi encontrado em fase lipossolúvel, m/z 3,376.4 Da, com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando um grande potencial na aplicação de produtos com atividade antimicrobiana (Serrano, 2021).

1.1.3. Nanopartículas de prata

Nanomateriais são definidas como partículas que possuem pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm, e seu tamanho em escala manométrica leva a

características e propriedades diferentes do material na escala macro (Beer *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2018, Sanfelice *et al.*, 2022). As nanopartículas de prata (AgNPs), por exemplo, apresentam poderosas propriedades antimicrobianas sendo capazes de combater até mesmo cepas multirresistentes, devido a características como uma elevada razão entre superfície e volume (Gao *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2018). Nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado o potencial uso de nanomateriais como agentes antimicrobianos contra vários tipos de patógenos devido ao seu tamanho e capacidade de danificar células por meio de diferentes mecanismos (Ogunsona *et al.*, 2020).

Apesar do mecanismo de ação responsável pela atividade antimicrobiana das AgNPs de prata ainda não ser consenso no meio científico, sabe-se que o tamanho, morfologia e a concentração das partículas têm consequência direta no efeito antimicrobiano (Pal *et al.*, 2007). Deste modo, há um enorme interesse em diferentes formas de produção dessas nanopartículas, além de diferentes aplicações, já que elas podem facilmente modificar materiais para torná-los antimicrobianos e trazendo benefícios adicionais para a aplicação em curativos, como por exemplo, aumentando a hidrofobicidade do material modificado pela formação de íons Ag^+ hidratados, que são os responsáveis pelo aumento da molhabilidade (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018).

Entretanto, as características que fazem esses materiais tão atrativos também têm lados negativos: AgNPs podem ser muito mais reativas, além de possuírem maior interação com fluidos e componentes de organismos vivos, podendo levar a efeitos colaterais imprevisíveis com os sistemas biológicos e o ambiente (Beer *et al.*, 2012; Landsiedel *et al.*, 2010). Pesquisas apontam que o aumento do uso das AgNPs tem provocado um acúmulo das partículas no ambiente, podendo afetar ecossistemas por bioacumulação de prata (Ali *et al.*, 2021). Não se sabe se os efeitos tóxicos são causados pelas AgNP em si, pelos íons de prata (Ag^+) ou pela presença de ambos, mas indícios mostram que a presença de Ag^+ tem uma forte influência na citotoxicidade e por isso pesquisadores recomendam a quantificação desses íons durante a produção de AgNP (Beer *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2021). Por esses fatores, uma estratégia para diminuir seus efeitos negativos é a aplicação sinérgica de AgNP com

outros compostos bioativos, diminuindo a sua concentração e mantendo a atividade desejada.

1.1.4. Mantas de nanofibras eletrofiadas para liberação lenta de compostos ativos

As tecnologias atuais permitem o uso de diversos tipos de nanoestruturas capazes de incorporar e transportar fármacos de interesse, e dentre estas, as nanofibras eletrofiadas apresentam muitas características interessantes para este tipo de aplicação (Ignatova *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2020a; Rodrigues *et al.* 2022). Como um método de produção de baixo custo, simples e capaz de empregar, como matéria prima, uma ampla quantidade de polímeros naturais e sintéticos, a eletrofição se baseia na aplicação de um potencial elétrico na gota de uma solução polimérica contida num tubo capilar. Quando a força de repulsão eletrostática (por sua vez, gerada pelo acúmulo de cargas ocasionado pela aplicação do potencial elétrico) na ponta da gota supera a força de tensão superficial do líquido, a gota é deformada, gerando o chamado cone de Taylor, e então jatos finos eletricamente carregados são ejetados em direção ao coletor. No trajeto entre a ponta da agulha e o coletor metálico aterrado ocorre a secagem do solvente, gerando fibras que são coletadas (Mercante *et al.*,2021; Reneker e Yarin, 2008). Um esquema simplificado pode ser visto na **Figura 1**.

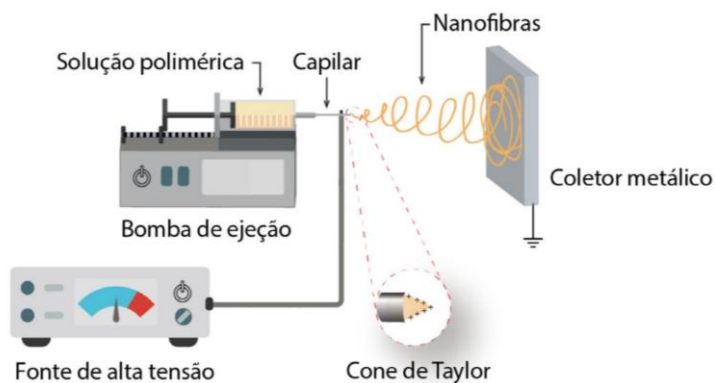


Figura 1 - Esquema de um sistema de eletrofição (Reproduzido com permissão da referência Mercante *et al.*, 2021)

Variáveis que podem influenciar no tamanho e forma das fibras formadas podem ser dependentes dos materiais usados, como o tipo do polímero, viscosidade e condutividade da solução etc., ou dependentes dos parâmetros de produção, como distância entre agulha e coletor, voltagem aplicada, taxa de ejeção, diâmetro da agulha etc. (Ghaderpour *et al.*, 2021; Mercante *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2022).

A técnica permite a produção de fibras que podem chegar à escala nanométrica, com elevada área superficial específica, alta porosidade, capacidade de incorporação de diversos princípios ativos para liberação lenta de fármacos, facilidade de funcionalização e modificação superficial, entre outras vantagens (Ballesteros e Correa, 2020; Santos *et al.*, 2020a). Porém, é importante ressaltar que, apesar do termo “nano” se referir a escala entre 1 nm e 100 nm, o uso do termo para fibras abaixo de 1 µm de diâmetro é bem comum e difundido na literatura (Torres-Giner *et al.*, 2016). A eletrofição é muito promissora para aplicações na área da biomedicina, principalmente para tratamento de feridas, já que muitas dessas características fazem com que mantas de fibras eletrofiadas se assemelhem estruturalmente a matriz extracelular, aumentando propriedades de adesão e transferência de massa (Ballesteros e Correa, 2020; Shih-Feng *et al.*, 2015; Kratochvil *et al.*, 2017).

A eletrofição demanda que materiais a serem processados tenham características específicas quanto as propriedades viscoelásticas e energias de superfície, além de condutividade elétrica em uma faixa limitada de valores (Torres-Giner *et al.*, 2016). Polímeros com pesos moleculares adequados são os principais materiais que se encaixam nesses padrões, além disso, propriedades como uma boa resistência elástica, facilidade de funcionalização e biocompatibilidade são outras características atrativas para esses materiais que podem ser tanto de origem sintética quanto natural (Siddamallappa *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2019). Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material responder de forma adequada a sua aplicação de acordo com as necessidades de seu usuário e é uma das características mais importantes para a aplicação de polímeros em curativos (Chen *et al.*, 2008).

O poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético de ampla aplicação na área biomédica, principalmente por ser não-toxico, hidrofílico,

biocompatível e biodegradável. Também são facilmente processados pela eletrofiação e são muito empregados para aumentar a molhabilidade dos materiais (Siddamallappa *et al.*, 2018; Okur *et al.*, 2020). O polímero policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático altamente hidrofóbico, tenaz e flexível, além de ser biocompatível e biodegradável (Filippouse *et al.*, 2016; Graça *et al.*, 2021; Roa *et al.*, 2010). Assim como o PVA, o PCL possui grupos ativos (-OH), que conseguem se ligar a vários receptores, melhorando a captação celular (Okur *et al.*, 2020). A estrutura química dos polímeros pode ser vista na **Figura 2**.

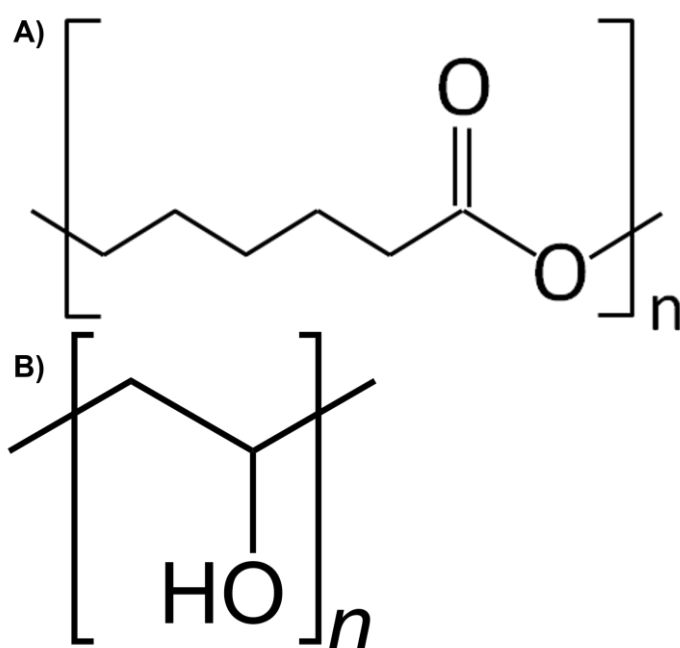


Figura 2: Estrutura química dos polímeros **A)** PCL e **B)** PVA.

Substâncias biologicamente ativas que são carregadas durante o processo de eletrofiação podem ter sua atividade preservada por uma maior quantidade de tempo, ao mesmo tempo que a liberação controlada no local de ação dificulta o desenvolvimento de resistência por parte de microrganismos e diminui reações de toxicidade no organismo, uma vez que não há necessidade de ingestão do medicamento (Boateng *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2005). No trabalho de Amariei e colaboradores (2018) por exemplo, foram produzidas

mantas eletrofiadas de poli(ácido acrílico) juntamente com poli(álcool vinílico), que foram subsequentemente funcionalizadas com peptídeos antimicrobianos (PAMs ou AMPs) através de adsorção eletrostática. As mantas apresentaram boa atividade antimicrobiana, em meio líquido e sólido, além de conseguir reter os PAMs por grandes períodos.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é a produção de membranas à base de nanofibras eletrofiadas de polímeros biocompatíveis, contendo caldo fermentado de *Paenibacillus polymyxa*, visando fornecer às mantas propriedades antimicrobianas contra bactérias causadoras de infecção de pele.

Objetivos Específicos:

- Cultivo da bactéria *Paenibacillus polymyxa*;
- Obtenção do caldo fermentado da bactéria;
- Produção de mantas à base de nanofibras eletrofiadas compostas de polímeros biocompatíveis como PCL e PVA;
- Incorporar o caldo fermentado de *Paenibacillus polymyxa* nas mantas à base de nanofibras;
- Modificação superficial das mantas de nanofibras com nanopartículas de prata;
- Caracterização físico-química das mantas produzidas;
- Avaliação do efeito antibacteriano dos diferentes materiais em meio de cultura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Foram utilizados ácido acético glacial e ácido fórmico (85%) adquiridos da Dinâmica (Indaiatuba, SP; BR) e Neon (Suzano, SP; BR), respectivamente. Policaprolactona (PCL, $M_n \approx 80.000 \text{ g.mol}^{-1}$) e o Poli(álcool vinílico) (PVA, $M_v = 31.000 - 50.000 \text{ g mol}^{-1}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; USA). O citrato de sódio utilizado na produção de nanopartículas foi obtido da Synth (Diadema, SP; BR), enquanto o Nitrato e Prata e o Borohidreto de sódio também foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; USA).

Os meios *trypticase soy agar* (TSA) e *trypticase soy broth* (TSB), usados na reativação de microrganismos foram adquiridos da Kasvi, assim como o extrato de malte, extrato de levedura e peptona. A glicose anidra foi adquirida da Synth (Diadema, SP; BR). Para o crescimento de microrganismos nos testes antimicrobianos, foram utilizados meio Mueller Hinton da BD (Franklin Lakes, NJ, USA) e ágar bacteriológico da Ludwig Biotec (Alvorada, RS, BR). Sulfato de estreptomicina e cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (CTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO; USA).

As cepas de *P. polymyxa* e de *S. aureus* (ATCC 6538) utilizadas para produção do caldo fermentado, estão depositadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), enquanto as cepas de *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 2592) utilizadas para testes antimicrobianos se encontram conservadas na Embrapa Instrumentação de São Carlos – SP.

2.2. Condições de cultivo e produção do caldo fermentado de *P. polymyxa* + *Staphylococcus aureus*

Para realizar o cultivo misto, os microrganismos que estavam conservados sob congelamento foram reativados. As cepas de *Staphylococcus aureus* foram reativadas em meio TSB, em estufa a 37 °C por 24 horas. Após a reativação, as células bacterianas foram semeadas em placas contendo meio TSA e foram incubadas a 37 °C e mantidas por 48 horas. Foram coletadas 4

colônias isoladas para produção do inóculo e colocadas em 20 mL do meio TSA, sendo incubadas sob agitação em *shaker* por 24 horas a 28°C e 180 rpm. Ao final do cultivo, foi retirado 1 mL do caldo fermentado para leitura da absorbância em espectrofotômetro, a fim de ajustar a concentração de células que utilizadas no cultivo misto. A leitura final foi ajustada para 0,1 de absorbância no comprimento de onda de 530 nm, correspondendo ao valor de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (Cavicchioli, 2021).

A reativação e crescimento da cepa de *P. polymyxa* foram realizados utilizando meio *International Streptomyces Project-2* (ISP2) modificado produzido com base na metodologia de Serrano (2012) (extrato de malte 10 g/L; extrato de levedura 4 g/L; glicose 16 g/L; peptona 0,3 g/L), com pH ajustado para 7 utilizando NaOH 0,1 M. Após reativadas, as cepas foram semeadas em placa pela técnica de esgotamento e foram colocadas em estufa bacteriológica, onde permaneceram por 48 horas à 28°C. A partir deste cultivo, duas colônias da bactéria foram adicionadas em 50 mL de ISP2 alternativo (extrato de malte 20 g/L; extrato de levedura 11,25 g/L; glicose 16 g/L; peptona 11,25 g/L) com pH 7 para produção do inóculo, sendo mantido sob agitação por 24 horas a 28 °C e 180 rpm. Foi retirado 1 mL do inóculo para fazer a leitura da absorbância do caldo produzido, neste caso, a leitura final sendo ajustada para 1,0 de absorbância no comprimento de onda de 620 nm. O ajuste foi realizado com diluição salina de NaCl 0,9%.

Baseando-se na metodologia utilizada por Cavicchioli (2021), após a produção e o ajuste dos inóculos, 5% (v/v) de *P. polymyxa* e 0,1% (v/v) do microrganismo estimulante, no caso *S. aureus*, foram adicionados em tubos de fundo cônico contendo 5mL de ISP2 modificado e foram levados ao *shaker*, onde permaneceram incubados por 168 horas a 28 °C e 180 rpm (**Figura 3**). O caldo obtido foi então centrifugado a 10.000 rpm por 20 min a 4 °C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em filtro de celulose para esterilização e foi liofilizado antes de sua utilização.

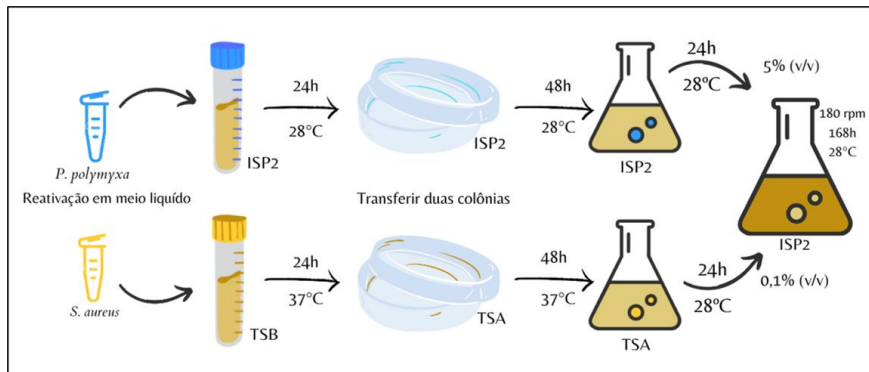


Figura 3: Fluxograma da produção do caldo fermentado obtido através do cultivo misto de *Paenibacillus polymyxa* e *Staphylococcus aureus*. Após 24h de reativação em meio líquido na estufa, as bactérias são plaqueadas e crescem em estufa por 48h. Em seguida, colônias isoladas são selecionadas e transferidas para novo cultivo em meio líquido por 24h, mas em shaker com rotação em 180rpm. Por fim, 5% (v/v) de *P. polymyxa* e 0,1% (v/v) são transferidos para o mesmo erlenmeyer, permanecendo em agitação de 180 rpm por 168h. Os meios descritos na imagem são Caldo Triptona de Soja (TSB), Ágar Triptona de soja (TSA) e *International Streptomyces Project-2* (ISP2). (Figura adaptada com reprodução permitida pela referência Oliveira et al., 2025)

2.3. Determinação da concentração inibitória mínima

Antes do preparo das mantas, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) do caldo fermentado liofilizado de *P. polymyxa* (CFP), com o objetivo de verificar qual a menor concentração capaz de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. O teste foi realizado em 3 dias seguindo a normativa NCCLS (2003). No primeiro dia, foram preparadas uma solução 40 mg/mL do caldo fermentado liofilizado, uma solução do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 1 mg/mL e uma solução do antibiótico sulfato de estreptomicina 40 mg/mL, que foi utilizada como controle positivo no teste. Além disso, foram preparados 100 mL de meio Mueller-Hinton (MH) seguindo as instruções do fabricante (21 g do meio em 1 L de água) que foram igualmente separados em 10 tubos de fundo cônico de 15 mL e autoclavados juntamente com as vidrarias e instrumentos utilizados. Após o resfriamento do meio nos tubos foi realizada a produção do inóculo dos microrganismos indicadores da atividade antimicrobiana, dentro do fluxo laminar. As cepas escolhidas foram *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa), bactérias que já possuem cultivo e estoque estabelecido na EMBRAPA. Foi retirada uma

alçada de cada meio de cultivo das bactérias citadas para que fossem colocadas nos tubos para então produzir o inóculo. Os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37 °C por 12 horas.

No segundo dia, os inóculos preparados foram levados ao espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV-PC 1601) para leitura da absorbância a 625 nm para verificar a concentração de células utilizando a escala McFarland, seguindo o documento M7-A6 da normativa NCCLS de 2003 (2). Após a contagem, foi feita a diluição dos microrganismos em tubos contendo meio MH estéril para que fosse obtida a concentração de 1×10^6 células/mL.

Foram utilizadas duas microplacas, descartáveis e estéreis, de 96 poços, sendo uma para cada bactéria. A **Figura 4** é uma representação da microplaca. Em cada poço foi adicionado 100 µL do meio MH. Nos poços da linha A foram adicionadas apenas o meio para controle de esterilidade. Os da linha B foram utilizados como controle negativo, onde foram adicionados 10 µL do meio contendo as bactérias para verificar a viabilidade das mesmas. A linha C corresponde ao controle positivo, onde 100 µL da solução de sulfato de estreptomicina foram adicionados aos poços por diluição seriada e 10 µL do meio com bactéria; Na linha D foram adicionados 100 µL da solução do caldo fermentado liofilizado por diluição seriada para comprovar a esterilidade do meio. As linhas E, F e G foram as triplicatas do teste antimicrobiano do caldo fermentado, sendo adicionado em cada linha 100 µL da solução em diluição seriada e 10 µL da solução bacteriana em cada poço. As placas foram levadas para estufa, onde permaneceram incubadas por 24 h a 37 °C. No terceiro dia, as placas foram retiradas da estufa e então foram adicionados, em cada poço, 50 µL da solução do corante CTT 1 mg/mL. Após uma hora, observou-se se houve alteração de cor nos poços; os resultados foram anotados e fotografados.

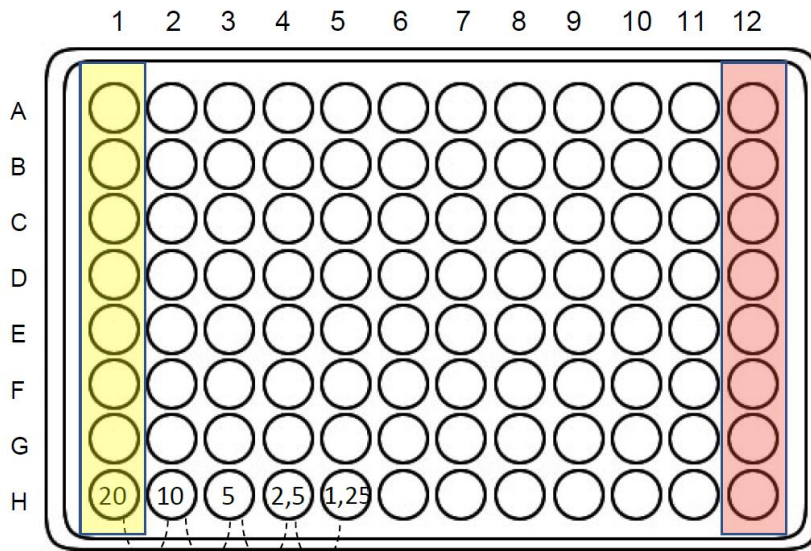


Figura 4: Representação da placa de 96 poços utilizadas para o teste de micro diluição. Na Linha **A** foi feito o controle de esterilidade do meio; a linha **B** foi usada para verificar a viabilidade da bactéria; na linha **C** foi realizada diluição seriada de solução de sulfato de estreptomicina como controle positivo; enquanto na linha **D** foi realizada diluição seriada do CFP para verificar a esterilidade da amostra; por fim, das colunas **E** até **G** foram realizadas as triplicadas para o ensaio de concentração inibitória mínima. Na diluição seriada, é colocado no primeiro poço de cada linha a maior concentração do caldo, que vai sendo diluído nos poços seguintes. Fonte: Caviccholi, 2020.

2.4. Preparo das soluções poliméricas e das mantas eletrofiadas.

A solução de PCL (12% m/v) foi preparada utilizando como solventes ácido acético e ácido fórmico na proporção 3:2, respectivamente. A solução foi deixada sob agitação por 3 horas a temperatura ambiente e em seguida foi adicionado o caldo fermentado liofilizado, variando a concentração em relação a massa do polímero (10 %, 20%, 25% e 30% m/m). A mistura foi deixada em agitação por mais 30 minutos. Os parâmetros utilizados para a produção dessa solução foram adaptados do trabalho de Santos e colaboradores (2018).

A preparação da solução de PVA (12% m/v) foi realizada sob refluxo em banho de glicerina. Água deionizada foi adicionada em balão de fundo redondo seguido pelo polímero. O balão foi aquecido a 80 °C por 90 minutos. O caldo fermentado foi adicionado posteriormente nas mesmas proporções utilizadas para o PCL e deixado em agitação por 30 minutos (Adaptado de Santos *et al.*, 2020b).

Para produzir mantas bicamada, o processo de eletrofiação foi feito em duas etapas: primeiramente foi produzida a manta de PCL acoplado uma seringa de vidro contendo uma solução de PCL/CFP na bomba de seringa. As fibras foram coletadas por 90 minutos, utilizando um coletor rotativo metálico de 80 mm de diâmetro a uma velocidade de rotação de 400 rpm; terminada a fiação do PCL, a seringa foi substituída por outra contendo uma solução de PVA/CFP, que permaneceu por mais 90 min. Também foram produzidas, separadamente, mantas poliméricas de PVA e de PCL, com e sem CFP. Em outro momento, foram preparadas mantas de PCL/CFP 25%, sem a adição da camada de PVA, sendo o tempo de coleta da manta aumentado para 150 min, de forma aumentar a espessura da manta de PCL, agora em camada única. As **Tabelas 1 e 2** descrevem os parâmetros de fiação utilizados no procedimento.

Tabela 1: Parâmetros de eletrofiação utilizados para produzir mantas de PCL adaptados do trabalho de Santos *et al.* (2018). Mantas sem o caldo fermentado também passaram pelas mesmas condições de produção.

Parâmetros da Eletrofiação do PCL

Taxa de Ejeção	8 μ L/min
Temperatura	27 \pm 5°C
Umidade	23-33 %
Voltagem	20kV
Distância do coletor	7,5 cm
Tempo de fiação	90 min

Tabela 2: Parâmetros de eletrofição utilizados para produzir mantas de PVA adaptados do trabalho de Santos *et al.* (2020b). *As mantas de PVA produzidas sem o caldo fermentado foram fiadas usando uma voltagem de 18kV.

Parâmetros de Eletrofição do PVA

Taxa de Ejeção	8 μ L/min
Temperatura	27 \pm 5°C
Umidade	23-33 %
Voltagem	20kV*
Distância do coletor	5 cm
Tempo de fição	90 min

2.5. Produção de nanopartículas de prata

AgNPs foram produzidas para avaliar a possibilidade de potencializar a atividade antimicrobiana do caldo. A metodologia de síntese foi baseada no trabalho de Teodoro e colaboradores (2018). Especificamente, em um béquer foram adicionados 100 mL de água e em seguida, sob agitação, foi adicionado o nitrato de prata (4,9 mg) e o citrato de sódio (7,4 mg). Passados 15 minutos de agitação, foi adicionado, vagorosamente, um volume de 0,05 μ L de solução de borohidreto de sódio (3,78 mg/mL), permanecendo em agitação por mais 1 hora. O procedimento foi feito em banho de gelo.

2.6. Modificação superficial das mantas

2.6.1. Modificação por imersão

Mantas nanofibras de PCL/PVA, contendo ou não caldo fermentado, foram modificadas com AgNPs pelo método de imersão, utilizando soluções aquosas de AgNP (0,1 mg/mL) e de caldo fermentado (20 mg/mL). Amostras foram imergidas em soluções contendo AgNPs e CFP em proporção de 1:1, e em soluções contendo apenas caldo ou apenas AgNPs.

O preparo das amostras foi realizado a partir do corte das membranas em formato de discos de aproximadamente 0,9 cm de diâmetro, e mergulhadas nas soluções, onde permaneceram imersas por 24 horas. Em seguida, as mantas foram retiradas, lavadas em água destilada e, após secagem com leves jatos de ar, foram guardadas em dessecador. Para os testes antimicrobianos, as mantas permaneceram em imersão por apenas 3 horas, sendo então retiradas, lavadas em água destilada e então levadas para secar em estufa, onde permaneceram por 30 min na temperatura de 40 °C. Antes de serem cortadas, as mantas foram armazenadas em dessecador por 12 horas, sendo no dia seguinte recobertas para obtenção de imagens no MEV ou utilizadas em testes antimicrobianos como descrito no item 2.8. As composições de cada amostra produzida por este método estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3: Composição das amostras de mantas bicamada (PVA/PCL) modificadas por imersão. Na primeira coluna estão as mantas usadas para produção das amostras, contendo CFP no interior das fibras em diferentes concentrações descritas em % (m/m), seguida pela composição da solução em que a manta foi imersa e por fim, o nome da amostra. A porcentagem de CFP no *bulk* é dada em relação a massa de polímero na solução.

Composição das soluções empregadas na modificação das mantas bicamadas pela técnica de imersão

Manta	Solução de Imersão	Amostra*
PVA/PCL/CFP 20%	Caldo + AgNP	2PC20@iCAg
PVA/PCL/CFP 25%	Caldo + AgNP	2PC25@iCAg
PVA/PCL/CFP 20%	AgNP	2PC20@iAg
PVA/PCL/CFP 25%	AgNP	2PC25@iAg
PVA/PCL/CFP 10%	Caldo + AgNP	2PC10@iCAg
PVA/PCL/CFP 10%	Caldo	2PC10@iC

*A Nomenclatura das amostras deve ser lida levando em consideração que: "2P" representa a bicamada de mantas poliméricas; "C10/20/25" é a concentração do caldo em % no interior das mantas; "@" representa modificação superficial; i – método utilizado para modificação foi a imersão; "C" e "Ag" – são respectivamente CFP e AgNP e representam a composição da solução utilizada.

Mantas compostas por PCL/CFP e mantas produzidas apenas com o PCL também foram colocadas em imersão para verificar suas propriedades. Pedacos das mantas foram colocados em imersão por 24 horas, utilizando as mesmas soluções e procedimentos citados acima. A **Tabela 4** abaixo descreve a composição das amostras produzidas.

Tabela 4: Composição das soluções utilizadas para modificar a superfície de mantas de PCL/CFP e PCL. Na primeira coluna está o nome da manta usada, em seguida, a solução em que ficaram imersas por 24 horas e por fim, o nome da amostra.

Composição das soluções empregadas na modificação das mantas de PCL pela técnica de imersão		
Manta	Solução	Amostra*
PCL/CFP 25%	Caldo	PC25@iC
	Caldo + AgNP	PC25@iCAg
	AgNP	PC25@iAg
PCL	Caldo	P@iC
	Caldo + AgNP	P@iCAg
	AgNP	P@iAg

*A Nomenclatura das amostras deve ser lida levando em consideração que: “P” representa o polímero PCL; “C25” é a concentração do caldo em % no interior das mantas; “@” representa modificação superficial; i – método utilizado para modificação foi a imersão; “C” e “Ag” – são respectivamente CFP e AgNP e representam a composição da solução utilizada.

2.6.2. Modificação por aspersão

A modificação superficial das mantas bicamada por meio de aspersão foi realizada utilizando as mesmas soluções de CFP e AgNPs descritas no item anterior. O procedimento foi realizado com o auxílio do equipamento de fiação por sopro em solução disponível na EMBRAPA Instrumentação. Primeiramente, a manta foi colocada em um coletor rotativo metálico (180 rpm). A solução a ser aspergida foi colocada dentro de uma seringa de plástico (16 mm de diâmetro) que foi acoplada a uma bomba de seringa para ejeção controlada. A seringa foi conectada com a agulha através de uma pequena mangueira, necessária para encaixar a agulha no equipamento. Com o equipamento ligado, a solução foi sendo lentamente ejetada, onde encontrava-

se um forte fluxo de ar direcionado, responsável pelo arraste e aspersão do material nas mantas, que foram modificadas apenas no lado do PVA. Após 15 minutos de aspersão, a seringa foi removida para a troca de solventes, e as mantas continuaram no coletor por mais alguns minutos para acelerar a secagem, e então foram guardadas em um dessecador. Os parâmetros utilizados para o procedimento estão descritos na **Tabela 5** e as amostras descritas na **Tabela 6**.

Tabela 5: Composição das mantas bicamada modificadas aspersão. Na primeira coluna estão as mantas usadas para produção das amostras, contendo CFP no interior das fibras em diferentes concentrações descritas em % (m/m), seguida pela composição da solução em que a manta foi imersa e por fim, o nome da amostra. A porcentagem de CFL no *bulk* é dada em relação a massa de polímero na solução.

Composição das soluções empregadas na modificação das mantas bicamadas pela técnica de aspersão

Manta	Solução	Amostra*
PVA/PCL/CFP 20%	Caldo + AgNP	2PC20@aCAg
PVA/PCL/CFP 25%	Caldo + AgNP	2PC25@aCAg
PVA/PCL/CFP 20%	AgNP	2PC20@aAg
PVA/PCL/CFP 25%	AgNP	2PC25@aAg
PVA/PCL/CFP 10%	Caldo + AgNP	2PC10@aCAg

*A Nomenclatura das amostras deve ser lida levando em consideração que: “2P” representa a bicamada de mantas poliméricas; “C10/20/25” é a concentração do caldo em % no interior das mantas; “@” representa modificação superficial; a – método utilizado para modificação foi a aspersão; “C” e “Ag” – são respectivamente CFP e AgNP e representam a composição da solução utilizada.

Tabela 6: Parâmetros utilizados no equipamento de fiação por sopro para aspersão das soluções nas mantas. Para todas as amostras, foram utilizados os mesmos parâmetros.

Parâmetros da Aspersão

Taxa de Ejeção	15 mL/h
Pressão do Ar	3 bar
Distância do coletor	30 cm
Protrusão	2mm
Tempo de aspersão	15 min

2.7. Caracterização das mantas de nanofibras

2.7.1. Caracterização físico-química

Os espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras foram coletados usando um espectrofotômetro Bruker (Vertex 70), com módulo ATR no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . Foram realizadas 64 varreduras por espectro, utilizando resolução de 2 cm^{-1} . Os dados foram analisados com o software Origin 2018.

A morfologia das mantas de nanofibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o microscópio eletrônico JEOL 6510. Pequenos pedaços de mantas foram imobilizados em um porta amostras utilizando fita de carbono e revestidas com ouro por meio de um metalizadora (Leica - SCD 050). Os diâmetros das fibras foram avaliados com o auxílio do software ImageJ. A presença de nanopartículas nas mantas após a modificação superficial foi verificada utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão por campo (MEV-FEG), usando um equipamento JEOLJSM 6701F FEG-SEM. Da mesma forma que anteriormente descrito, pedaços das mantas foram acopladas em porta amostras com auxílio de fita de carbono e recobertas com platina.

Medidas de ângulo de contato das mantas de PCL/CFP 25% e PCL foram realizadas usando um medidor de ângulo de contato e tensão interfacial (KSV Instruments) equipado com uma câmera CCD (KGV-5000). Aproximadamente, 10 μL de água foram gotejados na superfície das mantas de

nanofibras e as imagens foram coletadas durante 60 segundos. O ângulo de contato foi avaliado empregando o software KSV CAM 2008.

2.7.2. Caracterização microbiológica

As atividades antimicrobianas das mantas produzidas foram analisadas pelo teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão (ou teste do halo de inibição) baseado na normativa NCCLS de 2003. Foram utilizadas cepas de *S. aureus* e *E. coli* para o teste. Na fase de preparo foi produzido o meio sólido que seria colocado em placas de Petri, adicionando ágar bacteriológico na quantidade recomendada pelo fabricante. Os meios produzidos, bem como as vidrarias e demais instrumentos a serem utilizadas foram autoclavados. O inóculo foi preparado da mesma forma que descrito no tópico 2.3, permanecendo em estufa bacteriológica por 12 horas.

No dia seguinte, o inóculo foi diluído conforme descrito no tópico 3.3. Após a diluição, foram pipetados 100 µL do meio em placa de Petri e o microrganismo foi espalhado pelo método de esgotamento com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Discos de mantas (modificadas ou não) cortados previamente (10 mm de diâmetro) foram dispostos equidistantemente nas placas, de forma a realizar o teste em triplicata. No caso das mantas bicamada, variou-se o lado da manta em diferentes placas, sendo assim possível observar a atividade tanto do lado do PCL quanto do PVA. As mantas foram incubadas em uma estufa por 24h a 37 °C e no dia seguinte, foram retiradas para análise do resultado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Obtenção do caldo fermentado liofilizado e teste CIM

Conforme descrito, foi produzido um caldo fermentado através do cultivo misto entre *Paenibacillus polymyxa* e *Staphylococcus aureus* seguindo metodologia estabelecida por Cavicchioli (2021). Após a centrifugação e filtração, o caldo foi liofilizado, formando um material sólido altamente higroscópico (**Figura 5**). Este foi armazenado em congelador durante todo o tempo de uso para prevenir eventuais efeitos de degradação.



Figura 5: Fotografia digital (vista superior) do frasco contendo o caldo fermentado do cultivo de *P. polymyxa* em conjunto com *S. aureus* após liofilização.

Nesse trabalho, optou-se usar o caldo fermentado de cultivo misto com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana, uma vez que já foi provado em vários estudos que a técnica de co-cultivo é capaz de estimular o microrganismo na produção de metabólitos secundários bioativos e aumentar a diversidade de produtos gerados por microrganismos *in vitro* (Chagas, 2014; Marmann *et al.*, 2014). Cavicchioli (2021) realizou um estudo com *P. polymyxa* RNC-D para verificar se o cultivo misto desta cepa com bactérias e fungos patogênicos era capaz de aumentar a atividade antimicrobiana do caldo fermentado. Dentre os cultivos realizados, o mais promissor foi aquele com *S. aureus*, que aumentou a atividade antimicrobiana do caldo e por isso foi o

cultivo misto selecionado para este trabalho. No estudo, foi encontrado que a CIM do caldo de cultivo misto contra *E. coli* e *S. aureus* são 1250 µg e 5000 µg, respectivamente.

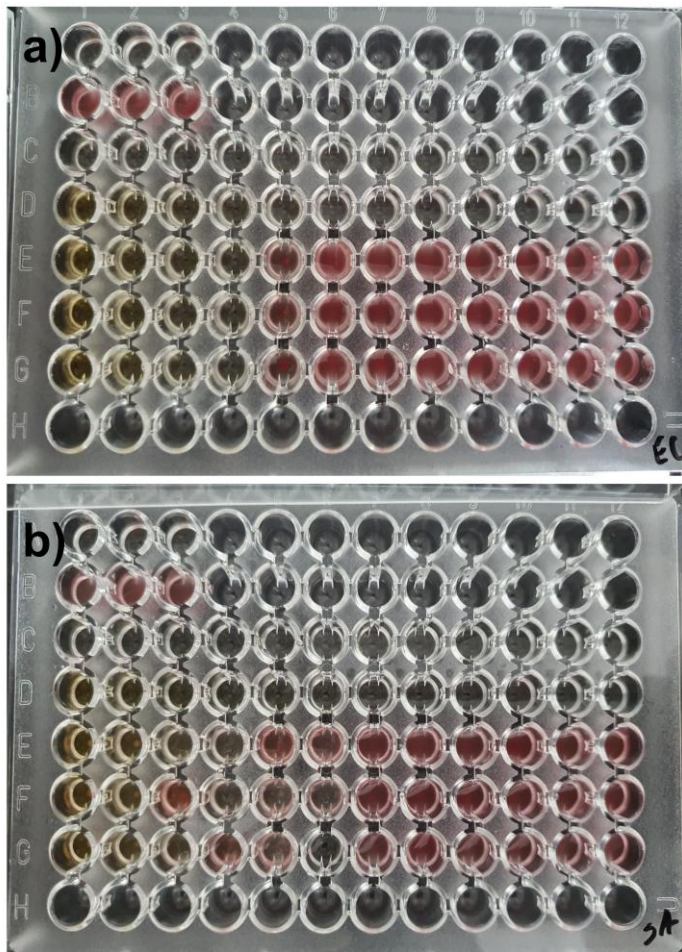


Figura 6: Resultados do teste de CIM contra **A) *E. coli*** e **B) *S. aureus***. A coloração rosa representa presença de atividade celular. A concentração do CFP na primeira coluna foi de 20 mg/mL, sendo reduzida pela metade a cada coluna e feito em triplicata, nas linhas **E, F e G**. A linha **B** onde foi colocado apenas o microrganismo testado comprovou a viabilidade através da coloração, enquanto as linhas **A, C e D** - esterilidade do meio, controle positivo e esterilidade da amostra, respectivamente - não apresentaram crescimento de microrganismos.

No teste de CIM do CFP realizado nesse trabalho foram obtidos valores de 2500 µg e 5000 µg para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente (**Figura 6**). Apesar do valor de inibição encontrado para *S. aureus* ter sido igual ao encontrado anteriormente no trabalho de Cavicchioli, para *E. coli* foi um pouco menor, mesmo tendo sido utilizadas as mesmas cepas e seguido o mesmo procedimento de preparo. A atividade antimicrobiana de compostos produzidos por microrganismos pode ser afetada por diferentes fenômenos, tanto por condições de produção e armazenamento do caldo, quanto pela viabilidade da cepa utilizada na fermentação (Ostrosky *et al.*, 2008).

3.2. Caracterização físico-química e microbiológica

3.2.1. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP (sem modificação superficial)

Diferentes formulações de mantas bicamadas de PVA/PCL/CFP foram produzidas a partir da variação da porcentagem de caldo fermentado em relação à massa de polímero na solução: 10%, 20%, 25% e 30%. Os parâmetros utilizados para a produção das mantas já haviam sido previamente otimizados e reportados em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Santos *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020b). Após o processo de eletrospinação, as mantas formadas apresentaram coloração branca para as menores concentrações de caldo (10 e 20%) e levemente amarelada em concentrações maiores do caldo (25 e 30%). Além disso, as mantas eram difíceis de se manusear por dobrarem facilmente.

As mantas obtidas foram caracterizadas pela técnica de **FTIR** para avaliação da sua composição bem como da interação entre os constituintes das nanofibras. Na **Figura 7A** são apresentados os espectros de FTIR obtidos para as amostras CFP, PVA e PVA/CFP, respectivamente. No espectro do PVA foi possível observar as bandas características em 1100 cm⁻¹, 1423 cm⁻¹, 2935 cm⁻¹ e em aproximadamente 3400 cm⁻¹. Essas bandas podem ser atribuídas aos modos vibracionais da ligação C-O-C, C-H dos grupos metílicos, C-H dos grupos alquilas e interações de hidrogênio intra e intermoleculares dos grupos O-H, respectivamente (Mansur *et al.*, 2007; Zubair, *et al.*, 2019). Após incorporação do caldo fermentado às nanofibras de PVA, o espectro de FTIR

resulta em uma combinação dos modos vibracionais do PVA com o modo vibracional em aproximadamente 1600 cm^{-1} , característico de grupos CO-N em ligações peptídicas do lipopeptídio do caldo fermentado (Meena *et al.*, 2018).

Na **Figura 7B** estão os espectros do CFP, PCL e PCL/CFP, respectivamente. No espectro de PCL observa-se uma banda intensa em aproximadamente 1726 cm^{-1} , associada ao estiramento de carbonila (C=O) de um éster (Silva *et al.*, 2021). Bandas em 2948 e 2868 cm^{-1} são referentes à vibração de estiramento de ligações C-H (Diez-Pascual & Diez-Vicente, 2016). Mais uma vez a banda de 1600 cm^{-1} presente no espectro do CFP aparece no espectro dos materiais combinados.

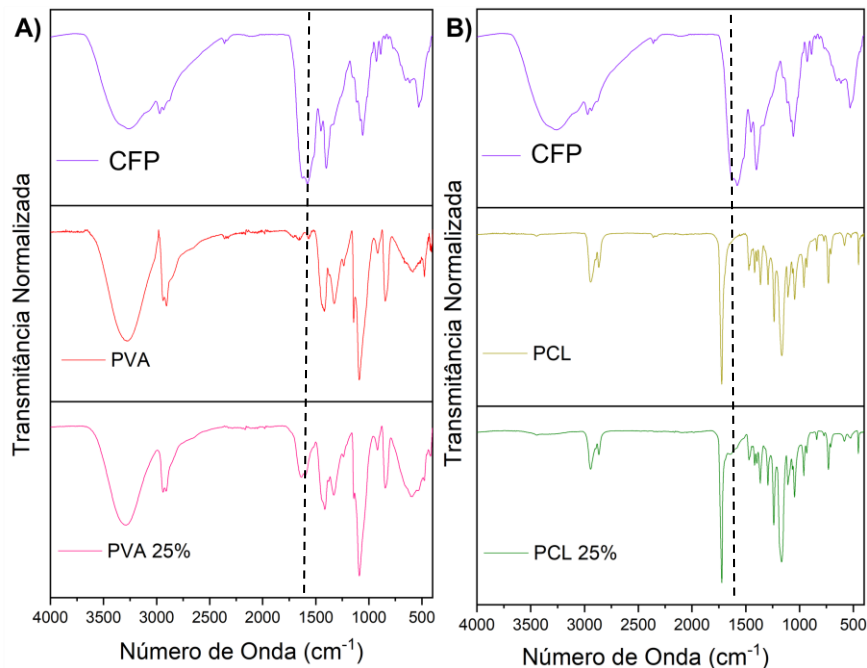


Figura 7: Espectros de FTIR de **A)** CFP, PVA e PVA/CFP; **B)** CFP, PCL e PCL/CFP.

A presença do modo vibracional em aproximadamente 1600 cm^{-1} confirma que a incorporação do caldo fermentado nas mantas, tanto de PVA quanto de PCL, foi devidamente alcançada (Meena *et al.*, 2018). Na sequência, as mantas de nanofibras foram caracterizadas por MEV para avaliação da morfologia obtida. A **Figura 8** apresenta as imagens obtidas com a face

composta por PVA (Figuras 8A e 8C) e PCL (Figuras 8B e 8D) contendo 10 e 25 % de caldo fermentado, respectivamente. Observando as imagens, é possível verificar que tanto no lado do PCL quanto no lado do PVA foram formadas fibras de superfície lisa e orientação aleatória. Além disso, as mantas com maior carregamento de CFP apresentam menos defeitos nas fibras de ambos os lados em comparação com as mantas com apenas 10% (m/m) do caldo. Tal comportamento pode ser explicado pela presença de compostos iônicos no caldo fermentado (como o próprio *polycerradin*), uma vez que a adição de um sal à solução faz com que a condutividade elétrica aumente, resultando em uma maior mobilidade dos íons presentes (Serrano *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2019). Com a aplicação de um campo elétrico externo, estas cargas se orientam permitindo que a gota sofra um maior alongamento, resultando em segmentos menos espessos e mais homogêneos, bem como tendem a formar fibras com menores diâmetros (Mercante *et al.*, 2021; Teodoro *et al.*, 2019).

Na **Tabela 7** a seguir estão apresentadas as médias de diâmetro das fibras analisadas.

Tabela 7: Medidas das nanofibras de PVA e PCL das mantas produzidas com diferentes concentrações do CFP.

Manta	Diâmetro PVA (nm)	Diâmetro PCL (nm)
PVA/PCL/CFP 10%	178 ± 42	114 ± 54
PVA/PCL/CFP 20%	117 ± 30	117 ± 33
PVA/PCL/CFP 25%	147 ± 48	168 ± 44
PVA/PCL/CFP 30%	166 ± 53	150 ± 30

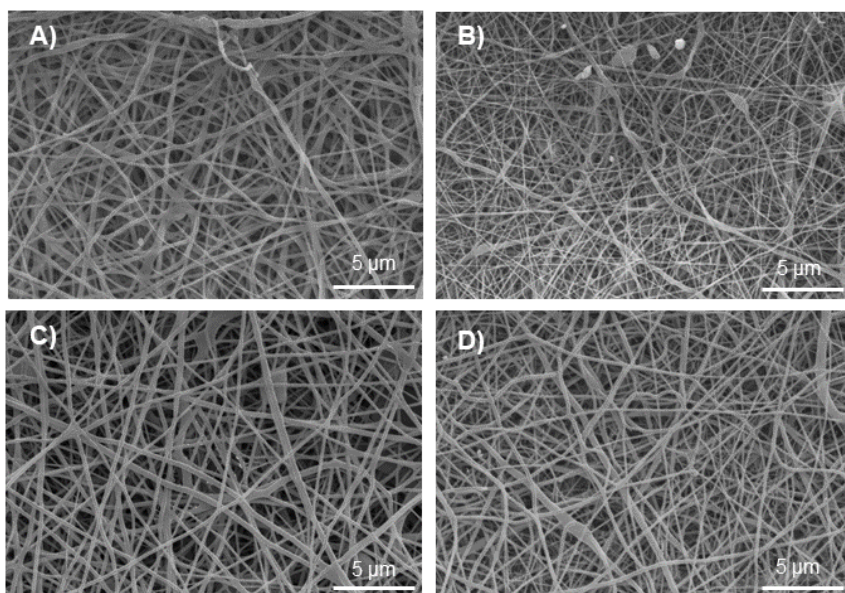


Figura 8: Imagens de MEV com magnificação de x10.000. **A)** PVA 10%; **B)** PCL 10%; **C)** PVA 25%; **D)** PCL 25%.

Após comprovar que foi possível eletrofiar mantas de nanofibras de PVA e PCL com o caldo fermentado incorporado, elas foram submetidas ao teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão para verificar a atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli* (Gram negativa) e *S. aureus* (Gram positiva). Na **Figura 9** está o resultado do teste realizado com amostras da manta PVA/PCL/CFP 25% dos dois lados (**Figuras 9A a 9D**), seguido dos controles (**Figuras 9E a 9H**). É possível observar que não houve formação de halo em nenhuma das placas, isso se repetiu para as mantas testadas com outras concentrações do CFP (10, 20 e 30%) (não apresentadas aqui). Quando removidos os discos, também não foi possível observar inibição por contato causado pelas amostras.

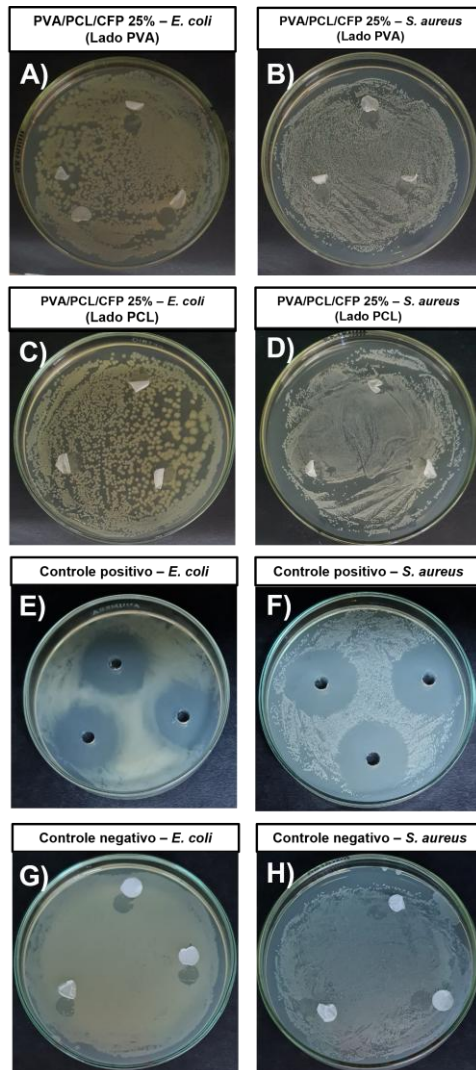


Figura 9: Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão da manta PVA/PCL/CFP 25% (de **A** até **D**) e controles (**E** até **H**). Na primeira coluna estão as placas dos ensaios contra *E. coli* e na segunda coluna contra *E. aureus*.

Entretanto, na placa em que amostras da manta PVA/PCL/CFP 25% estão com o lado do PVA em contato com *E. coli* (**Figura 9A**), é possível ver uma diminuição da colônia bacteriana no local onde estavam os discos, sendo este o resultado mais promissor nesse primeiro teste. A ausência de atividade antimicrobiana neste primeiro teste motivou a incorporação de nanopartículas

de prata na superfície das nanofibras, cujos resultados serão apresentados a seguir.

3.2.2. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP modificadas por imersão

Buscando potencializar o efeito antimicrobiano, as mantas de nanofibras foram submetidas à modificação de superfície com caldo fermentado combinado às AgNP. Optou-se por prosseguir apenas com as mantas PVA/PCL/CFP 25%, PVA/PCL/CFP 20% e PVA/PCL/CFP 10% para serem modificadas por imersão. Os dois primeiros foram escolhidos pela facilidade de produção da fibra e pela qualidade final das mantas obtidas, além do fato da carga de 25% do caldo fermentado apresentar uma baixa atividade bactericida. Já a manta com 10% de carga foi escolhida como “controle”, uma vez que apresentou resultados iguais aos dos controles negativos e produz mantas de melhor qualidade e manuseio em comparação com as mantas de PVA/PCL bicamada sem caldo.

As amostras preparadas em forma de discos foram deixadas nas soluções de CFP e AgNP por 24 horas e então foram feitas imagens por meio da técnica MEV-FEG para visualizar a morfologia das mantas e identificar a presença de nanopartículas nas fibras. Na **figura 10** são apresentadas as imagens das amostras 2PC20@iCAg (**Figura 10A**), 2PC25@iCAg (**Figura 10B**), 2PC10@iC (**Figura 10C**). É possível observar que na amostra 2PC20@iCAg houve a formação de um filme sobre as fibras, demonstrando um aspecto de aglomerados em algumas regiões. Entretanto, isso foi visualizado apenas em um dos lados da manta e o mesmo efeito foi visto na amostra 2PC20@iAg. Já a amostra 2PC25@iCAg, bem como a amostra 2PC25@iAg, não apresentaram nenhuma formação de aglomerados. Por fim, a amostra 2PC10@iC apresentou uma formação de camadas nos dois lados da amostra, cobrindo quase totalmente as fibras. Em nenhuma das amostras foram visualizadas nanopartículas, não sendo possível afirmar se elas se aderiram ou não à superfície das mantas.

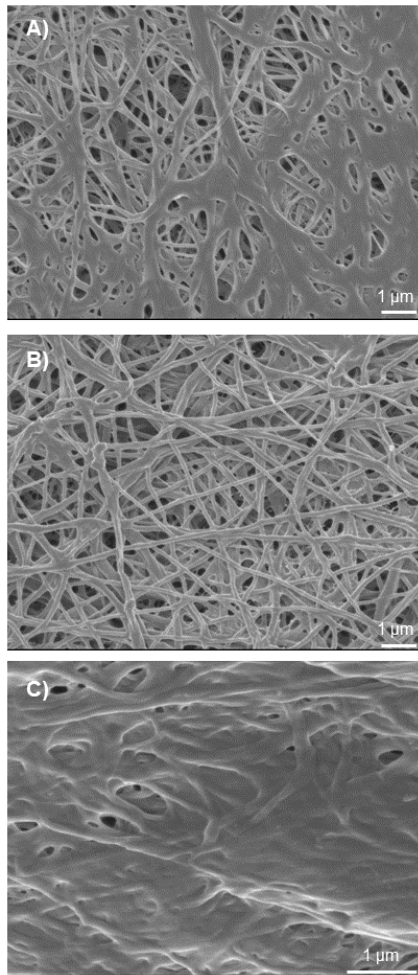


Figura 10: Imagens de MEV-FEG das mantas de nanofibras após imersão por 24 horas. **A)** 2PC20@iCAg (x 10.000); **B)** 2PC25@iCAg (x10.000); **C)** 2PC10@iC (x20.000).

É possível que os aglomerados observados na superfície das fibras possam ser causados pela dissolução do PVA durante a imersão, uma vez que esse polímero apresenta características hidrofílicas (Mansur *et al.*, 2007). Existe ainda a possibilidade de o caldo fermentado ter aderido à superfície das fibras, uma vez que esse tipo de aspecto é característico de soluções contendo alta carga de proteínas e açúcares (Etorki *et al.*, 2016). Com o objetivo de investigar a origem desses aglomerados e o comportamento do PVA em solução, foi feito um ensaio-teste com mantas puras de PVA e mantas puras de

PCL, bem como de mantas PVA/CFP 20%, PVA/CFP 25%, PCL/CFP 20% e PCL/CFP 25%. As amostras contendo CFP foram deixadas em água por 2 ou 24 horas, e amostras de mantas de PCL e PVA sem o caldo foram imergidas em solução de CFP 10 mg/mL. Na **Figura 11**, as imagens de MEV mostram regiões representativas das mantas resultantes de cada teste. Por meio das **Figuras 11A** e **11B** é possível observar que não houve alteração na estrutura das nanofibras de PCL após a imersão em água.

Já na **Figura 11C** é possível observar que ocorre o processo de dissolução do PVA após a imersão das mantas em água por 2 horas. Dessa forma, pode-se assumir que as nanofibras visualizadas no MEV-FEG anteriormente eram constituídas majoritariamente de PCL, confirmando a hipótese de dissolução do PVA durante o processo de imersão em soluções aquosas. A **Figura 11D** mostra que a manta de PCL, após permanecer 24 horas imersa em solução de CFP, apresentou a formação da camada de aglomerados vista anteriormente, indicando que de fato, os aglomerados observados na superfície das mantas de PCL são formados por compostos orgânicos presentes no caldo fermentado.

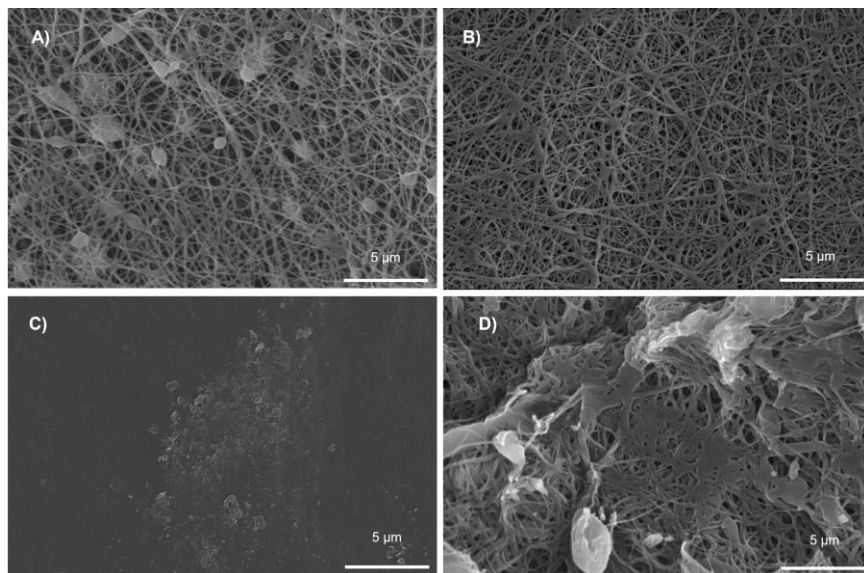


Figura 11: Imagens de MEV de mantas após imersão. Tanto as amostras das imagens **A)** PCL puro quanto **B)** PCL/CFP 25% ficaram imersas em água por 24 horas (ambas x 5000); **C)** Manta de PVA após 2 horas de imersão em água (x500) **D)** Manta de PCL após 24 h.

As mantas modificadas por imersão foram testadas em relação ao seu efeito antimicrobiano, cujos resultados podem ser vistos na **Figura 12**. Todas as amostras que foram imergidas em soluções contendo AgNPs, com ou sem CFP, apresentaram inibição por contato contra *E. coli* (**Figuras 12A e 12C**), mas contra *S. aureus* (**Figuras 12B e 12D**), as amostras causaram apenas uma redução do crescimento das bactérias sob o disco, mas não o impediu completamente. A amostra 2PC10@iC, modificada apenas com caldo no seu exterior, não apresentou atividade antimicrobiana.

Nesse ensaio, as amostras permaneceram em imersão por apenas 3 horas com o intuito de verificar a bioatividade em um tempo menor de modificação por imersão, a fim de evitar solubilização do PVA. Posteriormente, verificou-se que a estrutura de nanofibras do PVA era desfeito em apenas 2 horas e o ensaio com as mantas bicamadas não foi repetido.

Com isso, pode-se concluir que, mesmo quando adicionado externamente, apenas o CFP não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, enquanto amostras modificadas apenas com AgNPs demonstraram o mesmo resultado do que amostras que foram imersas nas soluções contendo AgNPs e CFP, não sendo possível afirmar se o caldo fermentado auxiliou ou não na atividade antimicrobiana. São necessários novos testes variando a concentração das duas soluções para averiguar o quanto o caldo pode colaborar com as AgNPs na atividade bactericida, sendo possível assim, reduzir ao máximo a concentração das nanopartículas de prata.

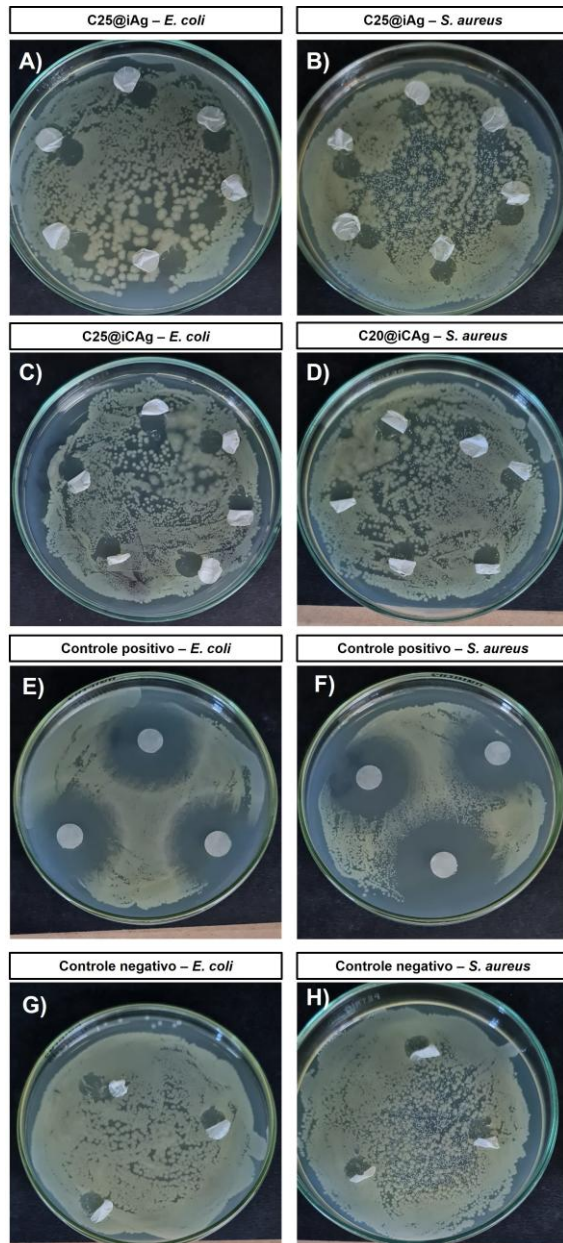


Figura 12: Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das amostras 2PC25@iAg (A e B), 2PC25@iCAg (C e D) e controles (E a G). Nas placas contendo 6 discos, os 3 superiores são de discos com o lado do PVA em contato com o ágar, enquanto os 3 inferiores estão com o lado do PCL.

3.2.3. Caracterização de mantas de PVA/PCL/CFP modificadas por aspersão

Outra abordagem escolhida para modificação das mantas foi a aspersão, visando evitar que o PVA fosse desfeito durante a modificação superficial, como na imersão. Após o procedimento de aspersão, as mantas foram caracterizadas por MEV para análise da morfologia. Nas imagens é possível observar a formação apenas de uma camada de material solidificado, com a amostra 2PC25@aCAg (Figuras 13A e 13B) tendo algumas rachaduras que não aparecem na amostra 2PC25@aAg (Figuras 13C e 13D), causadas pela presença dos compostos orgânicos no caldo fermentado que formam um filme com uma estrutura compacta que se racham durante o manuseio.

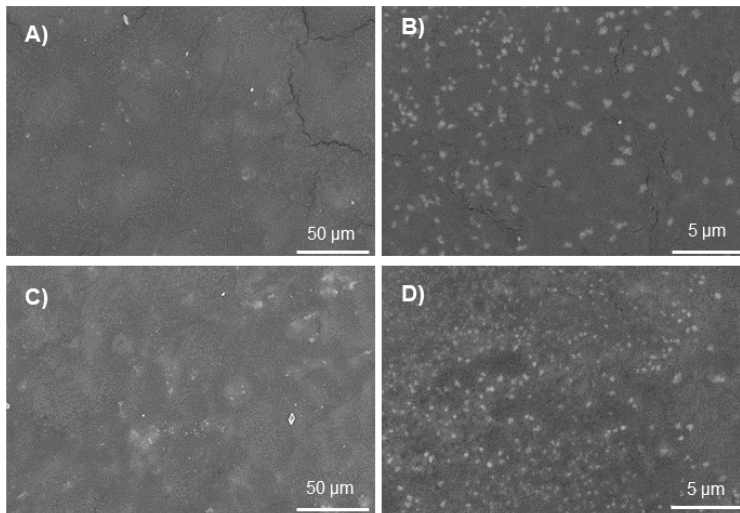


Figura 13: Imagens de MEV de mantas de nanofibras após procedimento de aspersão. As figuras **A)** e **B)** são imagens em diferentes magnificações (x500 e x5000, respectivamente) da amostra 2PC25@aCAg; **C)** e **D)** são imagens da amostra 2PC25@aAg nas mesmas magnificações.

Utilizando novamente o método do halo antimicrobiano, as mantas modificadas por aspersão foram testadas em relação à sua atividade contra *E. coli* e *S. aureus*. Na **Figura 14** estão as imagens obtidas no fim do experimento. Nenhuma das amostras testadas demonstrou atividade contra *S. aureus* (**Figuras 14B** e **14D**), sendo que a bactéria cresceu normalmente sob o disco. Contra *E. coli* (**Figuras 14A** e **14C**), o crescimento sob as amostras

estava reduzido em relação ao restante da placa, mas foi possível identificar a presença de bactérias em todas as amostras nas triplicatas.

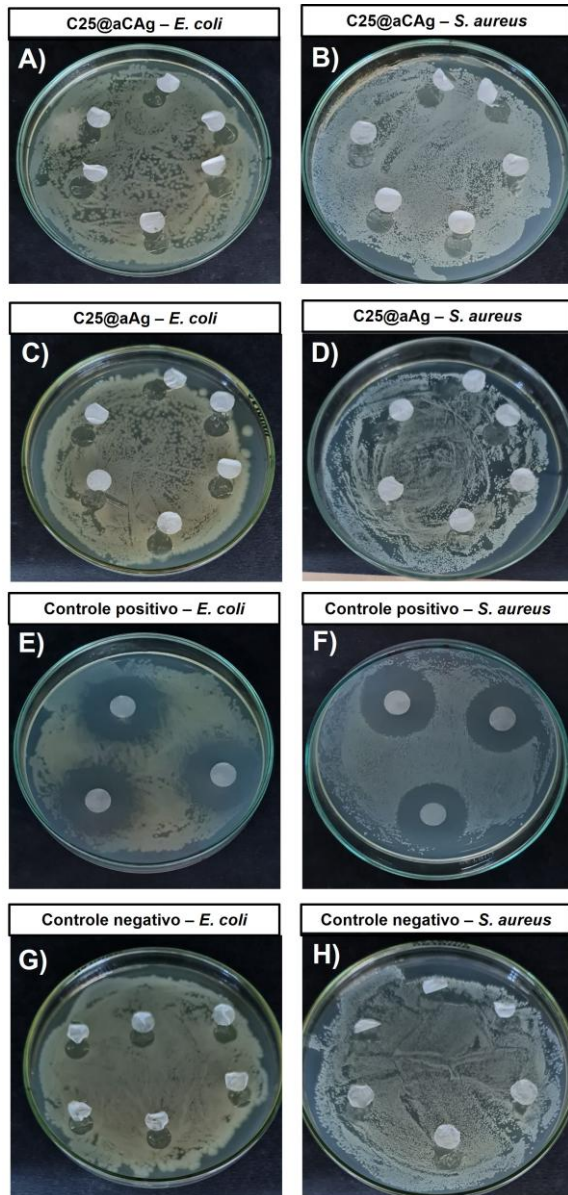


Figura 14: Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das amostras 2PC25@aCAg (Figuras A e B), 2PC25@aAg (Figuras C e D) e controles (E a H). Nas placas contendo 6 discos, os 3 superiores são de discos com o lado do PVA em contato com o ágar, enquanto os 3 inferiores estão com o lado do PCL.

3.2.4. Caracterização de mantas de PCL/CFP modificadas por imersão

Levando em consideração os resultados obtidos, foi realizada a modificação superficial de mantas de PCL, sem a camada de PVA. As mantas de PCL/CFP foram produzidas seguindo os mesmos parâmetros utilizados anteriormente, aumentando-se apenas o tempo de fiação de 90 min para 150 min. Após passarem pela modificação superficial por imersão, foi realizada a análise das amostras resultantes por FTIR, cujos espectros são apresentados na **Figura 15**. Observa-se que os espectros das amostras permaneceram bastante similares antes e após as modificações, sendo mais visível a alteração do espectro da amostra PC25@iAg (**Figura 15B**), onde a banda relacionada ao CFP (1600 cm^{-1}) diminuiu de forma mais considerável. Na **Figura 16**, nos espectros das amostras P@iC (**Figura 16C**) e P@iCAg (**Figura 16D**) é possível observar a presença dos picos próximos a 1600 cm^{-1} , indicando a presença do CFP pós modificação superficial.

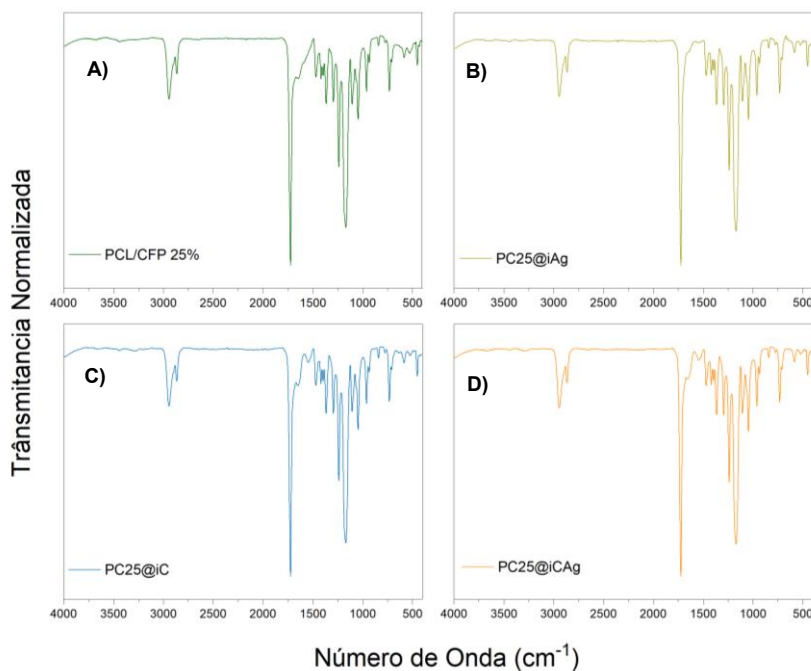


Figura 15: Espectros de FTIR A) da manta de PCL/CFP 25% e das amostras B) PC25@iAg, C) PC25@iC e D) PC25@iCAg.

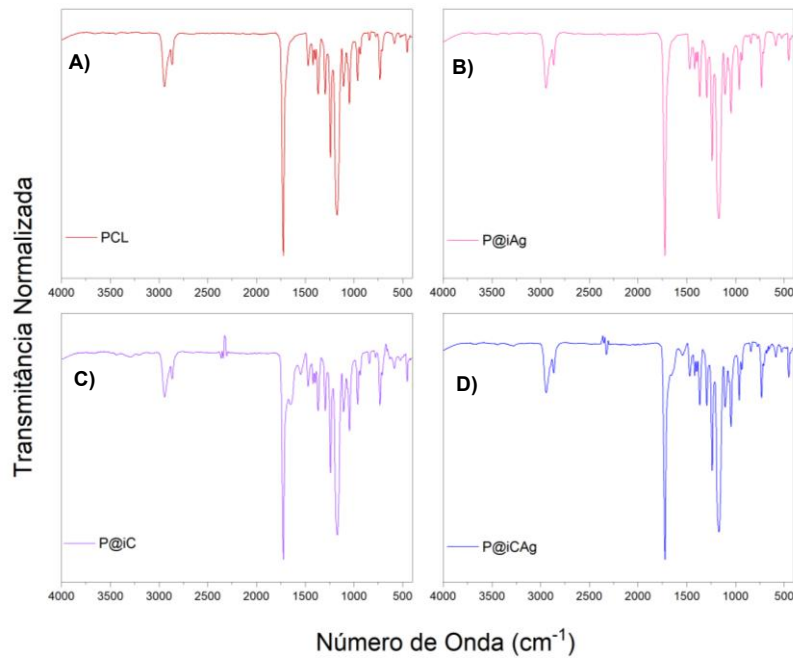


Figura 16: Espectros de FTIR **A)** da manta de PCL e das amostras **B)** P@iAg, **C)** P@iC e **D)** P@iCAg.

A morfologia das amostras foi caracterizada por MEV (**Figura 17**). É possível confirmar que a presença do CFP na composição das nanofibras tem de fato grande influência na morfologia, formando fibras com menos defeitos (**Figura 17A**) em relação a manta composta apenas de PCL (**Figura 17B**).

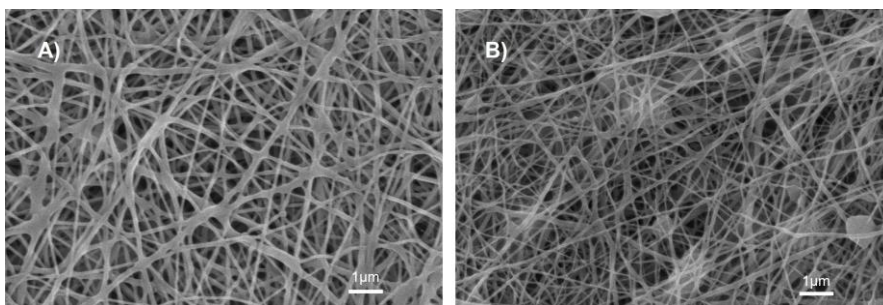


Figura 17: Imagens de MEV das mantas **A)** PCL/CFP 25% e **B)** PCL, ambas na magnificação de x10.000.

As amostras PC25@iC, PC25@iAg e PC25@iCAg analisadas sob as mesmas magnificações (**Figuras 18A, 18B e 18C**, respectivamente) demonstraram poucas alterações em relação as mantas não modificadas. Em algumas regiões foi possível observar a presença de aglomerados mais densos na amostra PC25@iCAg (**Figura 18D**) bem como na amostra PC25@iAg, possivelmente causada pelos compostos orgânicos do caldo fermentado, mas ainda assim, a estrutura das nanofibras não foi perdida.

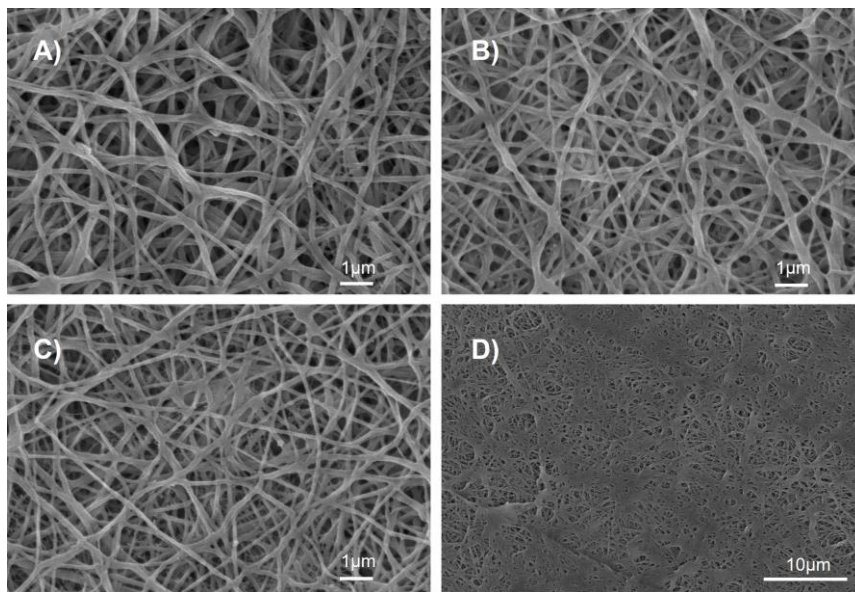


Figura 18: Imagens de MEV das amostras **A)** PC25@iC, **B)** PC25@iAg e **C)** PC25@iCAg na magnificação de x10.00. **D)** Imagens de MEV com Magnificação de x2.500 da amostra PC25@iCAg .

Um curativo ideal deve apresentar resistência mecânica e hidrofiliçidade, para que possa servir não apenas como proteção para a ferida, mas também para permitir a motilidade celular na região e para que o meio aquoso penetre na matriz polimérica sem deformar sua morfologia (Gordienko *et al.*, 2021; Hendrick e Frey, 2014). Com o objetivo de investigar a molhabilidade das mantas, realizou-se a análise de ângulo de contato. Os resultados demonstraram valores médios de $115,4 \pm 6,4^\circ$ para as mantas de PCL, e de $62,8 \pm 3,0^\circ$ para PCL/CFP 25%. Levando em consideração que quanto menor o ângulo encontrado, maior a hidrofiliçidade, podemos observar uma significativa melhora na molhabilidade das mantas com a incorporação do CFP nas fibras

de PCL. Sabe-se que materiais hidrofóbicos usados como curativos funcionam como barreiras que impedem a entrada de microrganismos, entretanto caso a matrix seja totalmente hidrofóbica, ela pode ser deformada durante a entrada de meio aquoso, além de não permitir uma adesão celular adequada para a cicatrização, o que demonstra mais uma vantagem decorrente da incorporação do caldo durante o processo de eletrofiação, uma vez que as células precisam de um equilíbrio entre hidrofilicidade e hidrofobicidade do material (Jin *et al.*, 2016; Moradkhannejhad *et al.*, 2020).

Na **Figura 19** é possível observar a diferença de comportamento das gotas sobras as mantas de PCL e de PCL/CFP 25% depois de 60s do teste.

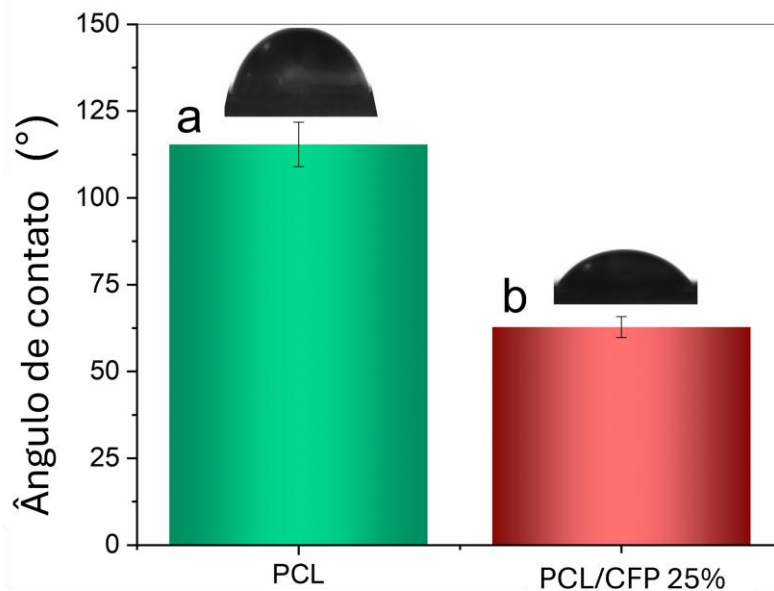


Figura 19: Valor médio do ângulo de contato das mantas de PCL e PCL/CFP 25%. Médias com pelo menos uma letra similar indica que não houve diferença estatística ($p > 0.05$). Reproduzido com permissão da referência Oliveira *et al.*, 2025)

Por fim, a atividade antimicrobiana das amostras PC25@iC, PC25@iAg, PC25@iCAg, P@iC, P@iAg, P@iCAg foi avaliada pelo teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão, desta vez apenas contra *E. coli*, e os resultados podem ser vistos na **Figura 20**. A manta PCL/CFP 25% não apresentou atividade antimicrobiana (**Figura 20A**), uma vez que não houve formação de halo e nem inibição por contato. A manta de PCL (**Figura 20E**) por sua vez conseguiu impedir parcialmente o crescimento por contato das

bactérias. Isso pode ser explicado pela sua capacidade de atuar como uma barreira devido à sua hidrofobicidade, impedindo o crescimento dos microrganismos por falta de motilidade e proliferação celular (Gordienko *et al.*, 2021; Moradkhannejhad *et al.*, 2020). Entretanto, essa mesma característica também dificultou a fixação completa da manta no ágar, gerando rugosidades no material que permitiram o desenvolvimento de colônias abaixo da manta.

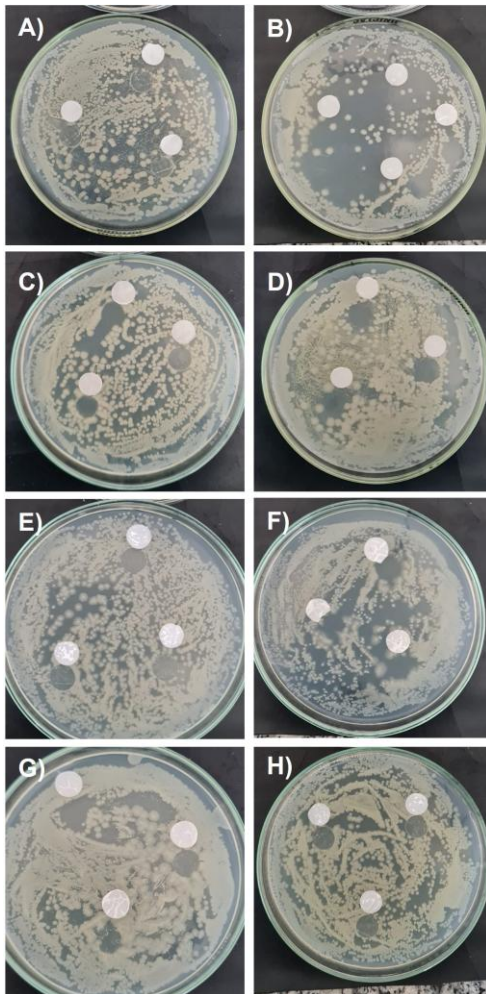


Figura 20: Fotografias das placas do teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão das mantas **A)** PCL/CFP 25% e **E)** PCL, além das amostras **B)** PC25@iC, **C)** PC25@iCAg, **D)** PC25@iAg, **F)** P@iC, **G)** P@iCAg e **H)** P@iAg.

O mesmo fenômeno se repetiu com as amostras P@iC (**Figura 20F**), P@iCAg (**Figura 20G**) e P@iAg (**Figura 20H**) que apresentaram diminuição do

crescimento bacteriano, mas devido às rugosidades presentes, não conseguiram impedir completamente o crescimento das bactérias. As amostras PC25@iC (**Figura 20B**) e PC25@iCAg (**Figura 20C**) apresentaram uma inibição por contato mais eficiente em comparação com as amostras anteriores, sendo essas capazes de interagir melhor com o ágar, se fixando mais facilmente à sua superfície. Por fim, a amostra PC25@iAg demonstrou o resultado mais promissor obtido no trabalho, já que não apenas foi capaz de causar inibição por contato, mas também formou um pequeno halo de inibição com tamanho de aproximadamente 1,5 cm, levando em conta o diâmetro da amostra, de 0,9 cm (**Figura 21**).

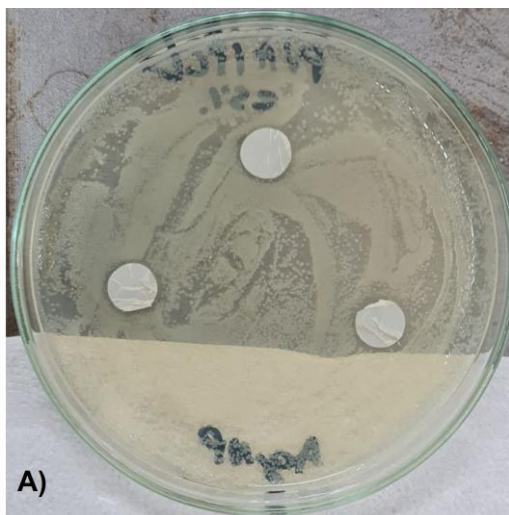


Figura 21: Amostra PC25@iAg em placa contendo *E. coli* foi capaz de formar um pequeno halo de inibição com tamanho aproximado de 1,5cm. (Reproduzido com permissão da referência Oliveira *et al.*, 2025).

4. Considerações Finais

No presente trabalho foi demonstrado uma maneira de produção de mantas de PVA e de PCL carregadas com caldo fermentado de *Paenibacillus polymyxa*, cultivado com *S. aureus* em diferentes proporções, para uma possível aplicação em curativos de pele. As mantas apresentaram aspectos positivos, como homogeneidade de diâmetro das nanofibras e poucos defeitos. Verificou-se vantagens na produção como consequência da incorporação do caldo, tais como melhor nanoestruturação das fibras e significativa melhora na molhabilidade das mantas resultantes. Através do FTIR foi possível afirmar que o caldo fermentado foi incorporado com sucesso.

Inicialmente, buscou-se explorar a atividade antimicrobiana do CFP como único princípio ativo das mantas, entretanto, o material formado não apresentou a atividade antimicrobiana desejada, o que levou a busca de abordagens complementares. Deste modo, mantas modificadas por imersão utilizando o caldo e nanopartículas de prata foram produzidas e apresentaram uma promissora atividade antimicrobiana contra *E. coli*, apesar de danificar a estrutura da manta bicamada por dissolver o PVA. Dessa forma, ao remover o PVA da formulação, foi possível obter uma manta de PCL com características favoráveis, como uma maior resistência em relação a manta produzida com PVA e maior molhabilidade em relação a manta pura de PCL.

Observou-se que a amostra PC25@iAg, produzida com a manta de PCL/CFP 25% modificada superficialmente com solução de nanopartículas de prata (0,1 mg/mL) mostrou atividade antimicrobiana promissora. Estudos relacionados a citotoxicidade e *in vivo* das mantas ainda se fazem essenciais no futuro para uma possível aplicação em curativos. Podem ser realizados também estudos para reduzir ainda mais a concentração de nanopartículas de prata na superfície da manta ou para substituir o antimicrobiano com outras nanoestruturas promissoras, uma vez que a manta de PCL produzida com o CFP mostrou-se mais adaptável para funcionalização e aplicação em curativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALI, I.; KHAN, S.; SHAH, K.; HAROON; KALIMULLAH; BIAN, L.. Microscopic analysis of plant-mediated silver nanoparticle toxicity in rainbow trout fish (*Oncorhynchus mykiss*). **Microscopy Research And Technique**, [S.L.], v. 84, n. 10, p. 2302-2310, 28 maio 2021. Wiley.

Disponível em: < <https://analyticalsciencejournals-onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jemt.23785>>.

Acesso em: 24/01/2023

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

AMARIEI, G.; KOKOL, V.; BOLTES, K.; LETÓN, P.; ROSAL, R. Incorporation of antimicrobial peptides on electrospun nanofibres for biomedical applications. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 8, n. 49, p. 28013-28023, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em:

<<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/ra/c8ra03861a>>.

Acesso em: 29/09/2022.

AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAN, B. **European Polymer Journal** 2019, 117, 304. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014305719304720>>.

Acesso em: 29/09/2022.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

BEER, C.; FOLDBJERG, R.; HAYASHI, Y.; SUTHERLAND, D. S.; AUTRUP, H. Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 208, n. 3, p. 286-292, fev. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-4274\(11\)01602-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378-4274(11)01602-X)>.

Acesso em: 29/03/2022.

BALLESTEROS, C. A. S.; CORREA, D. S.; ZUCOLOTTO, V. Polycaprolactone nanofiber mats decorated with photoresponsive nanogels and silver nanoparticles: Slow release for antibacterial control. **Materials Science and Engineering: C**, [s.l.], v. 107. Pg 1-8, fev. 2020. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493119328966?via%3Dihub>>.

Acesso em: 29/03/2022.

BOATENG, J.; CATANZANO, Ovidio. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 104, n. 11, p. 3653-3680, nov. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022354916301538>>.

Acesso em: 29/08/2022

BOATENG, Joshua S.; MATTHEWS, Kerr H.; STEVENS, Howard N.e.; ECCLESTON, Gillian M.. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: a review. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 97, n. 8, p. 2892-2923, ago. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022354916326521>>.

Acesso em: 29/09/2022.

CAVICCHIOLI, Rafael. **Potencial Biotecnológico do *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, Endofítico Isolado De Prunus Sp. (Cerrado), Para Atividade Antimicrobiana e Inflamação Aguda.** 91 pag. Dissertação de mestrado em biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 22/02/2017.

CAVICCHIOLI, Rafael. **Avaliação do potencial antimicrobiano, leishmanicida, antitumoral e perfil citotóxico dos cultivos puros e mistos de *Paenibacillus polymyxa* e bioprospecção da atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de diferentes fontes vegetais.** 122 pag. Tese de doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 28/08/2021.

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário.** 371 pag. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

HEN, H.; YUAN, L.; SONG, W.; WU, Z.; LI, D.. Biocompatible polymer materials: role of protein:surface interactions. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 1059-1087, nov. 2008. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670008000695?via%3Dihub>>.

Acesso em: 28/01/2023.

CHEN, Z.; GAO, X.; JIAO, Y.; QIU, Y.; WANG, A.; YU, M.; CHE, F.; LI, S.; LIU, J.; LI, J.; ZHANG, H.; YU, C.; LI, G.; GAO, Y.; PAN, L.; SUN, W.; GUO, J.; CAO, B.; ZHU, Y.; XU, H. Tanshinone IIA Exerts Anti-Inflammatory and Immune-Regulating Effects on Vulnerable Atherosclerotic Plaque Partially via the TLR4/MyD88/NF-B Signal Pathway. **Front. Pharmacol.**, 2019, 10, 850. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00850/full>>.

Acesso em: 29/09/2022.

CHOU, S. F.; CARSON, D.; WOODROW, K. A. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 220, p. 584-591, dez. 2015. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5235363/>>.

Acesso em: 30/09/2022

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal Of Molecular Evolution**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 26-40, 28 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00239-019-09914-3>>.

Acesso em: 29/09/2022.

DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. Electrospun fibers of chitosan-grafted polycaprolactone/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blends. **Journal Of Materials Chemistry B**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 600-612, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/TB/C5TB01861G>> . Acesso em: 29/09/2022.

EK-RAMOS, M. J.; GOMEZ-FLORES, R.; OROZCO-FLORES, A. A.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GONZÁLEZ-OCHOA, G.; TAMEZ-GUERRA, P.. Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 29 mar. 2019. Frontiers Media SA. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00463/full>>. Acesso em: 27/01/2023.

ETORKI, A. M.; GAO, M.; SADEGHI, R.; MALDONADO-MEJIA, L. F.; KOKINI, J. L. Effects of Desolvating Agent Types, Ratios, and Temperature on Size and Nanostructure of Nanoparticles from α -Lactalbumin and Ovalbumin. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 81, n. 10, p. 2511-2520, 16 set. 2016. Wiley. Disponível em: <<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.13447>>. Acesso em: 29/09/2022.

FILIPPOUSI, M.; TURNER, S.; LEUS, K.; SIAFAKA, P. I.; TSELIGKA, E. D.; VANDICHEL, M.; NANAKI, S. G.; VIZIRIANAKIS, I. S.; BIKIARIS, D. N.; VOORT, P. van Der. Biocompatible Zr-based nanoscale MOFs coated with modified poly(ϵ -caprolactone) as anticancer drug carriers. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 509, n. 1-2, p. 208-218, jul. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517316304379>>. Acesso em: 28/01/2023.

Fleming, A. Penicillin's finder assays its future. **N. Y. Times**, pag 21. Junho de 1945.

GAO, Y.; WU, W.; QIAO, K.; FENG, J.; ZHU, L.; ZHU, X.. Bioavailability and toxicity of silver nanoparticles: determination based on toxicokinetic-toxicodynamic processes. **Water Research**, [S.L.], v. 204, p. 117603, out. 2021. Elsevier BV. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34536684/>>. Acesso em: 29/09/2022

GHADERPOUR, A.; HOSEINKHANI, Z.; YARANI, R.; MOHAMMADIANI, S.; AMIRI, F.; MANSOURI, K. Altering the characterization of nanofibers by changing the electrospinning parameters and their application in tissue engineering, drug delivery, and gene delivery systems. **Polymers For Advanced Technologies**, [S.L.], v. 32, n. 5, p. 1924-1950, 16 fev. 2021. Wiley. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pat.5242>>. Acesso em: 29/09/2022.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

GRAÇA, M. F. P.; MELO-DIOGO, D.; CORREIA, I. J.; MOREIRA, A. F. Electrospun Asymmetric Membranes as Promising Wound Dressings: a review. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 183, 30 jan. 2021. MDPI AG. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/13/2/183>>. Acesso em: 29/09/2022.

GENILLOU, O. Natural products discovery and potential for new antibiotics. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 51, p. 81-87, out. 2019. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527419300013?via%3Dihub>>. Acesso em: 29/09/2022.

GIZAW, M.; THOMPSON, J.; FAGLIE, A.; LEE, S.; NEUENSCHWANDER, P.; CHOU, S. Electrospun Fibers as a Dressing Material for Drug and Biological Agent Delivery in Wound Healing Applications. **Bioengineering**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-29, 27 jan. 2018. MDPI AG. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5874875/>>. Acesso em: 29/09/2022.

GORDIENKO, M.; KARAKATENKO, E.; MENSHTINA, N.; KOROLEVA, M.; GILMUTDINOVA, I.; EREMIN, P. Composites Composed of Hydrophilic and Hydrophobic Polymers, and Hydroxyapatite Nanoparticles: synthesis, characterization, and study of their biocompatible properties. **Journal Of Functional Biomaterials**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 55-62, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4983/12/4/55>>. Acesso em: 23/01/2023.

HENDRICK E.; FREY M. Increasing Surface Hydrophilicity in Poly(Lactic Acid) Electrospun Fibers by Addition of Pla-b-Peg Co-Polymers. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**. 2014;9(2). Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/155892501400900219>>. Acesso em: 23/01/2023.

HINESTROZA, H. P.; URENA-SABORIO, H.; ZURITA, F.; LEÓN, A. Al. G. de; SUNDARAM, G.; SULBARÁN-RANGEL, B.. Nanocellulose and Polycaprolactone Nanospun Composite Membranes and Their Potential for the Removal of Pollutants from Water. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 683-696, 6 fev. 2020. MDPI AG. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/13/10/1591>>. Acesso em: 24/01/2023.

HUANG, P.; WANG, Z.; CAI, K.; WEI, L.; CHU, Y.; GUO, M.; FAN, E. Targeting Bacterial Membrane Proteins to Explore the Beneficial Effects of Natural Products: new antibiotics against drug resistance. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 29, n. 12, p. 2109-2126, abr. 2022. Bentham Science Publishers Ltd. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/116139>>. Acesso em: 29/09/2022.

HU, X.; VANDAMME, P.; BOON, N. Co-cultivation enhanced microbial protein production based on autotrophic nitrogen-fixing hydrogen-oxidizing bacteria. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 429, p. 132535, fev. 2022. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894721041139>>. Acesso em: 29/09/2022.

IGNATOVA, M.; MANOLOVA, N.; MARKOVA, N.; RASHKOV, I. Electrospun Non-Woven Nanofibrous Hybrid Mats Based on Chitosan and PLA for Wound-Dressing Applications. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.102-111, 9 jan. 2009. Wiley. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mabi.200800189>>. Acesso em: 29/09/2022.

JÄRBRINK, K., NI, G., SÖNNERGRÉN, H., SCHMIDTCHEN, A., PANG, C., BAJPAI, R.; CAR, J. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-7, 24 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5259833/>>. Acesso em: 17/01/2023.

JEONG, H., CHOI, S., RYU, C., PARK, S. Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, p.1-15, 15 mar. 2019. Frontiers Media SA. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00467/full>>. Acesso em: 29/09/2022.

JIN, S. G.; YOUSAF, A. M.; KIM, K. S.; KIM, D. W.; KIM, D. S.; KIM, J. K.; YONG, C. S.; YOUN, Y. S.; KIM, J. O.; CHOI, Han-Gon. Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 501, n. 1-2, p. 160-166, mar. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316300448>>. Acesso em: 23/01/2023.

KRATOCHVIL, M. J.; YANG, T.; BLACKWELL, H. E.; LYNN, D. M. Nonwoven Polymer Nanofiber Coatings That Inhibit Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus*: toward new nonbactericidal approaches to infection control. **ACS Infectious Diseases**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 271-280, 20 fev. 2017. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsinfectdis.6b00173>>. Acesso em: 29/09/2022.

KYAW, B., JÄRBRINK, K., MARTINENGO, L., CAR, J., HARDING, K., A SCHMIDTCHEN. Need for Improved Definition of "Chronic Wounds" in Clinical Studies. **Medical Journals Sweden AB**. *Acta Dermato Venereologica*, v. 98, n.

1, p. 157-158, 2018. Disponível em: <
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28880344/>>.
 Acesso em: 17/01/2023.

LANDSIEDEL, R., MA-HOCK, L., KROLL, A., HAHN, D., SCHNEKENBURGER, J., WIENCH, K., Wohleben, W., 2010. **Testing metal-oxide nanomaterials for human safety**. *Adv. Mater.* 22, 2601–2627. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.200902658>>.
 Acesso em: 29/09/2022.

LAZAREVA, A.; KELLER, A. A.. Estimating Potential Life Cycle Releases of Engineered Nanomaterials from Wastewater Treatment Plants. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 1656-1665, 4 jun. 2014. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ez400106t>>.
 Acesso em: 27/01/2023.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

LAZARUS, G. S. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. **Archives Of Dermatology**, [S.L.], v. 130, n. 4, p. 489, 1 abr. 1994. American Medical Association (AMA). Disponível em: <
<https://jhu.pure.elsevier.com/en/publications/definitions-and-guidelines-for-assessment-of-wounds-and-evaluatio-3>>.
 Acesso em: 29/09/2022.

LEVINE, D. P. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 5-12, 1 jan. 2006. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <
https://academic.oup.com/cid/article/42/Supplement_1/S5/275962?login=false>.
 Acesso em: 29/09/2022.

LI, H.-T.; LIU, T.; YANG, R.; XIE, F.; YANG, Z.; YANG, Y.; ZHOU, H.; DING, Z.-T.. Phomretones A–F, C12 polyketides from the co-cultivation of *Phoma* sp. YUD17001 and *Armillaria* sp. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 10, n. 31, p. 18384-18389, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/ra/d0ra02524k>>.
 Acesso em: 26/01/2023.

LI, J-H; SHAO, X.-S.; ZHOU, Q.; LI, Mi-Zi; ZHANG, Qi-Q.. The double effects of silver nanoparticles on the PVDF membrane: surface hydrophilicity and antifouling performance. **Applied Surface Science**, [S.L.], v. 265, p. 663-670, jan. 2013. Elsevier BV. Disponível em: <
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169433212020302?via%3Dihub>>.
 Acesso em: 10/04/2023.

LI, J.-Y.; GAO, T.-T.; WANG, Q. Comparative and Functional Analyses of Two Sequenced *Paenibacillus polymyxa* Genomes Provides Insights Into Their Potential Genes Related to Plant Growth-Promoting Features and Biocontrol Mechanisms. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-20, 17 dez. 2020. Frontiers Media SA. Disponível em: <
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.564939/full>>.

Acesso em: 27/01/2023

LIU, L.; CAI, R.; WANG, Y.; TAO, G.; AI, L.; WANG, P.; YANG, M.; ZUO, H.; ZHAO, P.; SHEN, H.. Preparation and Characterization of AgNPs In Situ Synthesis on Polyelectrolyte Membrane Coated Sericin/Agar Film for Antimicrobial Applications. **Materials**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 1205-1219, 13 jul. 2018. MDPI AG. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1996-1944/11/7/1205>>. Acesso em: 24/01/2023.

LOCILENTO, D. A.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; LUNA, G. L. F.; BRASSOLATTI, P.; ANIBAL, F. F.; CORREA, D. S. Biocompatible and Biodegradable Electrospun Nanofibrous Membranes Loaded with Grape Seed Extract for Wound Dressing Application. **Journal Of Nanomaterials**, [S.L.], v. 2019, p. 1-11, 6 mar. 2019. Hindawi Limited. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/2472964/>>. Acesso em: 02/10/2022.

LOUREIRO, R. J., ROQUE, F., RODRIGUES, A. T., HERDEIRO, M. T., RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.77-84, jan. 2016. Elsevier BV. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087090251500067X>>. Acesso em: 29/09/2022.

LU, J.; LV, Y.; QIAN, X.; JIANG, Y.; WU, M.; ZHANG, W.; ZHOU, J.; DONG, W.; XIN, F.; JIANG, M.. Current advances in organic acid production from organic wastes by using microbial co-cultivation systems. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 481-492, 18 dez. 2019. Wiley. Disponível em: < <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/bbb.2075>>. Acesso em: 26/01/2023.

MARTINENGO, L.; OLSSON, M.; BAJPAI, R.; SOLJAK, M.; UPTON, Z.; SCHMIDTCHEN, A.; CAR, J.; JÄRBRINK, K.. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. **Annals Of Epidemiology**, [S.L.], v. 29, p. 8-15, jan. 2019. Elsevier BV. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1047279717310311?via%3Dihub>>. Acesso em: 23/01/2023

MARMANN, A.; ALY, A.; LIN, W.; WANG, B.; PROKSCH, P.. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 17 fev. 2014. MDPI AG. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1660-3397/12/2/1043>>. Acesso em: 29/09/2022.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 134, p.1-17,

jun. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295216303793?via%3Dihub>>.

Acesso em: 29/09/2022.

MEENA, K. *et al.* Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 091-098, 2018. Journal of Applied Pharmaceutical Science. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/324153686_Lipopeptide_antibiotic_production_by_Bacillus_velezensis_KLP2016>.

Acesso em: 29/09/2022.

MENKE, N. B.; WARD, K. R.; WITTEN, T. M.; BONCHEV, D. G.; DIEGELMANN, Robert F. Impaired wound healing. **Clinics In Dermatology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 19-25, jan. 2007. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0738081X06001829?via%3Dihub>>.

Acesso em: 29/09/2022.

MERCANTE, L.; ANDRE, R.; MACEDO, J.; PAVINATTO, A.; CORREA, D. NANOFIBRAS ELETROFIADAS E SUAS APLICAÇÕES: avanços na última década. **Química Nova**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 717-736, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=9274>.

Acesso em: 30/09/2022.

MONTEMAYOR, J. C. G.; BOFARULL, A. M.; MOCHALES, F. B. Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. **Revista Española de Salud Pública**, [S.L.], v. 88, n. 6, p. 829-837, dez. 2014. SciELO Espana/Repisalud.

Disponível em:

<https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S113557272014000600014>.

Acesso em: 02/10/2022.

MORADKHANNEJHAD, L.; ABDOUSS, M.; NIKFARJAM, N.; SHAHRIARI, M. H.; HEIDARY, V. The effect of molecular weight and content of PEG on in vitro drug release of electrospun curcumin loaded PLA/PEG nanofibers. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [S.L.], v. 56, n. , p. 1-11, abr. 2020. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1773224719310032?via%3Dihub>>.

Acesso em: 23/01/2023.

NCCLS. Approved Standard – Eighth Edition. Pennsylvania USA, 2003. Document M2-A8, volume 23 (1)(ISBN 1-56238-485-6).

NCCLS (2). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 83, n. 3, p. 770-803, 12 mar. 2020. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>>. Acesso em: 30/09/2022.

OGUNSONA, E. O.; MUTHURAJ, R.; OJOGBO, E.; VALERIO, O.; MEKONNEN, Tizazu H.. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: a review. **Applied Materials Today**, [S.L.], v. 18, p. 100473, mar. 2020. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S235294071930592X?via%3Dihub>>. Acesso em: 06/04/2023.

OKUR, M. E.; KARANTAS, I. D.; ŞENYİĞİT, Z.; OKUR, N. Ü.; SIAFAKA, P. I. Recent trends on wound management: new therapeutic choices based on polymeric carriers. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 661-684, nov. 2020. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087619311808?via%3Dihub>>. Acesso em: 28/01/2023.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

OLIVEIRA, L. F. R., TEODORO, K.B.R., ANDRE, R.S. *et al.* Combining Electrospun Nanofibers, *Paenibacillus polymyxa* Fermented Broth, and Silver Nanoparticles for Enhanced Antimicrobial Materials. **BioNanoScience**, v. 15, 356, maio 2025. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12668-025-01950-2>>. Acesso em: 04/06/2025.

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

O' NIELL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, pag 1-20. December 2014. Disponível em: <<https://wellcomecollection.org/works/rdpck35v>>. Acesso em: 30/09/2022.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 301-307, jun. 2008. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbfar/a/y8LwqybjgjB9hjwn9c7YJVn/>>. Acesso em: 03/10/2022.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M.. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 1712-1720, 15 mar. 2007. American Society for Microbiology.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

PERCIVAL, N. J. Classification of Wounds and their Management. **Surgery (Oxford)**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 114-117, maio 2002. Elsevier BV. Disponível em: <[https://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319\(06\)70227-7/fulltext](https://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319(06)70227-7/fulltext)>.

Acesso em: 30/09/2022

POLANCO, I. Y. M. **Bactéria Endofítica Associada A *Mikania glomerata* (Asteraceae)**: Investigação Microbiológica, Busca De Substâncias Bioativas E Avaliação Do Seu Efeito In Vitro Na Modulação De Metabólitos Secundários. Dissertação de mestrado em biologia. Universidade Estadual De Campinas. Campinas, SP, 2018.

RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q. R. Paenibacillus polymyxa: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology**, p. 419-430, 2008. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/41998534>>.

Acesso em: 30/09/2022.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, [S.L.], v. 49, n. 10, p. 2387-2425, maio 2008. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386108001407>>.

Acesso em: 30/09/2022.

RENWICK, M. J; BROGAN, D. M; MOSSIALOS, E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. **The Journal Of Antibiotics**, [S.L.], v. 69, n. 2, p. 73-88, 14 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775540/>>.

Acesso em: 02/10/2022.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

RIGOPOULOS, D.; LARIOS, G.; KATSAMBAS, A. D. The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. **Clinics In Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 24-30, jan. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0738081X09000510?via%3Dihub>>.

Acesso em: 30/09/2022.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

ROA, J. P. B.; MANO, V.; FAUSTINO, P. B.; FELIX, E. B.; SILVA, M. Elisa S. R. e; SOUZA FILHO, J. D.. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxitirato-co-ε-caprolactona) a partir de poli(3-hidroxitirato) e poli(ε-caprolactona). **Polímeros**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 221-226, 1 out. 2010. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<https://www.scielo.br/ij/po/a/XydDRbrc7DykcWkjbXxhFfJ/?lang=pt>>.

Acesso em: 28/01/2023.

RODRIGUES, B. V. M.; ANDRE, R. da S.; MERCANTE, L. A.; CORRÊA, D. S.. Nanofibras Poliméricas Eletrofiadas. **Nanotecnologia Aplicada A Polímeros**. São Paulo: Editora Blucher, 2022. [S.L.], p. 197-232. DOI 10.5151/9786555502527-06

ROOPE, L. S. J.; SMITH, R. D.; POWWELS, K. B.; BUCHANAN, J.; ABEL, L.; EIBICH, P.; BUTLER, C. C.; TAN, P. S.; WALKER, A. S.; ROBOTHAM, J.V.

The challenge of antimicrobial resistance: what economics can contribute. **Science**, [S.L.], v. 364, n. 6435, p. 1-8, 5 abr. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aau4679?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed>. Acesso em: 30/09/2022.

RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 509-523, 29 jun. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro3496>>. Acesso em: 03/10/2022.

SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S.. Introdução à Nanotecnologia. **Nanotecnologia Aplicada A Polímeros**, São Paulo: Editora Blucher, 2022. [S.L.], p. 27-48. <http://dx.doi.org/10.5151/9786555502527-01>.

SANTOS, D. M. dos; CORREA, D. S.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.. Advances in Functional Polymer Nanofibers: from spinning fabrication techniques to recent biomedical applications. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [S.L.], v. 12, n. 41, p. 45673-45701, 16 set. 2020a. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.0c12410#>>. Acesso em: 01/10/2022.

SANTOS, D. M dos.; LEITE, I. S.; BUKZEM, A. L.; SANTOS, R. P. O.; FROLLINI, E.; INADA, N. M.; CAMPANA-FILHO, S. P. Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 186, p. 110-121, abr. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718300638?via%3Dihub>>. Acesso em: 30/09/2022.

SANTOS, D. M.dos; CHAGAS, P. A. M.; LEITE, I. S.; INADA, N. M.; ANNUNZIO, S. R.; FONTANA, C. R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CORREA, D. S. Core-sheath nanostructured chitosan-based nonwovens as a potential drug delivery system for periodontitis treatment. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 142, p. 521-534, jan. 2020b. Elsevier BV. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019343727?via%3Dihub>>. Acesso em: 30/09/2022

SEN, C. K.; GORDILLO, G. M.; ROY, S.; KIRSNER, R.; LAMBERT, L.; HUNT, T. K.; GOTTRUP, F.; GURTNER, G. C.; LONGAKER, M. T. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair And Regeneration**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 763-771, nov. 2009.

Wiley. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>>.

Acesso em: 30/09/2022

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 4, p. 1-13, 2013. Frontiers Media SA. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3594987/>>.

Acesso em :30/09/2022

SERRANO, N. F. G. **Purificação e Caraterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endofítico isolado de *Prunus* spp.** 65 pag. Dissertação de mestrado em biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 13/03/2009.

SERRANO, N. F.G.; FERREIRA, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; TEIXEIRA, J.A.; DUBREUIL, J. D.; SOUSA, C. P. de.. Purification and characterization of two new antimicrobial molecules produced by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 1-13, 2021. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aabc/a/bQ4SYpZdgDKZCJvTjQmfPvm/?lang=en>>.

Acesso em: 30/09/2022.

SIDDAMALLAPPA, N. G.; BASAVARAJU, M.; GOWDA, C. G. D.. Elastin-based polymer: synthesis, characterization and examination of its miscibility characteristics with poly(vinyl alcohol) and electrospinning of the miscible blends. **Polymer International**, [S.L.], v. 67, n. 11, p. 1511-1522, 6 ago. 2018. Wiley. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.5669>>.

Acesso em: 28/01/2023.

SILVA, D. F.; LIMA, K. T.; BASTOS, G. N. T.; OLIVEIRA, J. A. R.; NASCIMENTO, L. A. S. do; COSTA, C. E. F.; R. FILHO, G. N.; CONCHA, V. O. C.; PASSOS, M. F.. PCL/Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aubl.) Hybrid Film for Wound Healing Applications. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1591-1606, 14 maio 2021. MDPI AG. Disponível em < [Polymers | Free Full-Text | PCL/Andiroba Oil \(Carapa guianensis Aubl.\) Hybrid Film for Wound Healing Applications \(mdpi.com\)](https://www.mdpi.com/Polymers/Free-Full-Text/PCL/Andiroba-Oil-Carapa-guianensis-Aubl.-Hybrid-Film-for-Wound-Healing-Applications)>.

Acesso em: 24/01/2023

SCHNEIDER, R.; MERCANTE, L. A.; ANDRE, R. S.; BRANDÃO, H. M.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S.. Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: Antibacterial activity and effect of pH on the release profile. **Reactive And Functional Polymers**, [s.l.], v. 132, p.26-35, nov. 2018. Elsevier BV. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381514818304590>>.

Acesso em: 30/09/2022

SCHNEIDER, Yannik K. Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: strategies for tackling the problem of antibiotic resistance by efficient

bioprospecting. **Antibiotics**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 842, 10 jul. 2021. MDPI AG. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2079-6382/10/7/842>>. Acesso em: 30/09/2022.

TAN, S.; TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881–1955): discoverer of penicillin. **Singapore Medical Journal**, [S.L.], v. 56, n. 07, p. 366-367, jul. 2015. Medknow. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4520913/>>. Acesso em: 30/09/2022.

TEODORO, K. B. R.; SANFELICE, R. C.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Cellulose Whiskers Influence the Morphology and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Composites. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 4876-4883, 1 jul. 2018. American Scientific Publishers. Disponível em: < <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2018/00000018/00000007/art00051?jsessionid=3rp2ws6s0rf59.x-ic-live-02>>. Acesso em: 02/10/2022.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

TEODORO, K. B. R.; SHIMIZU, F. M.; SCAGION, V. P.; CORREA, D. S. Ternary nanocomposites based on cellulose nanowhiskers, silver nanoparticles and electrospun nanofibers: use in an electronic tongue for heavy metal detection. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [S.L.], v. 290, p. 387-395, jul. 2019. Elsevier BV. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400519304915>>. Acesso em: 30/09/2022.

Formatado: Português (Brasil)

TORRES-GINER, S.; PÉREZ-MASIÁ, R.; LAGARON, J. M.. A review on electrospun polymer nanostructures as advanced bioactive platforms. **Polymer Engineering & Science**, [S.L.], v. 56, n. 5, p. 500-527, 27 jan. 2016. Wiley. Disponível em: < <https://4spepublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pen.24274>>. Acesso em: 28/01/2023.

WERDIN F., TENNENHAUS M., SCHALLER H. E., RENNEKAMPFF H. O. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. **Eplasty**. 2009 Jun 4. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2691645/>>. Acesso em: 17/01/2023.

XUE, J.; WU, T.; DAI, Y.; XIA, Y.. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: methods, materials, and applications. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 27 mar. 2019. American Chemical Society (ACS). Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.8b00593>>. Acesso em: 02/10/2022.

YU, G.; SUN, Z.; PENG, J.; ZHU, M.; CHE, Q.; ZHANG, G.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D.. Secondary Metabolites Produced by Combined Culture of *Penicillium crustosum* and a *Xylaria* sp. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 82, n. 7, p.

2013-2017, 2 jul. 2019. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.9b00345>>.

Acesso em: 26/01/2023

Formatado: Português (Brasil)

ZENG, J.; YANG, L.; LIANG, Q.; ZHANG, X.; GUAN, H.; XU, X.; CHEN, X.; JING, X. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 105, n. 1-2, p. 43-51, jun. 2005. Elsevier BV. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365905001227?via%3Dihub>>.

Acesso em:30/09/2022

ZENG, R.; LIN, C.; LIN, Z.; CHEN, H.; LU, W.; LIN, C.; LI, H. Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. **Cell And Tissue Research**, [S.L.], v. 374, n. 2, p. 217-232, 10 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-018-2830-1>>.

Acesso em: 30/09/2022

ZHANG, S.; MERINO, N.; OKAMOTO, A.; GEDALANGA, P. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 833-847, 16 jul. 2018. Wiley. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116752/>>.

Acesso em: 30/09/2022.

ZHOU, K.; QIAO, K.; EDGAR, S.; STEPHANOPOULOS, G. Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products. **Nature Biotechnology**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 377-383, 5 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.3095>>.

Acesso em: 30/09/2022

ZUBAIR, N. A.; RAHMAN, N. A.; LIM, H. N.; ZAWAWI, R. M.; SULAIMAN, Y. Electrochemical properties of PVA-GO/PEDOT nanofibers prepared using electrospinning and electropolymerization techniques. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 6, n. 21, p. 17720-17727, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra21230h>>.

Acesso em: 30/09/2022.