UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CRISIANE APARECIDA MARANGON

Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo: nova alternativa para
o controle de *Staphylococcus* spp.

São Carlos

2019

CRISIANE APARECIDA MARANGON

Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo: nova alternativa para o controle de *Staphylococcus* spp.

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Nitschke

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

M311f Marangon, Crisiane Aparecida
 Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo :
 nova alternativa para o controle de Staphylococcus spp /
 Crisiane Aparecida Marangon ; orientadora Marcia Nitschke ;
 Coorientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. -- São Carlos,
 2019.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
 Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em
 Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
 Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2019.

 1. Quitosana. 2. Ramnolipídeo. 3. Nanopartículas.
 4. Atividade antimicrobiana. I. Plepis, Ana Maria de Guzzi.
 II. Título.

Elaborado por Elena Luzia Palloni – CRB 8/4464

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Crisiane Aparecida Marangon

TÍTULO: " Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo: nova alternativa para o controle de *Sthaphylococcus* spp.."

Data da defesa: 25/11/2019

Comissão Julgadora	Assinatura	Resultado
Prof(a). Dr(a). Marcia Nitschke IQSC/USP		Não votante
Prof(a). Dr(a). Clovis Wesley Oliveira de Souza UFSCar		Aprovada
Prof(a). Dr(a). Laudemir Carlos Varanda IQSC/USP		Aprovada.
Prof(a). Dr(a). Eliana Cristina da Silva Rigo FZEA/USP		aprovada
Prof(a). Dr(a). Hernane da Silva Barud UNIARA		Aprovado
Prof(a). Dr(a). Cristina Paiva de Souza UFSCar		Aprovada

Dedico este trabalho a minha família e ao meu companheiro, Renan Henrique dos Santos, por todo apoio, paciência, orações, carinho e ensinamentos de vida. Em especial aos meus queridos avós, Odete Scherma Custódio e Aparecido Custódio, pelos exemplos de vida e por ser meu alicerce, dedico toda a essência que representa este trabalho a vocês.

Agradecimentos

À Deus e todos os Santos por proteger, reger, fortalecer, guardar e iluminar meu caminho.

À minha família e amigos pelo incentivo, exemplos de vida, alicerce, paciência, orações, carinho e apoio em todos os momentos e de todas as formas.

Ao meu namorado Renan Henrique dos Santos pelo apoio, paciência, carinho, encorajamento nos momentos de dificuldade e dúvidas e companheirismo.

À Profa. Me. Gracie Luiza da Silva pelo prazer e honra da amizade da professora que me inspirou a escolher a microbiologia para atuar profissionalmente.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Nitschke, exemplo de competência, postura e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, acolhimento, conhecimento científico compartilhado, amizade, orientação, compreensão e incentivo durante toda a trajetória deste trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, exemplo de profissional, postura e dedicação, meu profundo respeito e admiração à pessoa que me recebeu de portas abertas e ofereceu a primeira oportunidade em trilhar o caminho acadêmico. Obrigada pela confiança, estímulo, paciência, compreensão e ensinamentos, principalmente em como ser uma pessoa ética e justa através do seu próprio exemplo.

À Dra. Virginia Conceição Amaro Martins pela amizade, ajuda, preciosas sugestões, críticas, discussões científicas, ensinamentos profissionais e pessoais, apoio, carinho, paciência e compreensão. É um prazer e uma honra contar com a amizade de uma pesquisadora tão humana e de caráter, exemplo de profissional e de vida que transcende a fronteira da generosidade e amabilidade. Obrigada pela credibilidade e disposição em ensinar-me pacientemente em todas as dúvidas e questionamentos do universo químico. Irei admirá-la por toda a minha trajetória pessoal e profissional.

À Me. Marília Cardoso Milanetto por toda amizade e momentos passados juntos. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e pessoais, sempre acompanhados de paciência, carinho e singela doçura, qualidades que a definem como pessoa.

À minha supervisora Profa. Dra. Rikke Louise Meyer do Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO) e Department of Bioscience da Aarhus University, Aarhus, Dinamarca pela oportunidade e portas abertas do seu grupo de pesquisa e laboratórios. Obrigada por todo o conhecimento transmitido a mim, confiança, prontidão no

direcionamento do trabalho, discussões científicas e amizade. Também agradeço o apoio da técnica Rita Rosendal e ao grupo de pesquisa da Profa. Meyer - *Biofilm group*. Obrigada “*biofilmers*” pelo acolhimento, compartilhamento de protocolos e ideias, discussões científicas e amizade. Sou muito grata aos ensinamentos profissionais e de vida que os seis meses de doutorado sanduíche na Dinamarca me proporcionaram e serão sempre recordados.

O desenvolvimento de um trabalho interdisciplinar requer colaborações com profissionais de diversas áreas do conhecimento. Felizmente, pude contar com o apoio dos amigos de pós-graduação e funcionários do IQSC – USP. Obrigada por proverem experiências memoráveis e prazerosas ao trabalhar com tantos profissionais talentosos. Em especial, ao Grupo de Biopolímeros e Biomateriais e ao Grupo de Biotecnologia Microbiana pelas sugestões, críticas, discussões científicas, apoio nos experimentos, compartilhamento de aprendizagem, suporte técnico, amizade, bom humor, cafés, excelente convívio e momentos de alegria contagiante que tornaram a atmosfera de trabalho mais prazerosa.

À CAQI do IQSC - USP, em especial ao auxílio do técnico de laboratório Aldimar T. J. Constante pelas análises de FTIR.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e a aluna Cristiane Casonato Melo, do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC - USP, pelos ensaios de caracterização das nanopartículas, pela atenção e competência nos experimentos realizados.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho e a aluna Ma Hui Ling, do Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações do Departamento de Química e Física Molecular do IQSC - USP, pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade.

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Souza, do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar e ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda, do Departamento de Físico-Química do IQSC – USP pela valiosa contribuição no exame de qualificação do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 que proporcionou todo apoio financeiro que esta pesquisa exigiu.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC – USP.

A todos que contribuíram de algum modo para o sucesso desta longa jornada. Sem esse apoio, este projeto não apresentaria partes essenciais.

“When a scientist doesn’t know the answer to a problem, he is ignorant. When he has a hunch as to what the result is, he is uncertain. And when he is pretty darn sure of what the result is going to be, he is still in some doubt. We have found it of paramount importance that in order to progress we must recognize our ignorance and leave room for doubt. Scientific knowledge is a body of statements of varying degrees of certainty – some most unsure, some nearly sure, but none absolutely certain”.

(Richard Feynmann)

RESUMO

MARANGON, C. A. **Formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo: nova alternativa para o controle de *Staphylococcus* spp.** 2019. 121 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Os nanomateriais com atividade antimicrobiana têm sido descritos como alternativa efetiva e inovadora devido às suas propriedades físico-químicas únicas. Nesse sentido, o desenvolvimento de nanopartículas compostas por moléculas sustentáveis como os biopolímeros e biosurfatantes vêm despertando o interesse, uma vez que, são obtidas sem a necessidade de síntese química complexa, apresentam baixo custo e uma menor agressão ao meio ambiente. Entre esses compostos estão a quitosana e o ramnolipídeo. O presente estudo teve como objetivo desenvolver nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo e avaliar a atividade antimicrobiana das moléculas individualmente e combinadas. A presença de ramnolipídeo na formação das nanopartículas de quitosana resultou em partículas menores, com tamanho médio de $287,8 \pm 6,2$ nm, mais monodispersas, com índice de polidispersividade de $0,18 \pm 0,02$, estáveis com pontecial zeta mais positivo ($+60,9 \pm 1,6$ mV), sugerindo que a presença de grupos amino livres na estrutura da quitosana é predominante na superfície das nanopartículas. As nanopartículas também apresentaram atividade antimicrobiana superior comparadas ao ramnolipídeo e quitosana frente a *Staphylococcus* spp., tanto na forma planctônica como séssil. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das nanopartículas frente a *S. aureus* DSM 1104 foram de $14/19 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $29/37 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores de CIM e CBM para *S. aureus* ATCC 29213 foram de $29/37 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $58/75 \mu\text{g mL}^{-1}$. As nanopartículas apresentaram uma CIM e CBM de $7/9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $14/19 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *S. epidermidis*, respectivamente. A principal hipótese é que o efeito antimicrobiano ocorra através de interações eletrostáticas entre as nanopartículas carregadas positivamente e moléculas carregadas negativamente presentes na superfície celular bacteriana, aumentando a concentração local de quitosana e ramnolipídeo e facilitando a liberação de ambos os compostos nas células alvos. Entretanto, esse efeito não ocorreu em bactérias Gram-negativas provavelmente devido à resistência oferecida pela membrana externa à compostos anfifílicos como o ramnolipídeo. A quitosana e as nanopartículas de quitosana erradicaram as células presentes na superfície dos biofilmes, enquanto as nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo foram capazes de eliminar a maior parte da população presente nos biofilmes reduzindo o número de células viáveis abaixo do limite de detecção nas concentrações de $58/75 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as linhagens de *S. aureus* DSM 1104 e *S. epidermidis*. Portanto, a combinação de ramnolipídeo com a quitosana oferece uma estratégia promissora no desenvolvimento de nanopartículas com baixa citotoxicidade que podem ser exploradas para aplicações futuras na indústria farmacêutica e indústria alimentícia.

Palavras-chave: Quitosana. Ramnolipídeo. Nanopartículas. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

MARANGON, C. A. **Chitosan/rhamnolipid nanoparticles formulation:** a new alternative for *Staphylococcus* spp. control. 2019. 121 f. Tese (Doutorado) – Interunits Graduate Program in Bioengineering at São Carlos School of Engineering – Ribeirão Preto Medical School and São Carlos Institute of Chemistry of University of São Paulo, São Carlos, 2019.

Nanomaterials have emerged as antimicrobial agents due to their unique physical and chemical properties. The development of nanoparticles composed of sustainable molecules such as biopolymers and biosurfactants have been awakening interest, as they can be obtained without the use of complex chemical synthesis and toxic materials. Among the compounds are chitosan and rhamnolipids. In this study, the development of chitosan/rhamnolipid nanoparticles and their antimicrobial activity were evaluated. Addition of rhamnolipid in the synthesis of chitosan nanoparticles led to smaller average size of 287.8 ± 6.2 nm and more monodispersed particles with polydispersity index of 0.18 ± 0.02 and a more positive surface charged ($+60.9 \pm 1.6$ mV) with improved stability, suggesting that the presence of free amino groups of the chitosan structure is predominant on the surface of these nanoparticles. The positive particles charge interacted strongly with negative bacterial cells, and their antimicrobial effect against *Staphylococcus* spp. surpassed that of either rhamnolipid or chitosan alone, both against planktonic bacteria and biofilms. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of chitosan/rhamnolipid nanoparticles against *S. aureus* DSM 1104 were $14/19 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $29/37 \mu\text{g mL}^{-1}$. MIC and MBC values for *S. aureus* ATCC 29213 were $29/37 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $58/75 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nanoparticles showed a MIC and MBC of $7/9 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $14/19 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. epidermidis*. The hypothesis is that improved antibacterial efficacy is linked to the increased local delivery of chitosan and rhamnolipid at the cell surface to their targets in Gram-positive bacteria. However, Gram-negative bacteria showed resistance probably due to protective effect of outer membrane to the amphiphilic rhamnolipid. Chitosan and chitosan nanoparticles only kill bacteria in the upper parts of biofilms, while chitosan/rhamnolipid particles were more effective eradicating most sessile bacteria and reducing the number of viable cells below the detection limit, when chitosan/rhamnolipid nanoparticles concentration of $58/75 \mu\text{g mL}^{-1}$ was applied for both *S. aureus* DSM 1104 and *S. epidermidis* strains. The combination of chitosan and rhamnolipid offer a promising strategy to design functionalized nanoparticles with low cytotoxicity, which can be explored in pharmaceutical and food industries.

Keywords: Chitosan. Rhamnolipid. Nanoparticles. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aspecto morfológico das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (a), <i>S. epidermidis</i> (b) e <i>Klebsiella</i> spp. (c).....	29
Figura 2 – Representação do ciclo de formação do biofilme, sendo: células livres (1), adesão inicial (2), divisão celular e aumento da população (3), biofilme maduro (4). A etapa de dispersão não está representada no esquema.	34
Figura 3 – Estrutura da quitosana obtida a partir da desacetilação parcial da quitina.....	43
Figura 4 – Exemplos de estrutura dos ramnolipídeo: Mono-ramnolipídeo (a) e Di-ramnolipídeo (b).....	45
Figura 5 – Esquema das possíveis estratégias antibiofilme utilizando nanopartículas obtidas pela combinação quitosana/ramnolipídeo.	47
Figura 6 - Esquema representativo do procedimento experimental para os testes de atividade antimicrobiana.	59
Figura 7 – Esquema representativo do procedimento experimental de formação e quantificação do biofilme.	62
Figura 8 – Esquema representativo do procedimento experimental da determinação da concentração inibitória mínima e concentração de erradicação mínima do biofilme.	63
Figura 9 – Fotografia digital de 200 mg de quitosana (a) e de quitosana despolimerizada (b).	67
Figura 10 – Curvas de titulação condutimétrica da quitosana (a) e quitosana despolimerizada (b).	68
Figura 11 - Espectro de RMN ¹ H para (—) quitosana e (—) quitosana despolimerizada (a); Monômero da quitosana com destaque para a numeração dos H detectados por RMN ¹ H (b).	69
Figura 12 – Curva de viscosidade reduzida versus concentração das amostras de quitosana (a) e quitosana despolimerizada (b) da primeira determinação.	70
Figura 13 – Diâmetro hidrodinâmico das NPs-Q/RL (a) e pontencial zeta (b) nos diferentes solventes testados como meio de ressuspensão.	72
Figura 14 – Fotografia digital das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (a) e efeito Tyndall na amostra em meio aquoso (b).	73
Figura 15 – Efeito do pH no diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q e no diâmetro hidrodinâmico (c) e pontencial zeta (d) das NPs-Q/RL. Dados coletados por DLS.	76
Figura 16 – Efeito do pH no diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q/RL utilizando tampão HAc/NaAc pH 5,0 como solvente de escolha. Dados coletados por DLS.	77
Figura 17 – Diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q/RL em função do tempo de armazenamento a 4 °C. Dados coletados por DLS.	78
Figura 18 – Imagens de topografia por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) depositadas em substrato de mica (a-b).....	79
Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão das micelas de nanopartículas de ramnolipídeo (NPs-RL) (a) e nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) (b).	80
Figura 20 – Espectro no infravermelho para: (—) Q, (—) RL e (—) NPs-Q/RL.	81
Figura 21 – Curva de padronização da ramnose para as nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo.	82

Figura 22 – Curva de padronização do ramnolipídeo para determinação do fator de conversão ($R = 0,9996$).....	83
Figura 23 – Curva de padronização da quitosana despolimerizada para as nanopartículas de quitosana e quitosana/ramnolipídeo.	84
Figura 24 – Porcentagem de ramnolipídeo liberada das NPs-Q/RL em tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,5.	85
Figura 25 – Esquema representativo da formação das NPs-Q e NPs-Q/RL.	86
Figura 26 – Imagem conceitual da interação das NPs-Q/RL com a superfície celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As interações eletrostáticas promovem a ligação das partículas e liberação local de ramnolipídeo. As bactérias Gram-negativas permanecem protegidas contra o ramnolipídeo por sua membrana externa, mas as bactérias Gram-positivas apresentam estruturas celulares alvo para a interação com a quitosana e consequente liberação do biosurfatante.	91
Figura 27 – Imagens de CLSM da interação da solução de quitosana $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a), NPs-Q $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b), Nps-RL $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) e NPs-Q/RL $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$; a escala de cinza no canto inferior direito indica a fluorescência média de intensidade do vermelho do Nilo de células tratadas com as NPs-RL e com as NPs-Q/RL (116 ± 22 e 229 ± 23 , respectivamente) (d) com as células planctônicas de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 por 4 h a 37°C . A quitosana foi corada com Calcofluor (verde) e o ramnolipídeo com vermelho do Nilo (vermelho).	93
Figura 28 – Aglomeração de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em função da DO_{600} : sem tratamento (●) e tratados com $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosana (●), $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-RL (●), $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q (●) e $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q/RL (●).	94
Figura 29 – Fotografia digital do estudo preliminar de formação e quantificação da biomassa celular dos biofilmes de <i>S. aureus</i> DSM 1104 (a), <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (b) e <i>K. oxytoca</i> (c) após 48 h a 37°C em microplacas com tampas adaptadas (peg-lids).	96
Figura 30 – Quantificação das células viáveis dos biofilmes de <i>S. aureus</i> DSM 1104 (a), <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (b), <i>S. epidermidis</i> DSM 20044 (c) e <i>K. oxytoca</i> DSM 5175 (d) após 24 h de exposição aos compostos. Os dados são apresentados como a média $\pm$ s.d. de três experimentos independentes. * indica a diferença significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, $n = 3$).....	97
Figura 31 – Ilustração da interação das NPs-Q/RL com o biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp..	100
Figura 32 – Imagens 2D CLSM (a-d) da camada inferior das células nos biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 29213, mostrando células viáveis coradas com SYTO60 (vermelho) e células mortas coradas com TOTO-1 (verde): biofilmes não tratados (a) ou tratados por 24 h com $116 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosana (b), $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-RL (c) e $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q/RL (d). Visualização 3D dos biofilmes tratados com NPs-Q (e) e com NPs-Q/RL (f) mostram que as NPs-Q mataram apenas as bactérias no topo do biofilme, enquanto as NPs-Q/RL foram eficazes em todo o biofilme.....	101
Figura 33 - Viabilidade celular de células HUVEC (%) após o tratamento com quitosana (a), NPs-RL (b) e NPs-Q/RL (c). * indica diferença significativa em relação ao controle sem tratamento (ANOVA, $p < 0.05$, $n=3$).	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros sumarizados para a obtenção das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo.	72
Tabela 2 – Diâmetro hidrodinâmico e PDI das NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL analisadas por DLS.....	74
Tabela 3 – Atividade antimicrobiana da solução de quitosana despolimerizada (Q), nanopartículas de ramnolipídeo (NPs-RL), nanopartículas de quitosana (NPs-Q) e nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) contra bactérias patogênicas.	88
Tabela 4 – Quantificação da biomassa celular das diferentes linhagens após 48 h de incubação a 37 °C.....	95
Tabela 5 – Valores de CIBM da quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL após 24 h de tratamento a 37 °C.	97
Tabela 6 – Valores de CEBM da quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL após 24 h de tratamento a 37 °C. Dados coletados após 72 h de incubação da microplaca de recuperação a 37 °C	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorância
AFM – Microscopia de força atômica
AI – Moléculas auto-indutoras
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
CAUTI – Infecção do trato urinário associada a cateter
CBM – Concentração bactericida mínima
CDC – Centers for Disease Control and Prevention
CEBM – Concentração de erradicação mínima do biofilme
CIBM – Concentração inibitória mínima do biofilme
c-di-GMP – Nucleotídeo diguanilato monofosfato cíclico
CIM – Concentração inibitória mínima
CLASBI – Infecção primária da corrente sanguínea
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM – Microscopia confocal de varredura a laser
CMC – Concentração micelar crítica
CONs – Coagulase negativo
DLS – Espalhamento dinâmico de luz
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNase – Desoxirribonuclease
DO – Densidade óptica
DSMZ – Deutch Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
eDNA – Ácido desoxirribonucleico extracelular
EDTA – Ácido etileno diamino tetracético
EUA – Estados Unidos da América
FDA – Food and Drug Administration
FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho
GA – Grau de acetilação
HAc – Ácido acético
HSL – Sistemas acil-homoserina
HUVEC – Células endoteliais de veia umbilical humana
IRAS – Infecções relacionadas à assistência à saúde
ISO – International Organization for Standardization
LPS – Lipopolissacarídeo
MHA – Ágar Müeller Hinton

MHB – Caldo Mueller Hinton

MPE – Matriz polimérica extracelular

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

NAMs – Nano-antimicrobianos

NPs – Nanopartículas

NPs-Q – Nanopartículas de quitosana

NPs-Q/RL – Nanopartículas de quitosana/ramanolipídeo

NPs-RL – Nanopartículas de ramnolipídeo

OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato-salino

p-DAB – *p*-dimetilaminobenzaldeído

PDI – Índice de polidispersividade

Q – Quitosana

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

SCENIHR – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks

spp. – Espécies

SSI – Infecção sítio cirúrgica

sRNAs – Pequenos ácidos ribonucleicos

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

TPP – Tripolifosfato de sódio

TSA – Ágar triptona de soja

TSB – Caldo triptona de soja

UFC – Unidade formadora de colônias

UTI – Unidade de terapia intensiva

VAP – Pneumonia associada à ventilação mecânica

VBNC – Microrganismos viáveis, mas não cultiváveis

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2 OBJETIVOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Infecções nosocomiais	25
3.1.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde - IRAS	26
3.1.2 Patógenos nosocomiais	28
3.2 Biofilmes.....	33
3.2.1 Resistência dos biofilmes aos antimicrobianos	36
3.2.2 Estratégias na contenção dos biofilmes.....	38
3.3 Nanomateriais com atividade antimicrobiana.....	40
3.3.1 Sistemas de liberação controlada	41
3.3.2 Nanomateriais com propriedades antimicrobianas inerentes	42
3.3.2.1 Quitosana	43
3.3.2.2 Ramnolipídeo.....	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 Materiais	49
4.2 Obtenção da quitosana	49
4.3 Despolimerização da quitosana.....	49
4.4 Caracterização da quitosana.....	50
4.4.1 Determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica	50
4.4.2 Determinação do grau médio de acetilação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	50
4.4.3 Determinação da massa molar média por viscosimetria	51
4.5 Preparo das nanopartículas	52
4.6 Caracterização das nanopartículas	53
4.6.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).....	53
4.6.2 Análise do potencial Zeta.....	54
4.6.3 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	54
4.6.4 Testes de estabilidade das nanopartículas	54
4.6.4.1 Tamanho e potencial zeta em função do pH.....	54
4.6.4.2 Tamanho e potencial zeta em função do tempo	54
4.6.5 Análise por microscopia de força atômica (AFM).....	54
4.6.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	55
4.6.7 Quantificação do ramnolipídeo nas nanopartículas	55
4.6.8 Quantificação da quitosana nas nanopartículas.....	55
4.6.9 Curva de liberação <i>in vitro</i>	56

4.7 Atividade antimicrobiana.....	56
4.7.1 Linhagens bacterianas	56
4.7.2 Padronização do inóculo	57
4.7.3 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	57
4.7.3.1 Preparo das soluções estoque	58
4.7.3.2 Determinação da CIM	58
4.7.3.3 Determinação da CBM	59
4.7.3.4 Interação nanopartícula-bactéria.....	60
4.7.3.5 Ensaio de aglomeração celular	60
4.7.4 Ensaio de atividade antibiofilme	61
4.7.4.1 Formação e quantificação dos biofilmes	61
4.7.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIBM) e da concentração de erradicação mínima do biofilme (CEBM)	62
4.7.4.3 Visualização das células viáveis no biofilme	63
4.8 Ensaio de citotoxicidade	64
4.8.1 Determinação da viabilidade e concentração celular	65
4.8.2 Preparo das amostras.....	65
4.8.3 Ensaio de citotoxicidade celular.....	65
4.9 Análise estatística.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1 Obtenção da quitosana	67
5.2 Despolimerização da quitosana.....	67
5.3 Caracterização da quitosana.....	68
5.3.1 Determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica	68
5.3.2 Determinação do grau médio de acetilação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	69
5.3.3 Determinação da massa molar média por viscosimetria	70
5.4 Preparo das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo	71
5.5 Caracterização das nanopartículas	73
5.5.1 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	73
5.5.2 Análise do potencial zeta.....	75
5.5.3 Testes de estabilidade.....	76
5.5.3.1 Tamanho e potencial zeta em função do pH.....	76
5.5.3.2 Distribuição de tamanho médio e potencial zeta em função do tempo	78
5.5.4 Análise por microscopia de força atômica (AFM).....	79
5.5.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	80
5.5.6 Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	80
5.5.7 Quantificação do ramnolipídeo nas nanopartículas	81

5.5.8 Quantificação da quitosana nas nanopartículas.....	83
5.5.9 Curva de liberação <i>in vitro</i>	84
5.6 Atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo.....	87
5.6.1 Interação nanopartícula-bactéria	92
5.6.2 Ensaio de aglomeração celular	93
5.7 Ensaio de atividade antibiofilme.....	94
5.7.1 Formação e quantificação dos biofilmes	94
5.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIBM) e da concentração de erradicação mínima do biofilme (CEBM)	96
5.7.3 Visualização das células viáveis no biofilme	100
5.8 Ensaio de citotoxicidade	101
6 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107
Apêndice A.....	119
Apêndice B	121

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tratamento de doenças infecciosas representa um desafio mundial devido à rápida taxa de evolução das bactérias que se tornam resistentes aos antimicrobianos, resultando em incremento das dosagens terapêuticas e de custos hospitalares, toxicidade e aumento da morbidade e mortalidade (HOWARD; HOPWOOD; DAVIES, 2014; HUH; KWON, 2011). O número de infecções causadas por bactérias resistentes tem invalidado a maioria dos antibióticos de amplo espectro disponíveis. Um estudo recente reportou que até 2050, a progressão da resistência antimicrobiana poderá causar até 10 milhões de mortes por ano, reconhecendo-se um retrocesso ao que foi vivenciado na era pré-antibiótico (BAKER, 2015; O'NEILL, 2016).

Essa resistência constitui um problema de saúde pública, principalmente, no ambiente hospitalar. Staphylococcaceae e Enterobacteriaceae estão entre as famílias de microrganismos que mais causam infecções invasivas, seja infecções hospitalares ou adquiridas na comunidade. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella oxytoca* destacam-se como patógenos oportunistas em infecções nosocomiais (HUSSAIN et al., 2018; LEE et al., 2018; PÉREZ-VAZQUEZ et al., 2019). Infecções cutâneas, respiratórias e geniturinárias, além do aumento do uso de dispositivos médicos, como cateteres e próteses, facilitam o acesso dessas bactérias no hospedeiro (LEE et al., 2018; PATSILINAKOS et al., 2019). Esse problema agrava-se ainda mais quando as células livres formam biofilmes.

Os biofilmes são agregados de uma ou mais espécies microbianas que se formam por aderência de células livres a superfícies e/ou interfaces sólido-líquido abióticas ou bióticas compondo uma complexa comunidade microbiana envolta na matriz polimérica extracelular (MPE) (COSTERTON, 1995). Dentro da comunidade microbiana de um biofilme as bactérias são mais tolerantes a substâncias antimicrobianas e outros agentes estressantes, como a desidratação e ao sistema imune. Isso se deve a taxa de crescimento mais lenta; menor alcance dessas substâncias devido à proteção da MPE e a comunicação célula-célula, o que permite diferentes padrões de expressão gênica e facilita a transmissão de fatores de virulência como genes de resistência por conjugação, por exemplo (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016). Esse tipo de organização representa um desafio no tratamento de infecções sendo responsáveis por mais de 80% das infecções microbianas em humanos e 60% das infecções hospitalares relacionadas a dispositivos médicos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HUH; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Os agentes antimicrobianos têm como alvo principal as células planctônicas, deixando uma grande lacuna no combate de células sésseis (HUH; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016). A maioria dos antibióticos atua sobre células metabolicamente ativas e, as células no biofilme, principalmente nas regiões mais afastadas da superfície, encontram-se em estado dormente devido à privação nutricional e ausência de catabolismo ou anabolismo. As bactérias na periferia do biofilme são as mais metabolicamente ativas e mais susceptíveis aos antimicrobianos, enquanto os organismos localizados em regiões mais profundas da microcolônia persistem e formam núcleos para se restabelecer. Adicionalmente, a própria fisiologia do biofilme, como a matriz e a expressão de fatores de proteção específicos, como as bombas de efluxo e os *regulons* de resposta ao estresse, diminuem a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células no biofilme, fazendo com que o antibiótico alcance uma concentração subletal (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Outro aspecto importante é o custo no desenvolvimento de um novo agente antimicrobiano, o que não incentiva a indústria farmacêutica da mesma forma que fármacos de uso contínuo em condições crônicas como os reguladores do colesterol e os anti-hipertensivos (HOWARD; HOPWOOD; DAVIES, 2014). Portanto, estudos alternativos são necessários para o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas que possam ser utilizadas no controle de infecções bacterianas e biofilmes, apresentando como alvo as estruturas e não os processos celulares.

Recentemente, os materiais na escala nanométrica têm emergido como estratégia promissora e inovadora na contenção de infecções bacterianas. As vantagens oferecidas por esses sistemas em relação aos convencionais devem-se às suas propriedades físico-químicas únicas como: maior área de superfície em relação ao volume o que facilita o contato celular, liberação em resposta a determinados estímulos podendo ser utilizadas para aplicação sítio-específico, maior biodisponibilidade e meia-vida, solubilidade superior aos materiais na escala micrométrica, maior difusividade, menor citotoxicidade, entre outras (GONTSARIK et al., 2019; HEMEG et al., 2017; HUSSAIN et al., 2018; HUH; KWON, 2011; PARANI et al., 2016). Devido à melhor interação e aumento da adsorção, as nanopartículas (NPs) são, frequentemente, antimicrobianos mais potentes em comparação com materiais na escala micrométrica (HEMEG et al., 2017; HUSSAIN et al., 2018; HUH; KWON, 2011; LI et al., 2019; MEKKAWY et al., 2017).

Uma das abordagens propostas no desenvolvimento de nanomateriais para ultrapassar as barreiras da resistência bacteriana e a tolerância antimicrobiana associada aos

biofilmes está em associar mais de um agente antimicrobiano na mesma nanopartícula (HUH; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016). Nesta estratégia, dois ou mais agentes antimicrobianos conhecidos são empregados com intuito de se obter um efeito aditivo ou sinérgico visando a interferência simultânea em diferentes alvos celulares (HUH; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016). Nesse sentido, a formulação de um nanomaterial através da combinação dos antimicrobianos quitosana e ramnolipídeo, que são considerados materiais multi-propósito e atuam no envelope celular através de diferentes mecanismos, pode ser promissora na prevenção de infecções hospitalares.

A quitosana é um copolímero obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, um polissacarídeo estrutural proveniente de diferentes fontes como insetos, crustáceos, moluscos e micélio fúngico (GAVHANE; GURAV; YADAV, 2013). A quitosana é um material versátil que vem despertando interesse nos mais diversos campos da ciência, pois apresenta uma gama de propriedades biológicas (antioxidante, antiinflamatória, anticoagulante, antitumoral), dentre as quais destaca-se a atividade antimicrobiana (MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017; MARANGON et al., 2017; SAHARIAH; MÁSSON, 2017). As nanopartículas de quitosana, assim como a quitosana em escala micrométrica, são biocompatíveis, atóxicas, biodegradáveis e apresentam propriedades mecânicas e químicas que as tornam adequadas na incorporação de moléculas bioativas (DIVYA et al., 2017; KRAVANJA et al., 2019; MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017; SOTELO-BOYÁS et al., 2017). Devido à sua interação e desestabilização da parede celular bacteriana, as nanopartículas de quitosana são veículos em potencial para liberação de outros compostos antimicrobianos que apresentam dificuldades em alcançar seu alvo celular devido à baixa solubilidade ou baixa permeabilidade através do peptidoglicano ou membrana externa de bactérias Gram-negativas. Consequentemente, nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo podem aumentar a eficácia do ramnolipídeo.

O ramnolipídeo é um surfatante natural da classe dos glicolipídeos, produzido principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Esse biosurfatante apresenta propriedades como baixa toxicidade e biodegradabilidade, ampliando a vertente de aplicações em relação aos surfatantes sintéticos por serem compatíveis com o meio ambiente e sua produção ser sustentável, seguindo os princípios da química verde (SINGH, P. et al., 2017). Adicionalmente, os ramnolipídeos têm demonstrado atividade antimicrobiana, antiadesiva e antibiofilme (KIM et al., 2015; SILVA et al., 2017. SHAO et al., 2017) e podem ser incorporados na formulação de nanopartículas estáveis (BAI; MCCLEMENTS, 2016; MÜLLER et al., 2017). A presença do ramnolipídeo nas nanopartículas pode levar ao

rompimento e/ou remoção da matriz extracelular do biofilme aumentando a atividade antimicrobiana da quitosana.

Assim, uma nanopartícula que combine quitosana e ramnolipídeo pode garantir uma estreita interação com a célula bacteriana e, assegurar maior liberação e captação dos antimicrobianos, explorando a sinergia entre os materiais e as mudanças em suas propriedades que são ocasionadas pela redução do tamanho e modulação de suas cargas, refletindo na sua aplicabilidade. As nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo, portanto, podem aumentar a eficácia do controle microbiano, favorecer a erradicação dos biofilmes e oferecer uma estratégia promissora na concepção de nanopartículas atóxicas que podem ser exploradas pela indústria farmacêutica.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal desenvolver nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo e avaliar sua atividade biológica na inibição de alguns patógenos de interesse clínico.

Objetivos específicos:

- Obter e caracterizar nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados e das nanopartículas;
- Estudar o efeito antimicrobiano das nanopartículas frente as células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Klebsiella oxytoca*;
- Propor o possível mecanismo de ação das nanopartículas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Infecções nosocomiais

Segundo Garner et al. (1988), o *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC define como infecções nosocomiais aquelas desenvolvidas no ambiente hospitalar durante o tratamento de outras enfermidades ou aquelas adquiridas por práticas inadequadas dos profissionais de saúde enquanto desenvolvem suas atividades nas dependências hospitalares. As infecções manifestam-se dentro de 48 h ou mais após a hospitalização ou no prazo de 30 dias após ter recebido assistência médica. Estão diretamente relacionadas com a interação epidemiológica entre o agente causador, o ambiente e os fatores de risco do hospedeiro como idade, principalmente crianças e idosos, portadores de diabetes, pacientes com o sistema imunológico deprimido, que usaram antibióticos por prazo longo, ou foram submetidos a procedimentos invasivos como cirurgias, colocação de sondas ou de cateteres, intubação, entre outros. Essas infecções podem ser classificadas em endógena e exógena (CDC, 2014; HAQUE et al., 2018). A infecção endógena ocorre quando as bactérias que compõem a microbiota invadem o tecido do hospedeiro e tornam-se causadoras de infecções oportunistas, como em infecções de pele, feridas cirúrgicas ou diabéticas e queimados. Já as infecções exógenas são decorrentes do uso de dispositivos médicos, como cateteres urinários e intravasculares, a intubação traqueal e a ventilação mecânica, e devido à má higienização por parte dos profissionais de saúde (mãos, luvas) e/ou do ambiente, representando 25,6% das infecções hospitalares nos EUA (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018). De acordo com a Organização Pan-americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 2018), 70% dos profissionais de saúde e 50% das equipes cirúrgicas pelo mundo não praticam rotineiramente a higienização das mãos. Recentemente, Shek et al. (2018) reportaram que a maioria das cortinas das unidades de queimados e materiais descartáveis de um hospital no Canadá estavam contaminadas com *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) após 14 dias penduradas, ressaltando a importância de trocas frequentes e limpeza adequada.

Dados do CDC mostraram que, em 2015, 687000 dos pacientes hospitalizados adquiriram infecções associadas à assistência médica e que 72000 destes pacientes morreram, afetando aproximadamente um em cada 31 pacientes hospitalizados. Essas infecções são consideradas as complicações mais comuns relacionadas aos cuidados hospitalares e uma das dez principais causas de morte nos EUA (CDC, 2018). Em outro estudo reportado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) demonstrou-se que a cada 100 pacientes

hospitalizados, sete em países desenvolvidos e dez em países emergentes adquirem infecções nosocomiais. A prevalência dessas infecções é maior em ambientes onde a condição clínica do paciente é desfavorável como nas unidades de terapia intensiva (UTIs), centros cirúrgicos, neonatais, entre outros. Entre as infecções que mais ocorreram, estão as relacionadas a procedimentos cirúrgicos, infecções do trato urinário e infecções do trato respiratório inferior (WHO, 2002).

No Brasil, os dados, geralmente, são subnotificados, contudo, estima-se que a taxa de infecções hospitalares atinja 14% das internações, de acordo com o Brasil (2019). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) observou que as mais altas taxas de infecções em unidades de terapia intensiva em adultos ocorreram devido à pneumonia associada à ventilação mecânica, enquanto em UTI neonatal esses dados foram mais prevalentes para infecção primária da corrente sanguínea laboratorialmente confirmada. Em pacientes pediátricos não ocorreram diferenças significativas entre os tipos de infecções (ANVISA, 2017).

À medida que a qualidade e expectativa de vida da população aumentam, doenças crônicas como câncer, diabetes, enfermidades cardiovasculares, falência de órgãos prevalecem conjuntamente com o uso de dispositivos médicos (WHO, 2011). Com base nas estimativas do *Food and Drug Administration* (FDA, 2018), mais de 500000 tipos de dispositivos médicos estão disponíveis no mercado global. Dispositivos médicos invasivos, incluindo dispositivos internos e implantáveis, representam apenas uma fração deste número. No entanto, o número de dispositivos, como desvios cérebro-espinhais e cateteres urinário e vascular, utilizados anualmente é da ordem de bilhões (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; EAVES; NAHAI, 2011; FELDMAN et al., 2008). Mais de um milhão de dispositivos eletrônicos cardiovasculares são implantados e 10 milhões de implantes dentários são realizados por ano (MCINTYRE; HEALEY, 2017). Somente nos EUA, anualmente, os procedimentos ortopédicos superam um milhão. Atualmente, de 5 a 10 milhões de mulheres têm implantes de mama artificial (EAVES; NAHAI, 2011). Esses dados aumentam substancialmente o risco de contaminação cruzada no ambiente hospitalar.

3.1.1 Infecções relacionadas à assistência à saúde - IRAS

As infecções do trato urinário (CAUTI) estão entre o tipo mais comum representando 40% das infecções nosocomiais, principalmente associadas à infecção endógena quando a microbiota do paciente juntamente com o uso de cateteres que servem como canal para a entrada de bactérias, enquanto a drenagem imperfeita do cateter retém

volume de urina na bexiga, proporcionando estabilidade à residência bacteriana. Essas infecções podem evoluir para complicações como orquite, epididimite e prostatite no sexo masculino, e pielonefrite, cistite e meningite em todos os pacientes. Embora as CAUTIs sejam tipicamente benignas, alguns pacientes assintomáticos mostraram taxa de mortalidade três vezes mais alta do que pacientes não bacteriúricos. Os fatores de risco incluem prolongação do uso do cateter, sexo feminino, idosos, diabetes mellitus, falta de antibióticos sistêmicos, inserção do cateter fora da sala de cirurgia e violação do sistema de drenagem do cateter. Estima-se que a ocorrência de CAUTIs seja de 5% por dia, independentemente da duração do cateter de permanência, sendo *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* os principais agentes infectantes, seguidos por *Enterococcus* e *Pseudomonas* spp., embora vários microrganismos tenham incidência, incluindo fungos. A administração frequente e inadequada dos antimicrobianos leva a maior resistência bacteriana, além desse tipo de infecção normalmente levar à formação de biofilmes na superfície do cateter. Embora a morbidade das CAUTIs relacionadas ao uso de cateter em curto prazo seja limitada, se os cateteres forem apropriadamente inseridos e higienizados, em pacientes que fazem uso prolongado a frequência de infecções é de 1 a cada 100 pacientes por dia podendo chegar a 1000 cateteres por dia (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2018; HAQUE et al., 2018; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

As infecções sítio cirúrgicas (SSI) ou feridas cirúrgicas acometem de 2% a 36% dos pacientes submetidos à cirurgia, sendo os tipos de cirurgia de maior risco a ortopédica que requerem, frequentemente, a substituição do implante e causam recidiva da infecção, seguido pela cardíaca e intra-abdominal. Estas são o segundo tipo mais comum de infecções nosocomiais causadas principalmente por microrganismos Gram-positivos como *S. aureus*, *Streptococcus* spp., resultando em hospitalização prolongada e risco de morte. Entre os microrganismos Gram-negativos destacam-se *E. coli* e *K. pneumoniae*. Os patógenos que causam SSI são geralmente da microbiota do paciente e os grupos de maior risco são idosos, diabéticos, fumantes e/ou alcoólatras, pacientes em procedimentos cirúrgicos com duração superior a 3 h e pacientes com histórico de cirurgias prévias, hospitalização prolongada, além da ausência de profilaxia com antibióticos. A incidência pode chegar a 20%, dependendo do procedimento e dos critérios de vigilância utilizados. Além disso, 25% dos pacientes acometidos podem apresentar sepse e choque com transferência para UTI (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2018; HAQUE et al., 2018; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

Outro tipo comum de infecção hospitalar é a pneumonia, principalmente associada à ventilação mecânica (VAP). O uso de ventilação mecânica aumenta o risco de pneumonia de 6 para 20 vezes, sendo responsável por 86% dos casos de infecções nosocomiais. 9 a 27% dos pacientes que utilizam ventilação mecânica desenvolvem pneumonia. Os sintomas mais comuns incluem febre, leucopenia e sons brônquicos, podendo ocorrer dentro de 48 h após a incubação traqueal, sendo considerada a principal causa de morte. Entre os organismos mais incidentes estão *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2018; HAQUE et al., 2018; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

A infecção primária da corrente sanguínea (CLABSI) acomete, na maioria das vezes, pacientes neonatos e está relacionada ao uso de cateteres venosos centrais no fornecimento de alimentos e medicamentos, além de apresentar comorbidade em pacientes do sexo masculino, gravemente doentes e/ou imunossuprimidos. *S. aureus*, *Enterococcus* e as espécies de *Klebsiella* são os organismos mais comuns neste tipo de infecção. A taxa de mortalidade por esse tipo de infecção é de 12-25%, estimando-se que 30000 infecções ocorram anualmente nas UTIs dos EUA (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; ELLIOTT; JUSTIZ-VAILLANT, 2018; HAQUE et al., 2018; KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

3.1.2 Patógenos nosocomiais

Os patógenos responsáveis pelas infecções hospitalares podem ser bactérias, parasitas, fungos e vírus, sendo variável dependendo das condições que favorecem a interação paciente-ambiente. Entretanto, as bactérias destacam-se nesse grupo, principalmente aquelas responsáveis por infecções oportunistas, que geralmente são provocadas por bactérias benígnas que compõem a microbiota do hospedeiro e vivem como comensais, sendo responsáveis pela homeostasia microrganismo-hospedeiro. Entretanto, o desequilíbrio nesse processo devido à queda da imunidade pode provocar a colonização de bactérias patogênicas ou até mesmo fazer com que as bactérias que compõem a microbiota invadam o tecido do hospedeiro, uma vez que, esses microrganismos são capazes de suportar condições adversas do habitat natural. Entre as bactérias oportunistas de maior prevalência destacam-se as famílias Staphylococcaceae e Enterobacteriaceae.

Staphylococci são bactérias frequentemente encontradas na microbiota da pele e mucosas de humanos e outros mamíferos. Os membros do gênero *Staphylococcus* pertencem

a um grupo diversificado de bactérias Gram-positivas na forma de cocos (0,5-1,5 μm de diâmetro) isolados, aos pares, tétrades ou formando cadeias curtas (três ou quatro células) e cachos irregulares semelhantes à uva. São imóveis, não formam endósporos, não apresentam cápsula ou tem formação limitada, são anaeróbios facultativos, suas colônias são opacas e podem ter coloração esbranquiçada ou creme e algumas vezes amarelo-douradas. Geralmente são catalase e citocromo positivos, mas oxidase negativos, reduzem o nitrato a nitrito e não são susceptíveis a lise pela lisozima. Crescem bem em NaCl e apresentam temperatura ótima entre 30-37 °C. Com exceção de *S. saccharolyticus* (*S. epidermidis*) e *S. aureus* subsp. *anaerobius*, o crescimento é mais rápido e abundante em condições aeróbicas. O conteúdo de guanina-citosina do DNA está na faixa de 30 a 39 mol% e o tamanho do genoma está na faixa de 2000 a 3000 kb (GÖTZ; BANNERMAN; SCHLEIFER, 2006; HOLT et al., 1994).

Entre as diferentes linhagens do gênero, *S. aureus* é a mais virulenta. *S. aureus* diferencia-se das demais espécies do gênero por apresentar plano de divisão semelhante a cachos de uvas (Figura 1a). As doenças causadas por *S. aureus* vão desde infecções de pele a infecções fatais como bacteremia e sepse. Essa bactéria está entre as causas mais frequentes de infecções nosocomiais e infecções associadas ao uso de dispositivos médicos, também é a principal causa de infecções associadas com a formação de biofilme. Os grupos de risco incluem pacientes em condições crônicas como diabetes, câncer, doença vascular, eczema, doença pulmonar e pessoas que injetam drogas (CDC, 2011).

Figura 1 – Aspecto morfológico das bactérias *Staphylococcus aureus* (a), *S. epidermidis* (b) e *Klebsiella* spp. (c).

Fonte: CDC (2013) e Lee et al. (2018).

Nas unidades de saúde, o risco de infecção por *S. aureus* é maior porque muitos pacientes têm o sistema imunológico debilitado ou foram submetidos a procedimentos invasivos, sendo a maior prevalência para pacientes em UTIs, pacientes submetidos a certos tipos de cirurgias e pacientes com dispositivos. *S. aureus* tornou-se um enorme problema de saúde pública, seja nas infecções hospitalares ou adquiridas na comunidade, uma vez que, já

colonizou cerca de um terço da população mundial, sendo residente permanente das passagens nasais e pele de 30% da população e cerca de 60% a carregam ocasionalmente. Exposta em superfícies pode sobreviver por meses estando diretamente relacionado à formação de biofilmes. Apresenta grande resistência aos antibióticos tradicionais, uma vez que, seu genoma é composto por cerca de 300000 pares de bases em relação à outra espécie do gênero, inferindo em uma gama de fatores de virulência e meios de evadir as defesas do hospedeiro. Isso limita a eficácia terapêutica e torna-se um problema para o tratamento de infecções crônicas (CDC, 2013; HOLT et al., 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

S. epidermidis é a espécie mais frequentemente isolada de epitélios humanos e predominantemente coloniza as axilas, cabeça e narinas. *S. epidermidis* pertence ao grupo coagulase negativo (CoNS), que os distinguem dos estafilococos coagulase positivos, como *S. aureus*. As linhagens de *S. epidermidis* são altamente diversificadas, apresentando 72 tipos de sequência genicas identificadas, que estão diretamente relacionadas com a capacidade de formar biofilmes e invasividade (Figura 1b). Assim como para *S. aureus*, as mudanças na medicina em direção a procedimentos invasivos têm favorecido seu surgimento como um patógeno oportunista importante, particularmente em infecções nosocomiais, sendo considerado a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos. A capacidade de formar biofilmes sobre corpos estranhos, nos quais as bactérias são protegidas da ação de antibióticos e do sistema imunológico, é primordial para a evolução da doença. *S. epidermidis* e outros estafilococos coagulase negativos são as principais causas de infecções sítio cirúrgicas da corrente sanguínea associadas à cateteres venosos centrais, com grandes implicações econômicas. Apesar desse impacto, pouco se sabe sobre os mecanismos de patogênese e tratamento de *S. epidermidis*. Muitas das decisões clínicas tomadas ao tratar esta espécie são baseadas em estudos para *S. aureus* (LEE et al., 2018). Embora as infecções por *S. epidermidis* raramente evoluam para doenças com risco de vida, a frequência, e o fato de o tratamento ser extremamente laborioso associado à facilidade em evadir-se do sistema imune e causar infecções crônicas representa um grave problema para o sistema público de saúde (OTTO, 2009).

Os bastonetes Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae constituem mais de 24 gêneros e esse número tem aumentado nos últimos anos em decorrência dos avanços da biologia molecular. Essa família desempenha um papel crítico, uma vez que, estão entre os representantes bacterianos mais frequentemente isolados em espécimes clínicos. Estão amplamente dispersos na natureza, sendo encontrados no solo, na água, em plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de humanos e animais.

Os membros da família Enterobacteriaceae são bastonetes aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase negativos, reduzem o nitrato a nitrito, produzem ácido pela fermentação da glicose e não formam endósporos, podem apresentar flagelos peritríquios ou ausência de motilidade. Diversos meios podem ser utilizados para diferenciar os gêneros pertencentes a essa família através de provas bioquímicas, como a capacidade de fermentar a lactose, utilizar citrato, descarboxilar a lisina e outros. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal antígeno dessa família. As enterobactérias podem ser classificadas sorologicamente de acordo com os componentes do seu LPS: polissacarídeo somático O, antígeno capsulares K e proteínas flagelares H (JANDA, 2006).

Entre os gêneros pertencentes a esta família encontra-se outro patógeno oportunista de importância, *Klebsiella* spp. (Figura 1c). Antes do advento dos antibióticos, da quimioterapia e dos procedimentos imunossupressores, as doenças infecciosas causadas pelas enterobactérias eram relativamente bem definidas; casos clássicos de pneumonia, caracterizados pela produção de escarro vermelho-tijolo tinham como agente causador “o bacilo de Friedlander” (WINN et al., 2006). *K. pneumoniae* é a espécie-tipo deste gênero e considerada de maior importância devido à resistência desta bactéria a antibióticos associada a uma crescente morbidade e mortalidade. Entretanto, *K. oxytoca* tem sido isolada mais frequentemente, sendo normalmente adquirida de fontes ambientais. Alguns estudos anteriores mostraram seu efeito patogênico associado a infecções respiratórias de diferentes amostras clínicas principalmente em secreções como escarro e sanguíneas de alguns pacientes e, vem ganhando significado clínico em imunocomprometidos e pacientes debilitados internados em UTIs (LOWE et al., 2012; WEINER et al., 2016). As espécies do gênero *Klebsiella* encontram-se amplamente distribuídas na natureza, onde são encontradas em águas, esgotos, solos, plantas e, em superfícies mucosas como o trato gastrointestinal de humanos e animais (PODSCHUNG; ULLMANN, 1998; SINGH; CARIAPPA; KAUR, 2016). Apresentam-se como colônias grandes, em forma de cúpula (0,3 a 1 µm diâmetro), frequentemente encapsuladas, com aspecto mucoide e, às vezes, viscoso após 24 h de incubação a 30-37 °C, dependendo da linhagem e da composição do meio. Suas colônias apresentam coloração vermelha ou rosada em ágar MacConkey (indicativo de fermentação da lactose e produção de ácido). Nem todas as espécies, no entanto, são mucoides podendo ocorrer semelhanças com algumas espécies de *Enterobacter*. *K. oxytoca* diferencia-se de *K. pneumoniae* por ser indol positiva (BRISSE; GRIMONT; GRIMONT, 2006).

Os sítios anatômicos comuns de colonização por espécies do gênero *Klebsiella* são os olhos, o trato respiratório e principalmente o trato gastrointestinal onde não causam

doenças, sendo este considerado o reservatório mais comum. Podem causar diferentes tipos de infecções relacionadas à assistência à saúde, incluindo broncopneumonia, infecções da corrente sanguínea, infecções urinárias, infecções de feridas ou sítio cirúrgica, meningite e sepse. Os fatores de risco como idade, alcoolismo, diabetes mellitus, doenças cardíacas, renais, pulmonares, neoplasias e pacientes fazendo uso prologado de antibióticos, além do uso de dispositivos médicos, como ventiladores mecânicos ou cateteres intravenosos são determinantes no estabelecimento de infecções por *Klebsiella*. Essa bactéria, cada vez mais, desenvolve resistência antimicrobiana, sendo algumas linhagens resistentes à classe de antibióticos de amplo espectro conhecida como carbapenêmicos, o que dificulta o tratamento. A transmissão do microrganismo é facilitada através do contato pessoa-pessoa (por exemplo, paciente a paciente pelas mãos dos profissionais da saúde ou de outras pessoas que podem atuar como carreadores transitórios ou persistentes) ou, menos comumente, pela contaminação do ambiente, não ocorrendo por meio do ar e sem exposição direta à bactéria. No ambiente hospitalar, as infecções por *Klebsiella* são causadas, principalmente, por *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* na proporção de 2:1 e, geralmente ocorrem em pacientes que estão recebendo tratamento para outras condições (BRISSE; GRIMONT; GRIMONT, 2006; FELDMAN et al., 1990; HANSEN; GOTTSCHAU; KOLMOS, 1998; SINGH; CARIAPPA; KAUR, 2016). Estima-se que *Klebsiella* spp. seja responsável por 8% de todas as infecções bacterianas nosocomiais nos Estados Unidos e Europa, posicionando o gênero dentre as 18 principais ameaças resistentes a antibióticos nos EUA juntamente com MRSA (CDC, 2013; PODSCHUNG; ULLMANN, 1998; WEINER et al., 2016).

Esses microrganismos representam um desafio na definição de políticas públicas, pois abrangem não apenas o setor de saúde, mas também o econômico por apresentarem os mais altos fenótipos de resistência antimicrobiana quando isolados a partir de dispositivos médicos em infecções nosocomiais. Isso ocorre, pois na ausência de um corpo estranho, geralmente a defesa do hospedeiro consegue driblar a infecção. Entretanto, a presença de um dispositivo desencadeia uma resposta local do tecido, que inclui inflamação aguda e crônica, reação ao corpo estranho, formação de tecido de granulação e, finalmente, fibras de encapsulamento. Isso gera um nicho de depressão da imunidade que predispõe o implante à colonização e infecção microbiana. Por exemplo, menor quantidade de células de *S. aureus* são necessárias para infectar coelhos quando um material estranho está presente no local da cirurgia do que quando a cirurgia é realizada sem a presença de implantes (SOUTHWOOD et al., 1985). Além disso, o biomaterial é um substrato para adesão bacteriana e formação de

biofilme, o que aumenta ainda mais a tolerância das bactérias aos agentes antimicrobianos e a virulência de infecções crônicas.

3.2 Biofilmes

Os microrganismos como as bactérias e fungos podem crescer livremente (planctônicos) ou estarem associados às superfícies na forma de células sésseis. A maioria dos estudos tem caracterizado a fisiologia das bactérias, incluindo sua biologia molecular, baseados no estado planctônico em meio líquido, o que tem sido a base para a descoberta dos antibióticos atualmente disponíveis. Essa abordagem funciona bem para infecções agudas, uma vez que, essas infecções são predominantemente provocadas por células planctônicas. Entretanto, menos de 0,1% de toda a biomassa microbiana no planeta encontra-se crescendo livremente (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016). Na maioria dos ambientes naturais, os microrganismos são encontrados em estruturas organizadas envoltos por uma MPE, conhecidos como biofilmes. Os biofilmes podem ser benéficos, servindo de proteção contra microrganismos patogênicos quando presentes em membranas mucosas; ou podem ser nocivos, crescendo sobre dispositivos médicos como próteses e cateteres, além de contaminar alimentos (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016).

Os biofilmes são definidos como agregados celulares de uma ou mais espécies microbianas que se formam por aderência de células livres às superfícies e/ou interfaces sólido-líquido abióticas ou bióticas compondo uma complexa comunidade microbiana envolvida na MPE (COSTERTON, 1995; FLEMMING et al., 2016; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016). Isso ocorre quando, respondendo a uma condição ambiental adversa (temperatura, disponibilidade nutricional, alteração de pH, presença de antibióticos), as bactérias alteram seu modo de vida deixando de se comportar como seres unicelulares e formam uma grande colônia aderindo-se a uma superfície e/ou ligando-se umas às outras. As etapas de formação de biofilmes incluem: adesão, formação de microcolônias, maturação e dispersão como mostrado na Figura 2 (BJARNSHOLT et al., 2013).

A adesão inicial das bactérias planctônicas a uma interface é considerada instável e reversível, uma vez que, se o ambiente não fornecer condições favoráveis, as células podem se desprender. Essa adesão é mediada por forças atrativas e repulsivas, como interações eletrostáticas e do tipo *van der Waals* e, por vários fatores de motilidade, quimiotaxia, apêndices extracelulares de adesão como fímbrias e pili, secreção de adesinas, entre outros. A transição dos estilos de vida planctônico para a forma de biofilme também é orquestrada por sinais extra e intracelulares, como o nucleotídeo diguanilato monofosfato cíclico (c-di-GMP),

que regula o controle da expressão gênica a partir de estímulos externos. Estudos reportaram que o aumento no nível do c-di-GMP promoveu a formação de biofilmes, enquanto a diminuição promoveu a dispersão destes (BJARNSHOLT et al., 2013; SINGH, S. et al., 2017).

Figura 2 – Representação do ciclo de formação do biofilme, sendo: células livres (1), adesão inicial (2), divisão celular e aumento da população (3), biofilme maduro (4). A etapa de dispersão não está representada no esquema.

Fonte: Adaptado de Bjarnsholt et al. (2013).

Após a aderência, as células começam a se dividir e crescer, ocorrendo a secreção dos componentes extracelulares que vão compor a matriz polimérica. Entre os componentes extracelulares que formam a MPE estão proteínas, lipídeos, lipopolissacarídeos, DNA e polissacarídeos, além de pili e flagelos ligados a superfície celular. Essa matriz sustenta e estabiliza as células agrupadas, mantendo a estrutura e função do biofilme e, é nessa etapa, que a adesão das células passa para um estágio irreversível, em que interações dipolo-dipolo, iônicas, de hidrogênio e hidrofóbicas estão envolvidas (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016).

O aumento populacional das bactérias faz com que as mesmas formem estruturas dispostas em pilares, compostas por uma camada de superfície de cerca de 10 µm de espessura, podendo elevar-se até 200 µm acima dela. Essa forma de crescimento em pilares facilita o acesso nutricional e evita acúmulos de resíduos tóxicos. Além disso, os biofilmes podem apresentar densidade celular que varia de 10^8 a 10^{11} células/g de peso úmido e,

geralmente, compreendem muitas espécies aglomeradas. O aumento da densidade populacional desencadeia a indução de genes que regulam o comportamento bacteriano, denominado *quorum sensing*. Esse é o termo usado para descrever o processo de comunicação intra e interespecies, respondendo a diferentes estímulos de modo unificado, o que oferece vantagens para as bactérias quando desempenham funções específicas como um grupo, do que como indivíduos autônomos. Este mecanismo é desencadeado por moléculas denominadas auto-indutoras (AI) e os dois mecanismos mais bem elucidados são: os sistemas acil-homoserina lactona (HSL) de bactérias Gram-negativas e os sistemas sinalizadores baseados em peptídeos de bactérias Gram-positivas. Esses sinais químicos regulam uma variedade de processos no desenvolvimento e maturação do biofilme (SINGH, S. et al., 2017).

De um modo geral, as características da MPE são determinantes no grau de adesão dos microrganismos, pois é nesse estágio que ocorre a maturação estrutural do biofilme. A formação da matriz é um processo dinâmico, contínuo e depende da disponibilidade nutricional, aeração, temperatura, pH das espécies bacterianas envolvidas na formação do biofilme, da síntese e secreção de material extracelular, força de cisalhamento e competição oferecida por outros organismos. Esses fatores influenciam na variação de formatos apresentados pelos aglomerados celulares, representando a arquitetura tridimensional do biofilme e produzindo uma organização espacial em que as células se agrupam em microcolônias (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016).

Na maioria dos biofilmes, os microrganismos representam menos de 10% do peso seco, enquanto 90% é representado pela MPE. O componente principal da matriz é a água (aproximadamente 97%). A presença de água na matriz forma poros e canais entre as microcolônias que facilitam os processos de difusão e mobilidade no seu interior, funcionando como um sistema circulatório rudimentar. A matriz também funciona como um sistema digestivo externo mantendo enzimas extracelulares próximas as células e permitindo a metabolização de compostos como nutrientes adsorvidos e produtos de lise de células e materiais circundantes do ambiente (FLEMMING et al., 2016).

Uma vez formado, o biofilme pode permanecer aderido por um longo período ou dispersar-se liberando células livres, que podem vir a colonizar novos ambientes.

As propriedades emergentes das comunidades no biofilme são responsáveis por um estilo de vida totalmente diferente do estado planctônico. A matriz também oferece uma fonte de heterogeneidade entre os processos que ocorrem dentro do biofilme e as interações com o ambiente externo, que pode ser desencadeado em resposta aos estímulos do meio e ciclos de vida coordenados. A auto-organização das moléculas que compõem a matriz é

baseada em interações intermoleculares entre os seus componentes, o que determina as propriedades mecânicas da matriz, por exemplo, na camada externa da matriz predomina a presença de moléculas hidrofóbicas que aumentam a capacidade do biofilme em adaptar-se a desidratação, ação de antibióticos e do sistema imune, além de outros fatores danosos. Essa configuração também facilita a atividade fisiológica dos organismos através do estabelecimento de gradientes físico-químicos íngremes, biodiversidade e interações complexas e sinérgicas, incluindo: a comunicação célula-célula, retenção de enzimas extracelulares e a expressão de genes e proteínas, que permitem o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos em ecossistemas espacialmente heterogêneos (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017). Esse nível de organização estrutural justifica a marcante resistência dos biofilmes aos antimicrobianos e a preocupação constante nas indústrias farmacêuticas e de alimentos.

3.2.1 Resistência dos biofilmes aos antimicrobianos

O biofilme pode ser visto como uma fortaleza no contexto da resistência antibiótica, o que justifica os avanços no desenvolvimento de antimicrobianos, com atividade melhorada contra bactérias que expressam vários mecanismos de resistência, apenas para bactérias planctônicas (HUH; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016). Essa resistência é multifatorial, abrangendo mecanismos físicos, fisiológicos e adaptativos, além da resistência convencional, independente da formação de biofilmes, que representa um fator adicional no restabelecimento das células sésseis após o tratamento antimicrobiano (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016). Existem vários mecanismos que fundamentam a resistência maior dos microrganismos quando formam biofilmes, entre eles estão:

Tolerância física: é dependente da estrutura tridimensional do biofilme oferecida pela MPE, reduzindo a difusão das substâncias antimicrobianas; alguns componentes da matriz como DNA extracelular e alguns polissacarídeos podem funcionar como agentes quelantes e a presença de enzimas degradativas também auxiliam no processo. Contudo, esse mecanismo é de curto prazo, uma vez que, a exposição contínua a agentes estressantes pode limitar essas funções (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Tolerância fisiológica: é determinada pela taxa metabólica no biofilme. A maioria dos antibióticos atua sobre células metabolicamente ativas e, as células sésseis, apresentam diferentes gradientes metabólicos. Quanto mais afastado da superfície, menor é a disponibilidade nutricional e a aeração, o que leva ao estabelecimento de duas subpopulações:

uma população aeróbica e metabolicamente ativa e, outra em estado dormente e anaeróbica. Essas últimas podem encontrar-se em dois estados: microrganismos viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) ou como bactérias persistentes, que são subpopulações multirresistentes e variantes fenotípicas, não genéticas. Em ambos os casos, a atividade metabólica e integridade da membrana são mantidas durante a dormência. Ao longo do tempo, um grande número de células passa para a fase estacionária, consequentemente alguns antibióticos tornam-se menos efetivos quanto mais velho o biofilme. A tolerância de um biofilme maduro é cerca de 1000 vezes maior comparado às mesmas espécies bacterianas crescendo livremente contra a maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo antibióticos e detergentes. Dado a elevada proporção de células estacionárias na comunidade do biofilme, espera-se a predominância de células persistentes, que podem evadir-se do sistema imune e restabelecer a infecção (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Tolerância adaptativa: resulta da capacidade de modificar e/ou neutralizar o agente antimicrobiano, não requer mudanças genéticas e, é mediada por sinais reguladores que são interrompidos quando a exposição a substância cessa. A tolerância adaptativa pode ser específica ou inespecífica. Exemplos de tolerância específica são: a indução de enzimas β -lactamases em resposta a presença de antibióticos β -lactâmicos; a mudança estrutural do lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas quando expostas a polimixinas. Já a tolerância inespecífica ocorre através da expressão de fatores de proteção específicos, como as bombas de efluxo e os *regulons* de resposta ao estresse, representando desse modo um mecanismo para a eliminação de compostos tóxicos que se acumulam nos biofilmes ou através da conversão fenotípica de linhagens selvagens sensíveis em variantes tolerantes (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Resistência convencional nos biofilmes: acontece em função da taxa de mutação nos biofilmes que é maior do que em bactérias planctônicas devido à proximidade e contato célula-célula, o que permite diferentes padrões de expressão gênica e facilita a transmissão de fatores de virulência como genes de resistência por conjugação, incluindo o DNA extracelular, que pode representar um reservatório constante para transferência horizontal de genes, por exemplo. Outro exemplo é o aumento do fator sigma que desencadeia a fase estacionária em resposta a exposição a substâncias antimicrobianas. Além disso, a barreira de difusão oferecida pela matriz extracelular resulta em diferentes gradientes químicos e

ambientais como pH ácido e baixos níveis nutricionais que levam a uma diminuição do estado metabólico e hipóxia. Isso estabelece diferentes concentrações dos antimicrobianos disponíveis para interagir com as células, fazendo com que a aquisição de resistência seja acelerada e contribuindo com o aumento da virulência (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Portanto, considerando que a formação dos biofilmes é multifatorial, várias estratégias têm sido propostas na tentativa de conter essa forma de vida (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

3.2.2 Estratégias na contenção dos biofilmes

Para a contenção dos biofilmes, quatro estratégias têm sido descritas na literatura: prevenção, enfraquecimento, rompimento e/ou eliminação da comunidade microbiana. Entretanto, a combinação de artifícios pode ser mais eficiente do que utilizar uma estratégia isolada (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Na prevenção, os compostos podem matar as bactérias enquanto ainda são células planctônicas e sensíveis a ação dos antimicrobianos. Entretanto, esse mecanismo é profilático e mais eficiente em implantes, cateteres e superfícies na indústria, pois no caso de infecções provocadas por biofilmes, a fase inicial de formação do biofilme é difícil de ser detectada, uma vez que, a inflamação se instala de forma lenta e insidiosa no local e, quando o processo inflamatório pode ser detectado, o biofilme geralmente já está formado. No caso em que a superfície não se encontra exposta e acessível, pode-se impedir a formação do biofilme pelas células livres, atuando em componentes responsáveis pela adesão inicial, como flagelos, pili, DNA extracelular e polissacarídeos. Isso pode ocorrer pela inibição de vias regulatórias na expressão desses componentes como o c-di-GMP ou usando anticorpos específicos para esses alvos. Outra abordagem utilizada na prevenção do biofilme elucida o uso de enzimas que degradam os componentes do biofilme em formação ou enfraquece o biofilme já formado. Frederiksen et al. (2006) mostraram a eficácia desse mecanismo em pacientes com fibrose cística através da inalação de partículas recombinantes de DNase, o que levou a digestão do DNA liberado das células do biofilme por leucócitos polimorfonucleares e redução da viscosidade do escarro (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

No enfraquecimento, pode-se neutralizar os fatores de virulência essenciais na formação do biofilme como o *quorum sensing*, sRNAs ou metabolismo de ferro. No entanto, do mesmo modo que na prevenção, essas estratégias só são eficazes nos estágios iniciais de desenvolvimento do biofilme, não atuando em biofilmes maduros. Vale ressaltar, que muitas

dessas estratégias são espécie-específica e até mesmo linhagem-específica (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Uma vez que o biofilme se estabelece, mecanismos de rompimento podem ser utilizados. Por exemplo, processos mecânicos de ruptura da matriz podem enfraquecer o biofilme, levando a uma melhor eficácia dos antibióticos, aumento da fagocitose ou liberação de bactérias do biofilme, facilitando a exposição das células aos antimicrobianos. Contudo, a remoção mecânica é mais aplicável às superfícies e, em alguns casos em implantes *in situ* vem sendo investigado o uso de ultrassom e radiação. Outra abordagem de rompimento, porém biológica, é a utilização de enzimas que degradam a MPE. Também se pode ativar a dispersão do biofilme através de compostos que iniciam esse processo ou diminuem a adesividade das bactérias, afetando as fontes nutricionais, interferência nos níveis de c-di-GMP, entre outros. As desvantagens desse processo incluem a necessidade de tratamento antibiótico simultâneo, pois a liberação de células planctônicas após a dispersão pode propagar a infecção para outros locais e técnicas que envolvem radiação podem danificar o tecido do hospedeiro (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Outra estratégia que pode ser utilizada é a exposição direta das células no biofilme ao tratamento antibiótico ou a compostos que se ligam a membrana bacteriana. Tem sido demonstrado que os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de antibióticos que atuam sobre células livres e biofilmes são semelhantes, no entanto, em biofilmes, as concentrações e tempo de exposição para erradicação são maiores e, factível de apresentar toxicidade. Entretanto, quando o biofilme se estabelece em áreas acessíveis, o tratamento antibiótico e/ou a combinação de classes de antibióticos podem ser eficazes. Também podem ser utilizados compostos como etanol ou ácido clorídrico em cateteres e superfícies. As falhas em erradicar o biofilme são as principais desvantagens dessa estratégia. Isso se deve a organização da microcolônia em diferentes gradientes e consequente exposição a concentrações sub-inibitórias dos agentes antimicrobianos (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016).

Além das estratégias anteriormente descritas, a combinação de diferentes compostos visando atingir as estruturas e não os processos celulares do biofilme representa uma maneira eficaz de conter essa organização, uma vez que, pode ocorrer sinergismo devido a interferência simultânea em diferentes alvos (BJARNSHOLT et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016). Entre os candidatos mais promissores em alcançar quase todos os aspectos das infecções microbianas encontram-se os nanomateriais.

3.3 Nanomateriais com atividade antimicrobiana

Mesmo com todos os avanços tecnológicos, nenhum novo antibiótico foi introduzido no mercado desde 2012 e, o que existe atualmente são antibióticos com efeito potencializado decorrente de modificações estruturais nos pré-existentes. Diante disso e com o consequente surgimento de bactérias multirresistentes, a Organização Mundial de Saúde reconhece que a descoberta de novos antibióticos, particularmente aqueles com novos modos de ação, são necessários para evitar futuras pandemias (BUTLER; BLASKOVICH; COOPER, 2017; HOWARD; HOPWOOD; DAVIES, 2014). Atualmente, existe um consenso de que os nano-antimicrobianos (NAMs) podem ser uma alternativa efetiva para combater a resistência bacteriana (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; RIBEIRO et al., 2016).

Os NAMs agrupam-se dentro da nanotecnologia, que é definida como a aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar a matéria predominantemente em nanoescala, dimensões críticas entre 1 e 100 nm, para fazer uso de propriedades e fenômenos dependentes de tamanho e estrutura, distintos daqueles associados a átomos ou moléculas individuais, ou extrapolação de tamanhos maiores do mesmo material (ISO, 2017). É nessa faixa que os materiais podem ter propriedades substancialmente diferentes em comparação com as mesmas substâncias em tamanhos maiores, tanto por causa da proporção aumentada de área de superfície em relação à massa, quanto por efeitos quânticos desempenharem um papel nessas dimensões, levando a mudanças significativas em várias propriedades físicas (SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS - SCENIHR, 2006; VERT et al., 2012). Um material na nanoescala pode exibir propriedades com características novas e/ou melhoradas como, por exemplo: mudanças ópticas (cor), mecânicas (resistência à tração), químicas (catálise) e elétricas (condutividade), que os diferenciam dos materiais de origem (ISO, 2017). A nanotecnologia tem sido aplicada em muitos campos da ciência como prevenção e tratamento na área clínica, indústria de alimentos e cosméticos, sistemas de liberação controlada de bioativos e terapia gênica, odontologia, diagnóstico, entre outros (JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017).

O desenvolvimento de nanopartículas com atividade antimicrobiana inerente encontra-se entre uma das principais áreas de interesse da nanotecnologia. As NPs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, utilizando diferentes materiais e, o crescente número de estudos nessa área está diretamente relacionado às mudanças em suas propriedades físico-químicas e ópticas que são ocasionadas pela redução do tamanho e refletem na sua

aplicabilidade (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; RIBEIRO et al., 2016). Entre as vantagens oferecidas por esses sistemas em relação aos convencionais estão: maior tempo de meia vida, prevenindo a degradação prematura do bioativo; otimização da biodisponibilidade de fármacos ou outros compostos por modular sua farmacocinética/farmacodinâmica; aumento da solubilidade e estabilidade; minimização dos efeitos colaterais; liberação sítio-específica, permitindo que o efeito terapêutico seja alcançado com redução da dosagem e frequência de administração; baixo custo de produção, entre outros. Para aplicação antimicrobiana, ultrapassar as barreiras da resistência aos antibióticos é o maior desafio, os NAMs podem superar esse obstáculo em quase todos os aspectos. Isso ocorre porque eles oferecem menor probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana devido ao alcance simultâneo de diferentes alvos; maior área de contato para interagir com os microrganismos, bactérias intracelulares e biofilmes; aumento da captação e diminuição do efluxo do antimicrobiano a partir da membrana celular, entre outros (HUW; KWON, 2011). Os NAMs utilizados dividem-se em dois grupos: os que possuem efeito direto sobre os patógenos e os sistemas de liberação controlada utilizados como transportadores para melhorar a biodisponibilidade de bioativos ou encapsulando-os.

3.3.1 Sistemas de liberação controlada

Os sistemas de liberação de fármacos estão sendo amplamente empregados, uma vez que, são conhecidas inúmeras substâncias com alto potencial terapêutico, mas que não são aplicadas devido a insolubilidade e/ou baixa biodisponibilidade no organismo. Dependendo do sistema de liberação utilizado pode-se prevenir a degradação prematura do bioativo, manter a concentração do fármaco dentro da janela terapêutica pelo controle da sua taxa liberação e reduzir os efeitos colaterais pelo direcionamento da substância ativa ao alvo específico da doença, aumentando a biodisponibilidade. A biodisponibilidade também pode ser aumentada com redução do tamanho da partícula do fármaco, o que melhora a sua taxa de dissolução. Como exemplos de sistemas de liberação têm-se: lipossomas, nanopartículas lipídicas-sólidas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanoemulsões, micelas, complexo de inclusão, nanogéis. Apesar dessa ampla variedade de sistemas de liberação de fármacos, problemas como capacidade de transporte do fármaco, direcionamento da substância ativa, destino do transportador *in vivo* (taxa de degradação e acúmulo em órgãos), toxicidade dos transportadores ou de seus metabólitos, produção em larga-escala, estabilidade de armazenamento e custo, devem ser levados em consideração (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; RIBEIRO et al., 2016).

3.3.2 Nanomateriais com propriedades antimicrobianas inerentes

Os nanomateriais com propriedades antimicrobianas inerentes compreendem o grupo de todos os sistemas nanoestruturados que apresentam atividade antimicrobiana própria. Entre esses sistemas estão as nanopartículas cerâmicas, constituídas de material inorgânico e, as NPs metálicas, compostas por metais ou óxidos de metais, como a prata, ouro, óxido de zinco, cobre, ferro, fluoreto de magnésio (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; OGUNSONA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016).

Dentro das NPs cerâmicas destacam-se: o dióxido de titânio, que pode ser encontrado em três formas cristalinas, sendo a fase anatase a mais descrita na literatura como agente antimicrobiano devido à maior capacidade fotocatalítica (BHATKHANDE; PANGARKAR; BEENACKERS, 2001), embora alguns estudos sugerem que sua atividade independe de irradiação; NPs de óxido de zinco que são utilizadas por sua estabilidade inata sob determinadas condições; NPs de sílica despertam o foco das indústrias farmacêuticas por sua capacidade de encapsular fármacos e outros compostos terapêuticos (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; OGUNSONA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016).

Já para as NPs metálicas, as de prata são as mais bem exploradas nesse campo, embora seu mecanismo de ação não seja totalmente compreendido, tem sido descrito na literatura a captação de íons Ag^+ levando a ruptura da membrana celular bacteriana. Em segundo lugar, estão as nanopartículas de ouro, que não apresentam atividade antibacteriana por si só, mas combinadas com antibióticos e outros compostos foram promissoras em combater microrganismos multirresistentes, que originalmente não eram inibidos pelos antibióticos isoladamente. Outros óxidos metálicos, incluindo ZnO , MgO , CaO e CeO_2 , também apresentam atividade antimicrobiana (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; OGUNSONA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016).

Os nanomateriais têm grande potencial para aplicações futuras na indústria farmacêutica e de alimentos. No entanto, apenas alguns nanomateriais visando o controle de infecções foram aprovados pelo FDA. Superar as limitações que os sistemas desenvolvidos apresentaram, como citotoxicidade, especificidade, liberação otimizada, além de combater microrganismos multirresistentes ainda é um desafio. A toxicidade *in vivo* está entre os principais riscos na utilização de formulações na escala nanométrica, principalmente a exposição prolongada e especificidade dos metais a alguns tecidos, e, a quantidade de transportadores e surfatantes sintéticos utilizados para a obtenção dos sistemas de liberação,

que resultam em formulações com baixa segurança (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; OGUNSONA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016).

Para evitar os problemas de toxicidade, o uso de NPs poliméricas e biosurfatantes têm sido propostos, podendo funcionar como transportador de bioativos, especialmente os insolúveis em água; em sistemas de liberação; melhorando o efeito antibiofilme e/ou como agente antimicrobiano propriamente dito, como as NPs poliméricas de quitosana e as NPs utilizando ramnolípídeo como biosurfatante. Além disso, a combinação de mais de um agente antimicrobiano na mesma nanopartícula pode ser uma estratégia promissora (HUW; KWON, 2011; JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017; OGUNSONA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2016).

3.3.2.1 Quitosana

A quitosana é um copolímero composto por unidades 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, obtido a partir da desacetilação parcial da quitina (Figura 3). A quitina é um polissacarídeo estrutural presente em insetos, crustáceos, moluscos, fungos e, dependendo da fonte pode ser encontrada em três formas cristalinas distintas: α , β e γ (RINAUDO, 2006). A quitina é insolúvel em solução aquosa e solventes orgânicos, no entanto, a quitosana é solúvel em soluções de ácidos fracos e diluídos, sendo mais interessante para aplicações biológicas do que a quitina.

Fonte: Autoria própria.

Esse biopolímero vem despertando o interesse nas mais diversas áreas devido a sua biocompatibilidade, atoxicidade, biodegradabilidade, natureza catiônica e por apresentar muitas aplicações biológicas, como a atividade antimicrobiana (MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017; MARANGON et al., 2017; SAHARIAH; MÁSSON, 2017). Além disso, a quitosana obtida a partir de gládios de lula (β -quitina) tem propriedades diferenciadas, tais como, um peso molecular mais elevado e, assim, uma viscosidade intrínseca maior, melhores propriedades na forma de sua aplicabilidade em comparação com aquelas obtidas a partir de

outras fontes como camarão ou caranguejo (α -quitina). Devido ao empacotamento menos denso, a β -quitina absorve mais umidade que a α -quitina e isso está diretamente relacionado a atividade antimicrobiana, uma vez que, a solubilidade afeta a interação com a bactéria (CAMPANA-FILHO et al., 2007; KONG et al., 2010).

Outras características que tornam a quitosana um biopolímero versátil para inúmeras aplicações estão relacionadas à possibilidade de ser quimicamente modificada, processada em diferentes formas (soluções, géis, filmes, emulsões, nanopartículas, entre outros) e de ser um polieletrólito em meio ácido, seja em sua forma isolada, ou em associação com outros compostos (GAVHANE; GURAV; YADAV, 2013; KONG et al., 2010). As nanopartículas de quitosana podem ser preparadas pela incorporação de um poliânion como o tripolifosfato de sódio (TPP) em uma solução de quitosana sob agitação (CALVO et al., 1997; JONASSEN et al., 2012b; MOURA et al., 2009). Essas NPs demonstraram maior efeito antimicrobiano comparado a quitosana em escala micrométrica (DIVYA et al., 2017; LAOKULDILOK et al., 2017; MADUREIRA et al., 2015; PILON et al., 2015).

As propriedades antimicrobianas da quitosana devem-se à sua natureza catiônica, que permite a interação eletrostática e desestabilização da parede celular bacteriana ao interagir com os poliânions da parede celular (ácido teicóico em bactérias Gram-positivas e lipolissacarídeos (LPS) em bactérias Gram-negativas) e os fosfolipídios aniônicos da membrana citoplasmática, levando a instabilidade osmótica, ruptura da membrana e perda dos constituintes intracelulares. A quitosana também é capaz de sequestrar íons metálicos e perturbar a cadeia de transporte de elétrons. Uma vez dentro da célula, pode ligar-se ao DNA e inibir a replicação, causando a morte celular (RABEA et al., 2003; SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992).

Vários estudos relataram diferenças no efeito inibitório da quitosana contra bactérias Gram-positivas e Gram negativas (LAOKULDILOK et al., 2017; NO et al., 2002), enquanto alguns autores não observaram diferenças significativas (DIVYA et al., 2017; MADUREIRA et al., 2015; MARANGON et al., 2017). Os efeitos da quitosana são linhagem-dependente e vários fatores extrínsecos e intrínsecos podem afetar sua ação, como as características do microrganismo e da própria quitosana, tais como: grau de acetilação, massa molar, pH, capacidade de quelação, força iônica, temperatura e tempo de armazenamento, e, no caso de NPs, dependem do tamanho, carga e concentração (DIVYA et al., 2017; KONG et al., 2010; MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017).

3.3.2.2 Ramnolipídeo

Os ramnolipídeos (RL) são biosurfatantes que pertencem à classe de glicolipídeos; sua estrutura compreende uma ou duas moléculas de L-(+)-ramnose unidas por um ou dois β -hidróxi-ácidos de cadeia variável. São sintetizados e excretados ao meio extracelular por bactérias do gênero *Pseudomonas* como uma mistura de moléculas homólogas que diferem entre si pelo número de moléculas de ramnose de sua porção hidrofílica e pelo tamanho das cadeias de ácidos graxos que formam a porção hidrofóbica (LANG; WULLBRANDT, 1999). Os homólogos de maior predominância nas misturas são mono e di-ramnolipídeos, o primeiro formado por uma ramnose ligada a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico e, o segundo constituído por duas ramnosés ligadas a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (Figura 4). Podem ser obtidos a partir de bioprocessos utilizando como fonte de carbono substratos hidrofílicos ou hidrofóbicos que podem ser originados de resíduos agroindustriais. Esse biosurfatante apresenta propriedades como baixa citotoxicidade e biodegradabilidade, ampliando a vertente de aplicações em relação aos surfatantes sintéticos por serem compatíveis com o meio ambiente e sua produção ser sustentável (SINGH, P. et al., 2017).

Figura 4 – Exemplos de estrutura dos ramnolipídeo: Mono-ramnolipídeo (a) e Di-ramnolipídeo (b).

Fonte: Autoria própria.

Os ramnolipídeos têm demonstrado atividade antimicrobiana, antiadesiva e antibiofilme (KIM et al., 2015; SHAO et al., 2017; SILVA et al., 2017) e sua utilização na formulação de sistemas de liberação de fármacos estáveis como nanoemulsões e nanopartículas, incorporando bioativos hidrofóbicos para aplicação dérmica, tem sido descrita (BAI; MCCLEMENTS, 2016; MÜLLER et al., 2017). Nanopartículas de ramnolipídeo podem ser facilmente obtidas em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), em que ocorre a automontagem para formar nanopartículas *core-shell*

(MÜLLER et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017). Seu uso oferece um apelo original à substituição de nanopartículas sintetizadas a partir de materiais tóxicos e não biodegradáveis como a substituição de surfatantes sintéticos utilizados para estabilizar diferentes sistemas. O uso de biosurfatantes, além de substituir os surfatantes sintéticos também garante uma maior biocompatibilidade e estabilidade para o nanodimensionamento, devido à alta energia de adsorção da partícula, dessa forma são mais resistentes à coalescência e à floculação (KVÍTEK et al., 2008; VATANPARAST et al., 2018).

O modo de ação do ramnolipídeo ainda não é totalmente compreendido. Sugere-se que devido a sua natureza anfifílica, este pode ligar-se a membrana celular de diferentes microrganismos e formar complexos através da interação com fosfolipídios e proteínas da membrana, causando aumento da permeabilidade da membrana, além de alterações na organização e estabilidade da bicamada lipídica que afetam diretamente a integridade celular (LOTFABAD; SHAHCHERAGHI; SHOORAJ, 2013; SHAO et al., 2017; SOTIROVA et al., 2008).

Do mesmo modo que a quitosana, o ramnolipídeo apresenta origem biológica e, vários fatores afetam suas propriedades dependendo da variabilidade estrutural como o tipo de ramnolipídeo e distribuição de moléculas homólogas presentes na mistura que dependem da linhagem utilizada, fonte de carbono, processo de extração, entre outros (CHONG; LI, 2017; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010; SHAO et al., 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

Todas as propriedades acima citadas, aliadas a versatilidade química e ausência de citotoxicidade, fazem com que a quitosana e o ramnolipídeo sejam considerados plataformas de origem renovável “verde” para obtenção de insumos a diversas indústrias como a alimentícia, cosmética e farmacêutica (NITSCHKE; SILVA, 2018). As características do ramnolipídeo podem ser sinergicamente combinadas com as funcionalidades de polímeros como a quitosana através de interações eletrostáticas na formação de nanopartículas. Portanto, o objetivo principal deste trabalho está em utilizar nanomateriais melhorados com abordagem sinérgica para ultrapassar as barreiras da infecção bacteriana (HUW; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016).

Nesse sentido, a formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo pode ser favorável afetando diferentes alvos concomitantemente, seja em células livres ou nos biofilmes (Figura 5).

Figura 5 – Esquema das possíveis estratégias antibiofilme utilizando nanopartículas obtidas pela combinação quitosana/ramnolipídeo.

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O surfatante utilizado neste trabalho foi o ramnolipídeo (RL) comercial (*Rhamnolipid Inc.*) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* com 99% de pureza em solução aquosa 25% (v/v), contendo uma mistura de 73,2% de mono e 26,8% de di-ramnolipídeo. O tripolifosfato de sódio (TPP) utilizado foi da *Labsynth* Produtos para Laboratório AS, de grau analítico. A quitosana e as nanopartículas foram obtidas no Grupo de Biopolímeros e Biomateriais sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, co-orientadora deste estudo.

4.2 Obtenção da quitosana

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula do gênero *Doryteuthis* spp. cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda. (Cananéia – SP) e passou por duas etapas básicas de preparo: desproteinização e desacetilação, repetidas duas vezes para garantir maior eficiência (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2009).

Primeiramente, os gládios foram lavados para eliminar resíduos, secos, triturados e separados com peneira (60 mesh) obtendo-se partículas com diâmetro menor que 0,25 mm. Em seguida, foi feita a desproteinização, para obter a β -quitina, pela adição de uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹ (na razão 1,0 g de gládio de lula/10 mL de NaOH) com agitação e temperatura controlada a 80 °C por 1 h. A solução foi lavada com água deionizada com agitação constante, até que se alcançasse a neutralidade e o sólido obtido foi seco em estufa a 40 °C.

Para obter-se a quitosana a partir da β -quitina foi feito um tratamento alcalino utilizando-se uma solução de NaOH 40% (massa/massa) na proporção 1,0 g de β -quitina/20 mL de solução. O sistema foi mantido à temperatura de 80 °C com agitação constante por 3 h e em atmosfera de N₂ e, novamente, o material obtido foi lavado até a neutralidade e seco em estufa a 40 °C.

4.3 Despolimerização da quitosana

A quitosana de baixa massa molar foi obtida por degradação oxidativa com NaNO₂ a temperatura ambiente (MAO et al., 2004). Primeiramente, foi preparada uma solução de 8,0 g de quitosana em ácido acético 0,5% (massa/massa). Adicionou-se 47 mL de solução de NaNO₂ 0,1 mol L⁻¹ à solução de quitosana sob agitação constante durante 3 h, a

temperatura ambiente. A mistura foi ajustada com NaOH 1 mol L⁻¹ até pH 8,0 para precipitar a quitosana. Em seguida, o precipitado foi recuperado por centrifugação (centrífuga refrigerada da Hitachi, modelo himac CR 20B2) a 2500 rpm durante 10 min, a 25 °C. A solução foi lavada, centrifugada novamente até a neutralidade e liofilizada em um equipamento Liofilizador modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK) para seu armazenamento.

4.4 Caracterização da quitosana

A quitosana foi caracterizada, antes e após o processo de despolimerização, através da determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (LAVERTU et al., 2003; RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993) e da determinação da massa molar média por viscosimetria capilar (RINAUDO, 2006).

4.4.1 Determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica

O grau de acetilação (GA) da quitosana foi determinado por titulação condutimétrica conforme descrito por Raymond; Morin e Marchessault (1993). A amostra de quitosana (250 mg), previamente seca em estufa a 40 °C, foi solubilizada em 50 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹ e mantida sob agitação por 18 h. Essa solução foi diluída para 250 mL com água deionizada. Alíquotas de 50 mL da solução resultante foram tituladas com uma solução de NaOH 0,1041 mol L⁻¹ padronizada com ácido oxálico 0,0499 mol L⁻¹ para a quitosana e com uma solução de NaOH 0,09798 mol L⁻¹ padronizada com ácido oxálico 0,0499 mol L⁻¹ para a quitosana despolimerizada. As variações de condutância durante a titulação foram medidas em um condutivímetro Gehaka, modelo CG-2000. As titulações foram feitas em triplicata e a 25 °C.

4.4.2 Determinação do grau médio de acetilação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Para determinação do GA da quitosana por RMN ¹H foi utilizado o método proposto e validado por Lavertu et al. (2003). Inicialmente, 10 mg de cada amostra de quitosana foram diluídas em 1,96 mL de D₂O e 0,04 mL de DCl, agitadas até completa solubilização do polímero e, então, parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado. Os espectros de RMN ¹H das amostras de quitosana foram então obtidos no espectrômetro com transformada de Fourier da marca Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded (equipamento da Central de Análises Químicas Instrumentais do

IQSC/USP) a 70 °C, acumulando 64 varreduras. Após o tubo com a amostra ser inserido no magneto e sua temperatura estabilizar, utilizou-se uma sequência consistindo de um atraso de 6 s, um pulso de 90° de 11 ms e um tempo de aquisição de 2 s. Durante o intervalo de 6 s antes da aplicação do pulso de 90° foi feita a supressão do sinal do solvente por saturação usando um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente.

4.4.3 Determinação da massa molar média por viscosimetria

A massa molar média da quitosana e da quitosana despolimerizada foi determinada por viscosimetria (RINAUDO, 2006). Foram preparadas soluções padrões de quitosana com 19 mg para a quitosana e 250 mg para a quitosana despolimerizada, previamente secas a 40 °C, em 25 mL de solução de ácido acético 0,6 mol L⁻¹ sob agitação constante por 24 h. Em seguida, adicionou-se 25 mL de acetato de sódio 0,4 mol L⁻¹, mantendo-se as soluções resultantes, denominadas de soluções estoque, em agitação constante por mais 24 h. As soluções foram filtradas sob pressão positiva em membrana de nitrocelulose com poros de diâmetro de 0,8 µm (Unifil).

Um tampão de ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ a pH 4,5 foi preparado para ser empregado como branco e para as sucessivas diluições das soluções estoque, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante. Alíquotas de 15 mL da solução tampão e das amostras de quitosana foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde a 25 °C. Foram feitas 3 determinações independentes de valores de tempo de escoamento para o tampão e para as soluções de diferentes concentrações, sendo adicionado sucessivamente 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL do tampão para as diluições das soluções de quitosana e quitosana despolimerizada. As medidas foram feitas em um viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT), equipamento do Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho. Utilizando-se as médias obtidas em cada determinação, a viscosidade específica de cada solução foi determinada através da equação 1:

$$\eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0} \quad (1)$$

sendo, η_{sp} viscosidade específica, t tempo médio de escoamento da amostra e t_0 tempo médio de escoamento do solvente.

Para obter a massa molar da quitosana, além da viscosidade específica, é necessária a determinação da viscosidade reduzida e da viscosidade intrínseca. A viscosidade reduzida é dada por meio da equação 2:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (2)$$

na qual, η_{red} é a viscosidade reduzida (mL g^{-1}), η_{sp} é a viscosidade específica e C a concentração da solução (g mL^{-1}). Já, a viscosidade intrínseca é determinada pela extrapolação da diluição infinita da curva de viscosidade reduzida versus a concentração da solução. A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink (equação 3) e assim, pode-se calcular a massa molar média viscosimétrica da quitosana.

$$[\eta] = k \bar{M}_v^\alpha \quad (3)$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, $\bar{M}$ é a massa molar média, k e α são constantes empíricas que dependem da natureza do polímero, do solvente e da temperatura. Os valores dos parâmetros k e α utilizados foram 0,078 e 0,797 para a quitosana e 0,076 e 0,797 para a quitosana despolimerizada, concordantemente com o grau de acetilação pré-estabelecido (BRUGNEROTTO et al., 2001; RINAUDO, 2006).

4.5 Preparo das nanopartículas

As nanopartículas de quitosana (NPs-Q) e quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) foram preparadas de acordo com o método de gelificação iônica adaptado de Calvo et al. (1997). Para otimização do processo, vários parâmetros foram investigados, que incluíram: concentração da solução de quitosana, ramnolipídeo, TPP e ácido acético, temperatura de preparo, pH da solução de quitosana, proporção quitosana/ramnolipídeo em relação ao TPP e velocidade de agitação (FAN et al., 2012).

O procedimento otimizado utilizado foi: uma solução de quitosana despolimerizada foi solubilizada em ácido acético 0,5% (massa/massa) na concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e seu pH foi ajustado até aproximadamente 5,0 com uma solução de NaOH 20% (massa/massa). Após o ajuste do pH, a solução foi filtrada em filtro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore®). Em 10 mL dessa solução foi adicionado 10 mL de solução aquosa de ramnolipídeo $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, previamente filtrada em filtro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ sob agitação constante durante 24 h. Em seguida, foi preparada uma solução aquosa de TPP $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e filtrada em filtro de

0,22 μm . A solução de quitosana/ramnolípídeo foi aquecida até 60 °C por 10 min sob agitação constante, seguido de transferência para um banho de gelo, gotejando-se 3 mL da solução de TPP com agitação constante. As NPs-Q foram preparadas da mesma maneira que as NPs-Q/RL utilizando água deionizada ao invés de ramnolípídeo. As dispersões resultantes foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 min a 4 °C para remover os compostos que não resultaram na formação de nanopartículas. As partículas foram ressuspensas em ácido acético pH 4,0 e armazenadas a 4 °C.

4.6 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas foram caracterizadas pela análise por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), potencial zeta, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), quantificação de quitosana e ramnolípídeo presentes e liberação *in vitro* da quitosana e do ramnolípídeo. Também foram feitos testes de estabilidade das nanopartículas em função do tempo e pH através de medidas de tamanho por DLS e carga por potencial zeta. A FTIR foi feita no Centro de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP, com auxílio do técnico de laboratório Aldimar T. J. Constante. As análises de potencial zeta, a distribuição de tamanho das partículas por DLS, assim como seu índice de polidispersividade (PDI), os testes de estabilidade e a análise da morfologia das partículas por AFM foram feitos no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do IFSC/USP, pela aluna Cristiane Casonato Melo, sob orientação do Prof. Dr. Valtencir Zucolotto. A análise morfológica das nanopartículas por TEM e a Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foram feitas no *Interdisciplinary Nanoscience Center* (iNANO) da *Aarhus University*, Aarhus, Dinamarca, sob orientação da Profa. Dra. Rikke Louise Meyer.

4.6.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Para obtenção dos espectros foram preparados filmes a partir de uma solução de 25 mg de quitosana despolimerizada em HAc 0,5% (massa/massa) em formas de teflon® e secos a temperatura ambiente. O ramnolípídeo foi gotejado em uma placa de silício e as nanopartículas foram liofilizadas e prensadas em pastilhas de KBr. Após o preparo, as amostras foram colocadas em dessecador na presença de NaOH sólido para remoção de água residual. Os espectros foram obtidos em um Espectrofotômetro Shimadzu IR Affinity-1, com 32 scans, no intervalo de 400 – 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.2 Análise do potencial Zeta

Para a análise do potencial Zeta, as nanopartículas foram preparadas como descrito no item 4.5 e as medidas foram feitas logo após o preparo, em um equipamento Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments), cubeta DTS1070, a 25 °C com no mínimo três determinações independentes.

4.6.3 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As nanopartículas foram preparadas conforme descrito no item 4.5 e a análise foi determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando Zetasizer Nano ZS-90 (Malvern Instruments), cubeta DTS0012, a 25 °C. Foi escolhido o Z-average como medida de tamanho, pois é a medida mais estável da técnica e é a requerida para medidas de controle de qualidade. Essa análise foi feita em triplicata.

4.6.4 Testes de estabilidade das nanopartículas

4.6.4.1 Tamanho e potencial zeta em função do pH

As NPs-Q e NPs-Q/RL foram analisadas quanto ao efeito do pH no tamanho e na carga. Para isso, foram feitas variações do pH utilizando soluções de HCl 0,5 mol L⁻¹ e de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e as mudanças no pH (de 1 a 10) foram medidas utilizando-se o MPT-2 Multi-Purpose Titrator, Malvern, acoplado ao Zetasizer Nano ZS-90.

4.6.4.2 Tamanho e potencial zeta em função do tempo

A estabilidade das NPs-Q/RL também foi avaliada em função do tempo de armazenamento em geladeira a 4 °C. Para isso, uma alíquota era retirada, diluída 10x em ácido acético pH 4,0 e as medidas de tamanho por DLS e carga por potencial zeta eram feitas em um intervalo de tempo. Esse experimento teve duração de 33 dias, sendo feito, inicialmente, medidas em dias consecutivos e, depois, em dias alternados.

4.6.5 Análise por microscopia de força atômica (AFM)

A solução contendo as nanopartículas (item 4.5) foi diluída 100x e adicionada em substrato de mica por 2 min, seguido de lavagem e secagem em câmara de vácuo. As imagens de topografia para estudo de morfologia foram feitas utilizando-se microscópio de força atômica FlexAFM (Nanosurf, Suíça) em câmara a pressão atmosférica ambiente, temperatura de 23 °C e umidade de 30%. Todas as medidas foram feitas com um cantiléver de silício operando no modo de contato intermitente, com frequência de ressonância de 200-300 kHz e

constante de força de 40 N m^{-1} . O software livre Gwyddion foi utilizado para tratamento e análise das imagens.

4.6.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia das nanopartículas também foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para isso, as amostras foram coradas negativamente com acetato de uranila 2% (massa/massa) e examinadas usando um microscópio eletrônico Tecnai G2 Spirit BioTWIN operado em 120kV.

4.6.7 Quantificação do ramnolipídeo nas nanopartículas

A quantificação do ramnolipídeo adicionado nas nanopartículas foi feita através da medida da concentração de ramnose, pela quantificação da 6-deoxihexose utilizando o método descrito por Chandrasekaran e Bemiller (1980). Para isso, 300 μL de sobrenadante do centrifugado de nanopartículas foram adicionados em um tubo contendo 2,7 mL de uma solução de orcinol 0,19% (massa/v) (em H_2SO_4 53% (v/v)) seguido de incubação por 30 min a 80°C . As amostras foram retiradas do banho, resfriadas em temperatura ambiente durante 15 min e as medidas de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro de UV-visível (HITACHI, U-300), em 421 nm. A concentração do ramnolipídeo foi determinada comparando-se com as medidas obtidas para uma curva padrão de ramnose, com concentrações entre 0-100 mg L^{-1} . Para conversão da ramnose em ramnolipídeo foi construída uma curva de padronização de ramnolipídeo, com concentrações entre 0-100 mg L^{-1} e através da relação ramnose/ramnolipídeo foi possível determinar o fator de conversão. Esse fator foi utilizado para determinar a real concentração de ramnolipídeo nas nanopartículas multiplicando-se o valor encontrado para a concentração de ramnose pelo fator de conversão. A concentração de ramnolipídeo nas nanopartículas foi determinada em triplicata.

4.6.8 Quantificação da quitosana nas nanopartículas

Para a quantificação da quitosana adicionada nas nanopartículas determinou-se a concentração dos grupamentos amino, através da quantificação da unidade 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose utilizando-se *p*-dimetilaminobenzaldeído (*p*-DAB 1%) (WANG; REN; ZHANG, 1993) em 25 mL de HAc glacial, diluído para 50 mL com tampão ácido acético/acetato de sódio pH 4,1. Para isso, 1,0 mL de sobrenadante do centrifugado de nanopartículas foi adicionado em um tubo contendo 2,0 mL de uma solução de *p*-DAB 1%, seguido de incubação por 30 min em ebulição. As amostras foram retiradas do banho, resfriadas em água e as medidas de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro de

UV-visível (HITACHI, U-300), em 415 nm. A concentração da quitosana nas nanopartículas foi determinada comparando-se com as medidas obtidas para uma curva de padronização de quitosana despolimerizada, com concentrações entre 5-252 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A análise foi feita com no mínimo três determinações independentes.

4.6.9 Curva de liberação *in vitro*

Para investigar se a quitosana e o ramnolipídeo eram liberados das nanopartículas e avaliar sua estabilidade na presença de um meio na mesma faixa de acidez da pele (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH, 1993), 4 mL das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) foram depositados em membranas de diálise de celulose (1000 Da). As amostras foram dialisadas em 50 mL de tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,5 e incubadas em um banho termostático a 37 °C. Em intervalos de tempo diferentes, 2 mL foram retirados das membranas e substituídos por 2 mL de tampão. A concentração de quitosana e ramnolipídeo liberada no meio foi determinada medindo-se a absorbância em um espectrofotômetro de UV-visível (HITACHI, U-300), em 415 nm para quitosana e 421 nm para o ramnolipídeo e comparando-se com as medidas obtidas para suas curvas de padronização determinadas previamente nos ensaios de quantificação (subitens 4.6.7 e 4.6.8) (CHANDRASEKARAN; BEMILLER; 1980; WANG; REN; ZHANG, 1993). A análise foi feita com no mínimo três determinações independentes.

4.7 Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana e antibiofilme foram feitos no *Biofilm Group* do *Interdisciplinary Nanoscience Center* (iNANO) da *Aarhus University*, Aarhus, Dinamarca, sob orientação da Profa. Dra. Rikke Louise Meyer. As representações esquemáticas dos procedimentos utilizados estão apresentadas nas Figuras 6, 7 e 8 (itens 4.7.3.2, 4.7.4.1 e 4.7.4.2).

4.7.1 Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas foram obtidas de uma coleção de culturas padrão (ATCC- *American Type Culture Collection*) e da coleção de microrganismos e cultura celular do Instituto Alemão Leibniz (DSMZ). As bactérias empregadas como modelo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (DSM 1104), *S. epidermidis* (DSM 20044) e *Klebsiella oxytoca* (DSM 5175), uma vez que, são os tipos mais comuns associados a infecções hospitalares, além de formarem biofilmes.

As linhagens foram mantidas em caldo triptona de soja (TSB) com adição de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura para *S. aureus* DSM 1104 e *S. epidermidis* e, em TSB para *S. aureus* ATCC 29213 e *K. oxytoca* acrescidos de 30% de glicerol e armazenadas em freezer a -80 °C. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram feitos a partir das culturas estoque armazenadas a -80 °C.

4.7.2 Padronização do inóculo

Previamente a utilização nos ensaios, as linhagens de *S. aureus* DSM 1104 e *S. epidermidis* foram semeadas em placas de ágar triptona de soja (TSA) com adição de 3 g L⁻¹ de extrato de levedura e as linhagens de *S. aureus* ATCC 29213 e *K. oxytoca* foram inoculadas em TSA a partir do estoque a -80 °C, incubadas por 24 h a 37 °C e armazenadas em geladeira por no máximo 2 semanas (4 °C). A partir de colônias isoladas os inóculos foram preparados em caldo Müeller Hinton (MHB) pH 5,5 para *Staphylococci* e em TSB pH 5,5 para *K. oxytoca* e incubados em frascos Erlenmeyer por 24 h a 37 °C com agitação orbital a 180 rpm. O inóculo foi diluído em MHB de modo a obter-se uma densidade óptica (DO) em 600 nm de 0,5 para *Staphylococcus* spp. ou em TSB (DO₆₀₀ = 0,3) para *K. oxytoca*, utilizando como padrão aproximadamente 5 x 10⁸ unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹). Após o ajuste das suspensões ao padrão 0,5 de McFarland estas foram diluídas 1:100 em MHB ou TSB para obter-se uma concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹ segundo metodologia estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

4.7.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do ramnolipídeo, da quitosana e das nanopartículas de quitosana e quitosana/ramnolipídeo frente às linhagens bacterianas foram feitos utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com a norma do CLSI (2012).

Todos os testes foram comparados com os controles positivos de crescimento (cultura inoculada sem tratamento) assim como com os controles negativos (meio sem inóculo). A atividade antimicrobiana foi avaliada através da CIM e da concentração bactericida mínima (CBM) para cada linhagem bacteriana e antimicrobiano testado. Os resultados foram expressos como a moda (definida estatisticamente como a observação de maior frequência) de pelo menos três repetições independentes.

4.7.3.1 Preparo das soluções estoque

As soluções estoque de quitosana despolimerizada (Q) e ramnolipídeo (RL) foram preparadas, inicialmente na concentração de $1856 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2400 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para isso, a quitosana despolimerizada foi pesada, solubilizada em HAc 0,5% e seu pH foi ajustado até aproximadamente 5,0 com uma solução de NaOH 20% (massa/massa). O ramnolipídeo foi pesado e solubilizado em água. Após a solubilização, as soluções foram filtradas em filtro $0,45 \mu\text{m}$ para garantir a esterilidade. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ das soluções foram adicionadas ao caldo MHB ou TSB pH 5,5 para obter a concentração de $928 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a quitosana e $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ramnolipídeo. Cada solução estoque foi distribuída em placas de microdiluição de 96 cavidades e diluída sucessivamente (2x).

Do mesmo modo que as soluções de quitosana e ramnolipídeo, foram preparadas soluções estoque a partir das nanopartículas de quitosana (NPs-Q) e de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) na concentração inicial de $184 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as NPs-Q e $464/600 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração de quitosana/ramnolipídeo) para as NPs-Q/RL procedendo a diluição sucessiva.

4.7.3.2 Determinação da CIM

As colunas 2-10 da placa de microdiluição de 96 poços foram preenchidas com $100 \mu\text{L}$ de MHB ou TSB pH 5,5, exceto a coluna 11 (controle positivo) e a coluna 12 (controle negativo) que foram preenchidas com $180 \mu\text{L}$ e $200 \mu\text{L}$, respectivamente (Figura 6).

Em seguida, $200 \mu\text{L}$ de cada amostra contendo a solução estoque foram adicionados nas 8 cavidades da primeira coluna (1) da placa. Após homogeneização com micropipeta, $100 \mu\text{L}$ da coluna 1 foram transferidos para a coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna 10. A coluna 11 foi utilizada como controle positivo de crescimento contendo o meio de cultura e o inóculo bacteriano. A coluna 12 foi utilizada como controle negativo contendo de A-D apenas meio e de E-H o caldo de cultura e cada amostra na primeira concentração para comprovação da esterilidade.

A todas as cavidades, exceto à coluna 12, foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de inóculo de cada linhagem bacteriana padronizado de modo a obter uma concentração final de 10^5 UFC mL^{-1} em cada poço da microplaca. Após a adição do inóculo bacteriano, acrescentou-se $80 \mu\text{L}$ em todas as cavidades, exceto a coluna 12, para obter-se um volume final de $200 \mu\text{L}$. A diluição da solução com o meio de cultura na primeira coluna resultou nas primeiras concentrações estabelecidas de $464 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a quitosana, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o ramnolipídeo, $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as nanopartículas de quitosana e $232/300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as

nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo. A placa de microdiluição foi fechada, armazenada em saco *zip-lock* para evitar evaporação e incubada a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação foi feita uma avaliação visual do crescimento microbiano e nas cavidades em que não foi constatado o crescimento foram feitos os testes de CBM conforme descrito no item 4.7.3.3. Para confirmação da CIM observada na avaliação visual foi feita leitura da DO em leitora de microplacas da Biotek (Modelo PowerWave™ XS2) em 600 nm. A CIM foi determinada como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento das bactérias em relação ao controle negativo.

Fonte: Autoria própria.

4.7.3.3 Determinação da CBM

A partir das concentrações de Q, RL, NPs-Q e NPs-Q/RL que não apresentaram crescimento visual no teste de CIM foi possível analisar a CBM. Uma alíquota de 10 µL das cavidades em que não houve crescimento visual microbiano foi transferida para placas contendo ágar Müller Hinton (MHA) ou TSA e incubadas a 37 °C por 24 h.

A menor concentração que não apresentou crescimento microbiano nas placas foi designada como a CBM. Nos casos em que todas as concentrações testadas apresentaram crescimento bacteriano concluiu-se que o efeito dos antimicrobianos foi bacteriostático para a linhagem testada.

4.7.3.4 Interação nanopartícula-bactéria

A interação dos antimicrobianos com as células planctônicas de *S. aureus* ATCC 29213 foi visualizada utilizando-se marcadores fluorescentes e microscopia confocal. As amostras foram preparadas em PBS pH 5,5 nas concentrações de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para RL, 232 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quitosana, 92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q e 116/150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q/RL em uma microplaca de 96 cavidades. Vermelho do Nilo (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e calcofluor (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich) foram adicionados como marcadores fluorescentes para visualizar o ramnolípídeo e a quitosana, respectivamente. A partir de colônias isoladas (quatro repetições biológicas), os inóculos de *S. aureus* foram preparados em MHB pH 5,5 e incubados em frascos Erlenmeyer por 24 h a 37 °C com agitação orbital a 180 rpm. Para o preparo das suspensões padronizadas, 1 mL dos inóculos de 24 h foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento celular suspenso em 1 mL de PBS pH 5,5 e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi diluído em PBS de modo a obter uma concentração final de 5×10^8 UFC mL^{-1} na microplaca contendo as amostras e os marcadores, utilizando como padrão a escala 0,5 de McFarland ($\text{DO}_{600} = 0,5$). A visualização por microscopia foi feita após 4 h de incubação da microplaca a 37 °C e ao abrigo da luz. A associação do ramnolípídeo e da quitosana com *S. aureus* foi visualizada em seções ópticas de 0,8 μm pelo Microscópio confocal (Zeiss LSM700 com uma objetiva de 63x Plano-apocromática (NA 1,4)). A fluorescência foi capturada em 405 nm de excitação e <560 nm de emissão para o calcofluor e 555 nm de excitação e 560-700 nm de emissão para o vermelho do Nilo. As células bacterianas não foram coradas devido à sobreposição do espectro de outros marcadores fluorescentes com o espectro do calcofluor e vermelho do Nilo.

4.7.3.5 Ensaio de aglomeração celular

A interação da quitosana com a superfície bacteriana causou a agregação das células. Por isso, o efeito dos antimicrobianos na agregação bacteriana ao longo do tempo foi avaliado. A agregação foi observada por uma redução na DO_{600} resultante da decantação celular. A agregação foi monitorada utilizando *S. aureus* ATCC 29213 como modelo, na presença e ausência dos compostos antimicrobianos. As amostras foram preparadas em MHB

pH 5,5 nas concentrações de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ para RL, $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Q, $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q e $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q/RL. Da mesma maneira que descrito no item acima, os inóculos de 24 h de *S. aureus* foram diluídos em MHB para obter uma DO_{600} final de 0,5. As medidas de absorbância foram feitas utilizando-se cubetas de plástico de 1,5 mL (BRAND®) em um espectrofotômetro de UV-visível (IRMECO, U2020) em 600 nm sob condições estacionárias em intervalos periódicos durante 40 min. O meio sem inóculo foi usado como branco, a cultura inoculada sem tratamento como controle positivo e as amostras diluídas nas mesmas concentrações em MHB sem inóculo foram utilizadas como controle negativo. As mudanças na DO_{600} ($\text{DO} = \text{DO} / \text{DO}_0$) foram plotadas em função do tempo. Onde DO_0 é a densidade óptica das células de *S. aureus* a 600 nm imediatamente após a mistura com os compostos e DO é a densidade óptica em cada ponto de tempo.

4.7.4 Ensaio de atividade antibiofilme

4.7.4.1 Formação e quantificação dos biofilmes

Para o estabelecimento dos biofilmes, alíquotas de 160 μL das suspensões bacterianas padronizadas em caldo MHB ou TSB ($\text{DO}_{600} = 0,5$ para *Staphylococcus* spp. e $\text{DO}_{600} = 0,3$ para *K. oxytoca*) foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 cavidades com tampas adaptadas para formação de biofilme (Nunc-TSP, Thermo Scientific), inserindo-se as tampas contendo o dispositivo de *Calgary* (*peg-lids*) nessa suspensão por 2 h a temperatura ambiente (Figura 7). As tampas foram então transferidas para uma nova placa de microdiluição contendo 160 μL / poço de meio de cultura e incubada a 37 °C por 48 h (trocando-se o meio de cultura após 24 h de incubação) para permitir que as bactérias aderidas formassem um biofilme maduro, sendo feita a leitura da densidade óptica das microplacas em leitora de microplacas da Biotek (Modelo PowerWave™ XS2) em 600 nm. Após a formação do biofilme, as tampas foram removidas do meio e secas por 30 min a 25 °C em cabine de segurança biológica. Em seguida, as tampas foram inseridas em uma microplaca contendo 160 μL / poço de solução de Gram-safranina 10% em EtOH (Sigma-Aldrich) por 10 min. As tampas foram lavadas duas vezes inserindo-as gentilmente por 30 s em placas de microdiluição contendo 160 μL / poço de água deionizada. Posteriormente, as tampas foram secas novamente por 30 min a 25 °C em cabine de segurança biológica e procedeu-se a extração do corante em placas de microdiluição contendo 160 μL / poço de HAc 33% (HAc glacial diluído em água MilliQ) por 30 min a 25 °C. Após extração do corante, foi feita a leitura da densidade óptica das microplacas em leitora de microplacas da Biotek (Modelo

PowerWave™ XS2) em 530 nm. Os resultados foram comparados com controle negativo sem inóculo (OMMEN; ZOBECK; MEYER, 2017).

Figura 7 – Esquema representativo do procedimento experimental de formação e quantificação do biofilme.

Fonte: Autoria própria.

4.7.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIBM) e da concentração de erradicação mínima do biofilme (CEBM)

Os biofilmes foram obtidos conforme descrito no item 4.7.4.1. As tampas foram então transferidas para nova microplaca contendo 200 µL / poço dos antimicrobianos em diferentes concentrações diluídos em MHB ou TSB e incubadas por 24 h a 37 °C. As tampas contendo os biofilmes tratados com os antimicrobianos foram retiradas, foi feita a avaliação visual e as cavidades em que não foi constatado o crescimento foram definidas como a CIBM. Para confirmação da CIBM foi feito o teste de contagem das células viáveis. Para isso, as tampas foram lavadas (2x) em microplacas contendo 200 µL / poço de PBS, transferidas para uma nova microplaca contendo 200 µL / poço de MHB ou TSB (placa de recuperação) e sonificadas durante 10 min em ultrassom para liberação das células presentes na tampa para o meio. 20 µL de cada diluição dos antimicrobianos que não apresentaram crescimento visual após 24 h de incubação foram transferidos para uma microplaca contendo 180 µL / poço de PBS, procedendo-se diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-10} . Em seguida gotas de 20 µL de cada diluição foram depositadas em placas de MHA ou TSA e incubadas a 37 °C por 24 h. A contagem de colônias ocorreu nas diluições que possuíam de 5 a 50 UFC como descrito no

método da gota (MILES; MISRA; IRWIN, 1938). O número de células viáveis foi determinado pela média do número de colônias, multiplicado pela diluição e dividido pelo volume da gota depositada nas placas (0,02 mL), obtendo-se assim o número de UFC mL⁻¹. Assumiu-se que a presença de bactérias viáveis (seja no *peg-lid* ou na solução) resultaria em crescimento planctônico, portanto, a placa de recuperação foi incubada por 72 h a 37 °C sendo feita a leitura em leitora de microplacas em 600 nm (Figura 8). A CEBM foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano em que não foi observado crescimento após 72 h na placa de recuperação (NIELSEN et al., 2017).

Figura 8 – Esquema representativo do procedimento experimental da determinação da concentração inibitória mínima e concentração de erradicação mínima do biofilme.

Fonte: Autoria própria.

4.7.4.3 Visualização das células viáveis no biofilme

O efeito antibacteriano da quitosana, do RL e das NPs-Q e NPs-Q/RL em biofilmes de *S. aureus* ATCC 29213 foi visualizado através de coloração *Live/Dead* (Molecular 184 Propes[®], Life Technologies) utilizando-se dois marcadores: o corante vermelho SYTO 60 e o corante verde TOTO-1. O TOTO-1 penetra apenas em bactérias com a integridade da membrana celular danificada (não-viáveis). Por outro lado, o SYTO 60 marca todas as bactérias presentes na amostra, viáveis e não-viáveis, mas não é capaz de permear a membrana. Desse modo, quando há uma mistura apropriada dos dois marcadores, as bactérias que apresentam membrana celular intacta (viáveis) são marcadas em vermelho, enquanto as

células que apresentam danos na membrana celular (não-viáveis) são marcadas em verde (OKSHEVSKY; MEYER, 2014).

Para isso, os inóculos de *S. aureus* foram preparados a partir de colônias isoladas (4 repetições biológicas) como descrito no item 4.7.2 e alíquotas de 160 μL das suspensões bacterianas padronizadas em caldo MHB foram transferidas para uma microplaca de microscopia de 96 poços (Ibidi catalogue #89621) e incubadas por 2 h a temperatura ambiente. A suspensão bacteriana foi cuidadosamente removida, substituída por 160 μL de MHB e incubada a 37 °C por 48 h (trocando-se o meio de cultura após 24 h de incubação). Após 48 h de incubação, o sobrenadante foi removido e substituído por 200 μL dos antimicrobianos preparados em MHB nas concentrações 116 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quitosana, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para RL, 92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q e 116/150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para NPs-Q/RL, enquanto os controles de crescimento foram preenchidos com MHB. As placas de microscopia foram então incubadas a 37 °C durante 24 h. Após 24 h, o sobrenadante foi substituído por 100 μL de PBS contendo 10 μM de SYTO 60 e 1 μM TOTO-1 e visualizado em microscópio confocal (Zeiss LSM700, objetiva Plan-Apochromat de 40x (NA 1,4) e excitação a 488 e 639 nm) para observação das células viáveis e não-viáveis presentes nos biofilmes de *S. aureus*.

4.8 Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram feitos no Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações – IQSC/USP, pela aluna Ma Hui Ling, sob orientação do Prof. Dr. Emanuel Carrilho.

Para os ensaios foi utilizada a linhagem celular HUVEC (CRL-2873TM; ATCC[®], US), células endoteliais de veia umbilical humana. Essa linhagem cresce aderida, devido a sua morfologia, em garrafas de poliestireno contendo meio de cultura *Rosewell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% v/v de solução de antibióticos, penicilina 10000 U.I. mL^{-1} e estreptomicina 10 mg mL^{-1} . As células foram incubadas a 37 °C, em estufa com 5% de CO_2 (FRESHNEY, 2010). Os repiques foram feitos de 1 a 3 vezes por semana e todas as manipulações celulares foram feitas em condições assépticas, em cabine de segurança biológica, com materiais esterilizados, a fim de se evitar contaminação.

4.8.1 Determinação da viabilidade e concentração celular

Para a determinação da viabilidade e concentração celular foi utilizado o método de contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante (FRESHNEY, 2010). Neste teste o corante trypan blue é incorporado pelas células mortas devido ao rompimento da integridade da membrana celular. Para isso, o meio de cultura contido nas garrafas foi removido e uma solução de PBS foi utilizada para retirada do meio de cultura residual. Após lavagem das garrafas com PBS, foi adicionada solução de Tripsina-EDTA 0,02%, para desprender as células da garrafa. Após 5 min, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1000 rpm por 1 min, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em meio de cultura. Uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi retirada e adicionada a 400 µL de PBS e 500 µL de solução 0,4% de trypan blue. Essa mistura foi colocada na câmara de Neubauer, sendo as células vivas e as mortas contadas com auxílio de um microscópio óptico e a porcentagem de viabilidade foi calculada conforme equação 4:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100 \quad (4)$$

A concentração de células no meio de cultura utilizada para os ensaios de citotoxicidade em microplacas de 96 poços foi de 1×10^5 células mL⁻¹. Para isso, foram distribuídos 100 µL da suspensão celular nas cavidades das placas e incubou-se por 24 h em estufa, a 37 °C e 5% de CO₂.

4.8.2 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas nas concentrações de 232 µg mL⁻¹ para quitosana, 150 µg mL⁻¹ para RL, e 232/300 µg mL⁻¹ para NPs-Q/RL. Essas concentrações foram determinadas levando-se em consideração os ensaios de quantificação (itens 4.6.7 e 4.6.8) após a formação das nanopartículas. Para isso, as amostras foram diluídas diretamente no meio de cultura RPMI-1640 e foram filtradas em filtro de 0,45 µm (Millipore®) para esterilização.

4.8.3 Ensaio de citotoxicidade celular

Para o ensaio de citotoxicidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de reduzir o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazan, de coloração roxa

(MOSMANN, 1983). Às microplacas foram distribuídos 100 µL da solução celular por cavidade e as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂, conforme item 4.8.1. Após esse período, o sobrenadante foi removido por sucção e adicionou-se 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,2 µL de cada amostra preparada em 0, 100, 150, 175, 187,5 e 193,8 µL de meio de cultura, respectivamente para obter as concentrações desejadas conforme item 4.8.2, em quadruplicata. Para o controle negativo foi utilizado meio sem tratamento. As microplacas foram incubadas nas mesmas condições por 24 h. Após 24 h as amostras foram removidas por aspiração e as cavidades foram lavadas 3x com 200 µL de tampão PBS. Em seguida, adicionou-se 50 µL de uma solução de MTT (1 mg mL⁻¹) em meio e as placas foram incubadas novamente nas mesmas condições por 3 h.

Após esse período, o sobrenadante foi removido por aspiração, adicionou-se 50 µL de etanol para solubilizar os cristais de formazan e 150 µL de uma mistura PBS e álcool isopropílico 50% (v/v). A leitura da absorbância foi determinada em leitora de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific) em 570 nm. O índice de sobrevivência celular foi calculado conforme equação 5, considerando o controle negativo como 100% de viabilidade.

$$\text{Índice de sobrevivência (\%)} = \frac{\text{média das absorbâncias da amostra}}{\text{média das absorbâncias controle}} \times 100 \quad (5)$$

Para os dados obtidos foram feitos os cálculos de desvio padrão e, o teste estatístico Q de Dixon com 95% de confiança foi utilizado para avaliar a existência de pontos anômalos. A citotoxicidade foi expressa como o percentual de redução da absorbância em relação ao controle sem tratamento.

4.9 Análise estatística

Todos os experimentos foram feitos em triplicata e expressos como a média e o desvio de no mínimo três repetições independentes. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a distribuição dos dados e o teste de Levene para verificar a homogeneidade das amostras. Os dados do ensaio de determinação do número de UFC mL⁻¹ foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e a comparação de grupos foi feita utilizando-se o teste de Simes-Hochberg, enquanto os resultados do ensaio de citotoxicidade foram comparados através de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$ como estatisticamente diferente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção da quitosana

A quitosana foi obtida através dos processos de desproteinização e desacetilação, descritos na seção de materiais e métodos. O processo de desproteinização consiste na clivagem das cadeias proteicas contidas entre as cadeias poliméricas da quitina, quebrando-as em peptídeos e aminoácidos livres (CAMPANA-FILHO et al., 2007). O conteúdo de β -quitina encontrado neste trabalho foi de 36,2% em relação a massa inicial de gládios de lula (82,3 g) estando de acordo com Kurita et al. (1993) que relata que os gládios de lula são constituídos por 35-40% de β -quitina, 60-65% de proteínas e uma quantidade mínima de sais inorgânicos.

A desacetilação, última etapa do procedimento, promove a hidrólise básica dos grupos acetamida da cadeia da quitina, substituindo-os por grupos amina, obtendo-se assim a quitosana propriamente dita. O rendimento, em relação à massa inicial de gládios de lula, foi de 28,8%, valor em concordância com Chadumpai et al. (2004). A quitosana obtida tem aparência de um pó branco e fino (Figura 9).

5.2 Despolimerização da quitosana

O processo de despolimerização foi utilizado para reduzir a massa molar da quitosana, facilitando a formação de nanopartículas. A literatura relata que a massa molar da quitosana é um dos fatores que pode influenciar no diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, sendo descritos menores tamanhos de partículas utilizando-se quitosana com menor massa molar (BISWAS et al., 2015). O rendimento dessa etapa foi de 56,1% em relação a massa de quitosana inicialmente utilizada. A Figura 9 compara a aparência do pó de quitosana e do pó de quitosana despolimerizada, sendo o último mais fino e leve que o primeiro.

Figura 9 – Fotografia digital de 200 mg de quitosana (a) e de quitosana despolimerizada (b).

Fonte: Autoria própria.

5.3 Caracterização da quitosana

5.3.1 Determinação do grau médio de acetilação por titulação condutimétrica

O grau médio de acetilação da quitosana e da quitosana despolimerizada foi determinado por condutimetria (RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993), que se trata da titulação de uma mistura de um ácido forte e de um ácido fraco (quitosana em ácido clorídrico) utilizando uma base forte (NaOH) como titulante. A titulação condutimétrica é uma técnica simples, de baixo custo, não destrutível e fornece resultados próximos àqueles obtidos por RMN ^1H (HORN, 2012; RAYMOND; MORIN; MARCHESSAULT, 1993).

As curvas condutimétricas das amostras de quitosana e quitosana despolimerizada com solução de NaOH e excesso de ácido clorídrico (Figura 10) mostram três ramos lineares, onde o primeiro corresponde à neutralização do ácido presente, o segundo à desprotonação dos grupos amino da quitosana e o terceiro ao excesso de base, após o ponto de equivalência. Estas três retas originam, por extrapolação, dois pontos de inflexão (v_1 e v_2), que correspondem ao volume de base necessário para neutralizar os grupos amino protonados.

Figura 10 – Curvas de titulação condutimétrica da quitosana (a) e quitosana despolimerizada (b).

Fonte: Autoria própria.

Com os valores de v_1 e v_2 obtidos pelos pontos de equivalência, o grau médio de acetilação foi determinado utilizando-se a equação 6 (TORRES et al., 2005).

$$\%GA = \frac{(1-161x(v_2-v_1))x[\text{NaOH}]}{m} \times 100 \quad (6)$$

na qual, GA = grau médio de acetilação; 161 = massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g mol^{-1}); ($v_2 - v_1$) = volume de solução de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (L); $[\text{NaOH}]$ = concentração da solução de hidróxido de sódio (mol L^{-1}) e m = massa de quitosana contida na alíquota titulada (g).

As titulações condutimétricas foram feitas em triplicata e o grau médio de acetilação obtido foi de $4,58 \pm 0,55\%$ para a quitosana e $10,37 \pm 0,98\%$ para a quitosana despolimerizada. O aumento no grau de acetilação para a quitosana despolimerizada deve-se a quebra na cadeia da quitosana na posição da ligação glicosídica e outra no anel piranosídico, formando um anel de cinco átomos sem a amina em sua estrutura. O nitrogênio da amina reage com o nitrito para produzir nitrogênio molecular (N_2). Assim, a redução dos grupos amina pela reação de despolimerização aumenta o grau de acetilação (LEE et al., 2013; SUITCHARIT et al., 2011)

5.3.2 Determinação do grau médio de acetilação por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H)

Lavertu et al. (2003) demonstraram que a caracterização do GA da quitosana por RMN 1H apresenta vantagens por ser utilizada uma massa pequena, que não precisa ser exata, além desta técnica não usar padrões ou curvas de calibração. A temperatura de $70\text{ }^\circ\text{C}$ foi escolhida para a análise já que nesta temperatura o pico do solvente não interfere com nenhum dos picos referentes a estrutura da quitosana. Os espectros obtidos para as amostras de quitosana e quitosana despolimerizada estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Espectro de RMN 1H para (—) quitosana e (—) quitosana despolimerizada (a); Monômero da quitosana com destaque para a numeração dos H detectados por RMN 1H (b).

Fonte: Autoria própria (a); adaptado de Lavertu et al. (2003, p. 1151) (b).

O pico marcado como HAc no espectro, que aparece em 2,3 ppm de deslocamento, representa a metila (CH_3) do grupo N-acetil (Figura 11). O sinal de H_1 de monômeros acetilados não é observado em 4,9 ppm devido ao baixo grau de acetilação. Os monômeros desacetilados da quitosana levam ao aparecimento de picos em 3,5 ppm,

referentes ao H₂ e, em 5,2 ppm ao H₁. Os sinais entre 3,8 e 4,4 ppm representam os prótons de H₂ a H₆ (H₂₋₆), que aparecem tanto em monômeros acetilados quanto em desacetilados (LAVERTU et al., 2003). A determinação do grau de acetilação de ambas as quitosanas foi feita utilizando-se a equação 7, na qual são empregadas as áreas dos picos H_{Ac} e H₂₋₆.

$$GA(\%) = \left(\frac{H_{Ac}}{3} / \frac{H_{2-6}}{6} \right) \times 100 \quad (7)$$

Os valores encontrados foram de 4,7% para quitosana e 7,9 para quitosana despolimerizada, a diferença nos valores de GA devem-se a reação de despolimerização como descrito no item 5.3.1, e esses valores foram próximos aos determinados por titulação condutimétrica.

5.3.3 Determinação da massa molar média por viscosimetria

A viscosimetria é um dos processos mais utilizados para determinar a massa molar de polímeros (SANTOS et al., 2003). A viscosidade de um polímero em ácido diluído ou tampão pode ser descrita em função da sua viscosidade intrínseca. A viscosidade intrínseca da amostra de quitosana e quitosana despolimerizada foi determinada pela extrapolação da reta obtida através da curva de viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana em tampão ácido acético/acetado de sódio, como exemplificado pelas curvas das primeiras determinações na Figura 12.

Figura 12 – Curva de viscosidade reduzida versus concentração das amostras de quitosana (a) e quitosana despolimerizada (b) da primeira determinação.

Fonte: Autoria própria.

Substituindo-se os valores das constantes tabeladas e o valor da viscosidade intrínseca na equação 3 de Mark-Houwink descritas na parte experimental (item 4.4.3), o valor da massa molar encontrado foi de $2,72 \pm 0,09 \times 10^5$ g mol⁻¹ para a quitosana antes de

despolimerizar e de $1,63 \pm 0,03 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ para a quitosana despolimerizada, o que demonstra a eficácia do processo para diminuir o tamanho da cadeia polimérica, permitindo o nanodimensionamento.

A massa molar é um dos fatores descritos na literatura como determinante no tamanho das nanopartículas de quitosana (HASHAD et al., 2016; RAMPINO et al., 2013). Além disso, a massa molar e o grau de acetilação da quitosana influenciam nas suas propriedades biológicas, como a atividade antimicrobiana, pois esses parâmetros estão diretamente relacionados com a presença de grupos amino, natureza catiônica e solubilidade da quitosana (KONG et al., 2010).

5.4 Preparo das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo

As NPs-Q e NPs-Q/RL foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica adaptado de Calvo et al. (1997) como descrito na parte experimental no item 4.5. Nesse método, a obtenção das nanopartículas ocorre pela interação eletrostática do poliânion TPP com os grupamentos amino carregados positivamente, em condições ácidas, da quitosana ($-\text{NH}_3^+$). A obtenção dessas nanopartículas não requer solventes orgânicos ou tóxicos, sendo rápida e de baixo custo.

A Tabela 1 mostra as variações de parâmetros utilizados para a obtenção das NPs-Q/RL. Outro parâmetro que pode influenciar o tamanho das nanopartículas é o modo de adição do TPP, portanto foi escolhido o método de gotejamento, que apresenta menor intensidade iônica no meio, na ausência de outros sais, formando nanopartículas menores do que por adição rápida (CALVO et al., 1997). Além disso, o meio de ressuspensão está diretamente relacionado com a estabilidade da dispersão, uma vez que, a concentração iônica e pH podem afetar o movimento Browniano (FAN et al., 2012; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012a; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012b; SREEKUMAR et al., 2018).

O conjunto 10 (Tabela 1) foi escolhido como condição ótima para dar seguimento aos demais estudos, pois o solvente neste caso interferiu menos na força iônica das NPs-Q/RL, como pode ser observado pelas diferenças no diâmetro hidrodinâmico e no potencial zeta na Figura 13 e ainda apresentou nanopartículas estáveis a coalescência, já que nos demais conjuntos observou-se sempre a ocorrência de aglomerações que levaram à posterior sedimentação do material. O conjunto 10 mostrou-se estável, não havendo separação, sedimentação ou agregação dos compostos em dispersão. Pode-se observar a opalescência da dispersão, o que corrobora com a literatura na obtenção de nanopartículas de quitosana (HASHAD et al., 2016).

5 Resultados e Discussão

Tabela 1 – Parâmetros sumarizados para a obtenção das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo.

Conjunto	HAc ^a (%)	Temp ^b (°C)	pH ^c	Q:RL:TPP (volume)	Velocidade (rpm)	Centrifugação 14000 rpm	Solvente
1	1	60/4	4,7	5:5:2,5	2000	45 min; 5 °C	Água
2	1	60/4	4,7	5:2,5:2,5	2000	45 min; 5 °C	Água
3	1	60/4	4,7	5:2,5:1,5	2000	45 min; 5 °C	Água
4 ^d	1	60/4	4,9	5:2:1	2000	45 min; 5 °C	Água
5	1	25/25	4,9	5:2:1	700	30 min; 5 °C	Água
6	1	25/25	4,9	5:5:1	4000	30 min; 25 °C	Água
7	1	60/4	5,0	5:10:1	4000	30 min; 25 °C	Água
8	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	45 min; 5 °C	Água
9	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	-e	Água
10	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	20 min; 4°C	HAc pH 4,0
11	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	20 min; 4°C	NaHCO ₃ pH 5,0 Tampão
12	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	20 min; 4°C	HAc/NaAc pH 5,0
13	0,5	60/4	5,0	5:5:1,5	700	20 min; 4°C	Tampão SBF pH 7,4

^a concentração de dissolução da quitosana.^b temperatura da mistura Q e RL / temperatura de gotejamento TPP.^c pH solução de quitosana.^d utilizou-se ultrassom.^e filtrada em filtro Millipore® 0,22 µm.

Fonte: Autoria própria.

Figura 13 – Diâmetro hidrodinâmico das NPs-Q/RL (a) e pontencial zeta (b) nos diferentes solventes testados como meio de ressuspensão.

Fonte: Autoria própria.

As NPs-Q foram obtidas da mesma forma que as NPs-Q/RL (conjunto 10, Tabela 1) utilizando-se água deionizada no lugar do ramnolípídeo. O preparo dessas NPs teve como objetivo comparar o efeito nos ensaios de atividade biológica como controle.

Nas preparações das nanopartículas foi possível visualizar o efeito *Tyndall* (Figura 14), que é o efeito óptico da dispersão da luz pelas partículas coloidais, ou seja, dispersões de partículas com tamanho médio entre 1 nm e 1000 nm. Esse efeito ocorre quando há o espalhamento da luz pelas partículas em dispersão, que atuam como fontes luminosas secundárias, o que possibilita observar o trajeto da luz (VOGEL, 1981).

Figura 14 – Fotografia digital das nanopartículas de quitosana/ramnolípídeo (a) e efeito *Tyndall* na amostra em meio aquoso (b).

Fonte: Autoria própria.

5.5 Caracterização das nanopartículas

5.5.1 Análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A análise por DLS foi feita para verificar o tamanho médio das nanopartículas em dispersão e o índice de polidispersividade (PDI), que é o índice de distribuição de tamanho que representa a semelhança entre partículas. Por ser uma técnica precisa, confiável, de fácil reprodução, além de necessitar de pouca quantidade de amostra, é muito utilizada para medir a distribuição de tamanho de partículas na escala nanométrica (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997).

A Tabela 2 mostra os valores de diâmetro médio e PDI para as NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL. O ramnolípídeo foi denominado de NPs-RL devido a sua capacidade de se auto agregar em micelas, o que levou a formação de nanopartículas do tipo *core-shell* com diâmetro médio de $153,5 \pm 46,1$ nm e PDI de $0,58 \pm 0,06$. As micelas representam um tipo de sistema de encapsulamento com diâmetro médio entre 5-100 nm. Elas são termodinamicamente favoráveis e, portanto, formam-se espontaneamente. Quando os surfatantes estão presentes em solução acima da sua CMC se auto agregam e formam micelas (MÜLLER et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017). Uma das desvantagens das micelas é que

grandes quantidades de surfatantes sintéticos são frequentemente necessárias. Entretanto, o ramnolípídeo utilizado apresenta uma CMC baixa de $44 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água deionizada e a solução preparada ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) correspondeu a aproximadamente 10x a CMC.

Müller et al. (2017) utilizaram diferentes homólogos de ramnolípídeo para a obtenção de nanopartículas e observaram um tamanho médio de 6,2-62,9 nm e um PDI de 0,04-0,6 para di-ramnolípídeo. Quando o RL foi utilizado no encapsulamento de fármacos, o tamanho médio foi de 4,6 a 222,7 nm e o PDI entre 0,02-0,33. Os autores relataram que geralmente nanopartículas de ramnolípídeo apresentam tamanho entre 5-100 nm e PDI entre 0,04-0,29 dependendo da estrutura molecular, resultando em modificações das nanopartículas formadas. O tamanho das nanopartículas de RL está diretamente relacionado ao comprimento das cadeias de ácidos graxos hidroxilados contidos em sua estrutura e à presença de uma unidade de ramnose ou duas unidades de ramnose. Nesse estudo, o ramnolípídeo utilizado foi comercial e contém uma mistura de mono (73,2%) e di-ramnolípídeo (26,8%).

As NPs-Q e NPs-Q/RL apresentaram um diâmetro médio de $372,3 \pm 8,1 \text{ nm}$ e $287,8 \pm 6,2 \text{ nm}$, respectivamente e as nanopartículas resultantes foram monodispersas, sendo que a combinação de quitosana e ramnolípídeo nas NPs-Q/RL resultaram em nanopartículas menores e mais monodispersas (Tabela 2).

Vários estudos de obtenção de nanopartículas de quitosana observaram o tamanho de partículas por DLS em meio aquoso, como o descrito por Méndez et al. (2017), que investigaram a influência da concentração do polímero, tipo de solvente, método utilizado e tempo de homogeneização no tamanho de nanopartículas de quitosana/ácido oleico, observando diferenças no tamanho, PDI e eficiência de encapsulação das nanopartículas. Hashad et al. (2016) mostraram um tamanho médio de partículas entre 162,7-487,5 nm e um PDI de 0,206-0,511 para NPs de quitosana/TPP em resposta as diferentes condições utilizadas nas formulações.

Tabela 2 – Diâmetro hidrodinâmico e PDI das NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL analisadas por DLS.

Amostras	Z-average (diâmetro, nm)	PDI
NPs-RL ^a	$153,5 \pm 46,1$	$0,58 \pm 0,06$
NPs-Q ^b	$372,3 \pm 8,1$	$0,37 \pm 0,00$
NPs-Q/RL ^b	$287,8 \pm 6,2$	$0,18 \pm 0,02$

^a em água deionizada.

^b em ácido acético pH 4,0.

Fonte: Autoria própria.

5.5.2 Análise do potencial zeta

A análise do potencial zeta foi feita para avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas. O potencial zeta é a medida da carga de superfície da partícula em meio específico, sendo usado para analisar e prever interações entre as partículas em dispersão (HUNTER, 1981). A manipulação desse parâmetro é uma estratégia para melhorar a estabilidade de formulações farmacêuticas.

As partículas presentes na dispersão que apresentam potencial zeta elevado, positivo ou negativo, tendem a se repelir. Isso impede a floculação, ou seja, o sistema geralmente é considerado estável para partículas com potencial de ± 30 mV ou acima (MALVERN INSTRUMENTS LTD, 2013).

As nanopartículas apresentaram um valor de potencial zeta negativo para NPs-RL, $(-58,3 \pm 1,2$ mV) e positivo $+49,7 \pm 0,3$ mV para NPs-Q e $+60,9 \pm 1,6$ mV para NPs-Q/RL, demonstrando a estabilidade das nanopartículas em dispersão aquosa. Sotelo-Boyás et al. (2017) demonstraram diferenças no valor de potencial zeta para nanopartículas de quitosana e nanopartículas de quitosana incorporadas com óleo essencial de limão, sendo $+20$ e $+10$ mV, respectivamente. Além disso, quando formuladas nanocápsulas dos materiais, o potencial zeta encontrado foi de $+61,1$ mV para nanocápsulas de quitosana e $+57$ mV para nanocápsulas de quitosana/óleo essencial de limão. Em outro estudo relatado por Hashad et al. (2016) observou-se um potencial zeta entre $+14,4$ e $+25,4$ mV para nanopartículas de quitosana/TPP com a variação do valor em resposta à mudança dos parâmetros utilizados nas formulações.

Bai e McClements (2016) observaram a variação do potencial zeta em nanoemulsões usando ramnolipídeo, demonstrando a influência da temperatura e do pH sobre essa medida. Em pH básico (pH 9,0) a carga elétrica foi negativa e estável (-83 mV), enquanto em pH ácido (pH 2,0-3,0) o potencial zeta foi positivo ($+6$ mV), ocasionando um sistema mais instável. A influência do pH na dispersão deve-se a presença de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) no ramnolipídeo, uma vez que, esses grupos apresentam um $\text{pK}_a \sim 5,5$, tornando o potencial zeta negativo em valores de $\text{pH} > \text{pK}_a$ e positivo em $\text{pH} < \text{pK}_a$ (LEBRÓN-PALER et al., 2006).

Do mesmo modo que o ramnolipídeo, a quitosana ($\text{pK}_a \sim 6,5$) apresenta variação no potencial zeta decorrente da influência do pH, apresentando potencial zeta positivo em valores de $\text{pH} < 6,5$ e negativo em valores de $\text{pH} > 6,5$. As nanopartículas de quitosana são formadas por interações eletrostáticas sensíveis ao pH devido a protonação/desprotonação dos grupos amino. Por esse motivo, foram feitos testes de estabilidade em função do pH.

5.5.3 Testes de estabilidade

Para os testes de estabilidade foram monitorados o tamanho e o potencial zeta em função do pH e tempo de armazenamento, sendo apresentados nas próximas sessões.

5.5.3.1 Tamanho e potencial zeta em função do pH

Sabe-se que dependendo da aplicação das nanopartículas o pH é um fator importante a ser considerado. Além disso, como mencionado na seção anterior, tanto a quitosana quanto o ramnolípídeo são pH dependentes, o que torna o ensaio de estabilidade ainda mais relevante.

As NPs-Q/RL foram estáveis em $\text{pH} \leq 6,0$, enquanto as NPs-Q mantiveram-se estáveis até $\text{pH} \leq 5,5$, como consequência da protonação dos grupos amino da quitosana. Em pH alcalino, ocorreu a desprotonação dos grupos amino observando-se a diminuição no potencial zeta (Figura 15 b,d) e aumento do tamanho devido à agregação (Figura 15 a,c).

Figura 15 – Efeito do pH no diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q e no diâmetro hidrodinâmico (c) e pontencial zeta (d) das NPs-Q/RL. Dados coletados por DLS.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, esse ensaio também foi feito utilizando tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,0 como meio de dispersão para as NPs-Q/RL (Figura 16 a,b), pois neste tampão

a ressuspensão também resultou em nanopartículas estáveis. Foi observada a influência do sal na aglomeração das nanopartículas com a formação de nanopartículas maiores e com menor potencial zeta. Isso se deve ao fato da quitosana e do ramnolipídio apresentarem mudanças conformacionais não somente em resposta ao pH, mas também com a variação da força iônica.

Figura 16 – Efeito do pH no diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q/RL utilizando tampão HAc/NaAc pH 5,0 como solvente de escolha. Dados coletados por DLS.

Fonte: Autoria própria.

Vários estudos demonstraram a influência da concentração de NaCl no tamanho e potencial zeta de preparações de nanopartículas de quitosana (FAN et al., 2012; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012a; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012b; SREEKUMAR et al., 2018). Jonassen; Kjøniksen; Hiorth (2012b) observaram que a utilização de NaCl como solvente para nanopartículas de quitosana levou a formação de partículas maiores e com menor potencial zeta. Curiosamente, as nanopartículas preparadas em água mostraram um potencial zeta mais alto, embora com tamanhos maiores e menos estáveis, tanto na preparação quanto no armazenamento, devido à redução da estabilidade coloidal do sistema, o que corrobora com os dados encontrados neste estudo como mencionado na seção 5.4.

Já para o ramnolipídeo, a capacidade de se auto organizar e formar diferentes tipos de estruturas como micelas, vesículas, estruturas lamelares, entre outras em função do pH e da presença de eletrólitos é responsável pelos diferentes perfis de tamanho e carga observados para os solventes testados. Rodrigues et al. (2017) demonstraram o efeito do cloreto de sódio no padrão de agregação do ramnolipídeo bem como na sua atividade biológica. Os autores observaram uma diminuição nos valores de CMC para o mono-RL em função da adição de NaCl. O pH de 6,2 da solução de ramnolipídeo em água deionizada utilizado pelos autores não foi ajustado. Nestas condições, na ausência de um eletrólito, a

maioria dos grupos carboxílicos do RL estão dissociados para formar íons carboxilato. Como resultado, a superfície do líquido exibe uma carga negativa líquida, resultando em fortes forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas de RL. Na presença de NaCl, esta carga negativa é protegida pelos íons Na^+ , causando a formação de uma monocamada compacta, que resultou na diminuição dos valores de CMC e tensão superficial (HELVACI; PEKER; ÖZDEMİR, 2004; RODRIGUES et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2007).

Em congruência com Rodrigues et al. (2017), o pH da solução de ramnolípido em água deionizada utilizado neste estudo foi de 6,4 e da quitosana em HAc 0,5% foi de 5,0. Quando as NPs foram ressuspensas em tampão HAc/NaAc pH 5,0 ocorreu a aglomeração das partículas em decorrência da presença de sal, o que pode ser explicado pela neutralização das cargas do RL e, conseqüentemente, a aglomeração das moléculas de surfatante pela diminuição das forças repulsivas ocasionadas pelo sal.

5.5.3.2 Distribuição de tamanho médio e potencial zeta em função do tempo

A estabilidade das NPs-Q/RL em função do tempo de armazenamento a 4 °C foi avaliada por medidas de DLS durante 33 dias e observou-se pequenas alterações no tamanho e potencial zeta durante esse período (Figura 17). Entretanto, as suspensões continuaram estáveis com ausência de precipitação visual durante seis meses de armazenamento. Estes dados estão em concordância com estudos de estabilidade apresentados por outros autores (FAN et al., 2012; JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012b).

Figura 17 – Diâmetro hidrodinâmico (a) e pontencial zeta (b) das NPs-Q/RL em função do tempo de armazenamento a 4 °C. Dados coletados por DLS.

Fonte: Autoria própria.

A preparação de nanopartículas à base de polímeros pode ser realizada por reticulação das cadeias poliméricas através de ligações covalentes, ou, explorando interações físicas entre as cadeias poliméricas, como ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas ou

associações hidrofóbicas. Essas forças atrativas devem ser levadas em consideração no preparo das partículas, pois podem levar à repulsão e à agregação devido a atração das partículas ao longo do tempo (JONASSEN; KJØNIKSEN; HIORTH, 2012b). Portanto, as mudanças sutis observadas no tamanho e potencial zeta durante o armazenamento devem-se a essas associações intra e interpartículas, como relaxamento e/ou intumescimento das cadeias, características importantes que podem ser exploradas na aplicação do material, uma vez que, podem favorecer ou não a liberação de outros compostos bioativos de interesse (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; MOHAMMED et al., 2017).

5.5.4 Análise por microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi feita para verificar a morfologia das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo e suas imagens podem ser observadas na Figura 18. As NPs QRL apresentaram formato esférico e a presença de partículas foi comprovada através das imagens de fase por comparação com o substrato de mica no estado natural.

Quando se compara a faixa de distribuição de tamanho das nanopartículas analisadas por DLS e AFM observa-se a mesma ordem de distribuição de tamanho. Entretanto, os resultados obtidos por AFM apresentaram tamanhos menores do que aqueles obtidos por DLS, o que se deve ao achatamento das partículas, uma vez que, a análise por AFM foi feita após a secagem das partículas, o que as desidrata, não sendo, portanto, uma medida referente ao raio hidrodinâmico como as medidas feitas DLS. Além disso, a medida do raio hidrodinâmico por DLS é dependente do solvente utilizado, podendo ser maior ou menor, dependendo da natureza deste (LUQUE-ALCARAZ et al., 2016; YUAN et al., 2009).

Figura 18 – Imagens de topografia por microscopia de força atômica das amostras de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) depositadas em substrato de mica (a-b).

Fonte: Autoria própria.

5.5.5 Análise por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de estruturas similares a micelas para as NPs-RL (Figura 19a). Estes dados são similares aos descritos por Rodrigues et al. (2017) que observaram que a mistura bruta de RL em solução aquosa organizou-se em estruturas gigantes semelhantes a vesículas quando visualizados por CLSM. Entretanto, o ramnolípídeo utilizado pelos autores apresentou um tamanho de partículas maior ($302,8 \pm 7,4$ nm) do que o encontrado neste estudo ($153,5 \pm 46,1$) o que pode estar relacionado com a distribuição dos homólogos presentes na mistura, a concentração da solução aquosa e a CMC do ramnolípídeo utilizado, pH, força iônica, entre outros parâmetros que afetam a auto agregação do ramnolípídeo em diferentes estruturas.

Já para as NPs-Q/RL (Figura 19b) foi possível confirmar o formato esférico e faixa de distribuição de tamanho o que corrobora com os dados obtidos por DLS e AFM.

Figura 19 – Microscopia eletrônica de transmissão das micelas de nanopartículas de ramnolípídeo (NPs-RL) (a) e nanopartículas de quitosana/ramnolípídeo (NPs-Q/RL) (b).

Fonte: Autoria própria.

5.5.6 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho foi feita para verificar se as bandas características para a quitosana e o ramnolípídeo foram mantidas após o nanodimensionamento. Os espectros obtidos para as três amostras estudadas estão apresentados na Figura 20. Para o filme obtido a partir da solução de quitosana despolimerizada observou-se bandas em: 1637 cm^{-1} e 1558 cm^{-1} referentes às amidas I (deformação axial C=O) e II (deformação angular N-H); 1410 cm^{-1} corresponde às deformações simétricas CH_2 ; as bandas em 1153 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} correspondem aos estiramentos simétrico e assimétrico C-O-C das vibrações da estrutura piranosídica,

evidenciando a presença dos principais grupos funcionais da quitosana (OH; CHUN; CHANDRASEKARAN, 2019).

Figura 20 – Espectro no infravermelho para: (—) Q, (—) RL e (—) NPs-Q/RL.

Fonte: Autoria própria.

O espectro obtido para o ramnolípídeo mostrou as bandas características em 3363 cm^{-1} referente ao estiramento dos grupos hidroxila ($-\text{OH}$) encontrados na molécula de ramnolípídeo, 2923 e 2851 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento dos grupos C-H de cadeias alifáticas, na região 1732 cm^{-1} encontra-se a banda característica do grupo carbonila ($-\text{C=O}$) dos estéres e, em $1574\text{-}1408\text{ cm}^{-1}$ ($-\text{C=O}$) referem-se aos grupos carboxílicos. As bandas em $1317\text{-}983\text{ cm}^{-1}$ devem-se a presença das ligações $-\text{C-OH}$ nas estruturas químicas dos anéis de ramnose (BI; LI, 2018; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008).

As interações entre dois compostos são registradas nos espectros de FTIR como deslocamentos nas frequências de vibração características de cada composto puro. Nesse sentido, a ausência de deslocamentos nas bandas das NPs-Q/RL com relação às bandas do ramnolípídeo e do filme de quitosana despolimerizada (Figura 20) foi indicativo que não ocorreram mudanças estruturais do biopolímero e do RL. O padrão de bandas presente nas NPs indica que as características químicas da quitosana e do ramnolípídeo foram mantidas após o nanodimensionamento e que a interação entre eles possivelmente é eletrostática.

5.5.7 Quantificação do ramnolípídeo nas nanopartículas

O ramnolípídeo adicionado nas nanopartículas foi quantificado através da determinação de ramnose como descrito na seção 4.6.7. Para cada determinação independente de preparação de nanopartículas foi construída uma curva de padronização com diferentes

concentrações de ramnose (Figura 21). Os valores de absorbância obtidos para as amostras de sobrenadante do centrifugado de nanopartículas foram interpolados em sua curva de padronização a fim de determinar a concentração de ramnose.

Figura 21 – Curva de padronização da ramnose para as nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo.

Fonte: Autoria própria.

Substituindo-se os valores de absorbância obtidos para o sobrenadante de NPs na equação 8, pode-se calcular a concentração de ramnose ($R = 0,9992$).

$$Abs = -0,01769 + 0,01711[ramnose] \quad (8)$$

A partir da determinação da concentração de ramnose, construiu-se uma curva de padronização para o ramnolipídeo com intuito de estabelecer o fator de conversão e aferir a real concentração de ramnolipídeo nas nanopartículas (Figura 22). Os valores de absorbância da ramnose divididos pelos valores de absorbância do ramnolipídeo (relação ramnose/ramnolipídeo puro) resultou no fator de $3,15 \pm 0,33$. A quantificação do ramnolipídeo nas nanopartículas foi estimada multiplicando-se a concentração de ramnose por este fator de conversão. A partir disso, foi possível determinar a porcentagem de ramnolipídeo adicionada nas NPs utilizando-se a equação 9.

$$Eficiência\ de\ associação = \frac{RL_0 - RL_1}{RL_0} \times 100 \quad (9)$$

sendo, RL_0 a concentração de ramnolipídeo ($mg\ mL^{-1}$) inicialmente adicionada nas nanopartículas e RL_1 a concentração de ramnolipídeo ($mg\ mL^{-1}$) presente no sobrenadante após centrifugação das nanopartículas.

A porcentagem média de ramnolípídeo adicionada nas nanopartículas foi de $59,9 \pm 2,7\%$, ou seja, $300 \pm 14 \mu\text{g mL}^{-1}$ de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ramnolípídeo foi associado nas nanopartículas. Os resultados mostram que o método de obtenção das nanopartículas foi reprodutível. Entretanto, não há em literatura dados que possam ser usados para a comparação, uma vez que, os estudos utilizando ramnolípídeo na formação de nanopartículas quantificam apenas os fármacos liberados dessas nanopartículas (CHEOW; HADINOTO, 2012; MÜLLER et al., 2017).

Figura 22 – Curva de padronização do ramnolípídeo para determinação do fator de conversão ($R = 0,9996$).

Fonte: Autoria própria.

5.5.8 Quantificação da quitosana nas nanopartículas

A quitosana adicionada nas nanopartículas também foi quantificada, através da determinação dos grupos amino como descrito na seção 4.6.8. Do mesmo modo que o ramnolípídeo foi construída uma curva de padronização com diferentes concentrações de quitosana despolimerizada para cada determinação independente de preparação de nanopartículas (Figura 23). Os valores de absorbância obtidos para as amostras de sobrenadante do centrifugado de nanopartículas foram interpolados em sua curva de padronização a fim de determinar a concentração de quitosana. Substituindo-se os valores de absorbância obtidos para o sobrenadante de NPs na equação 10, pode-se calcular a concentração de quitosana ($R = 0,9997$).

$$Abs = -0,01299 + 0,00738[quitosana] \quad (10)$$

A partir da determinação da concentração de quitosana foi possível determinar a porcentagem de quitosana adicionada nas NPs utilizando-se a equação 11.

$$\text{Eficiência de associação} = \frac{Q_0 - Q_1}{Q_0} \times 100 \quad (11)$$

em que, Q_0 é a concentração de quitosana (mg mL^{-1}) inicialmente adicionada nas nanopartículas e Q_1 é a concentração de quitosana (mg mL^{-1}) presente no sobrenadante após centrifugação das nanopartículas.

Figura 23 – Curva de padronização da quitosana despolimerizada para as nanopartículas de quitosana e quitosana/ramnolípídeo.

Fonte: Autoria própria.

A porcentagem média de quitosana despolimerizada adicionada nas NPs-Q foi de $18,5 \pm 4,4\%$, ou seja, $92 \pm 22 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para as NPs-Q/RL a porcentagem encontrada foi de $46,5 \pm 2,7\%$, ou seja, $232 \pm 13 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosana foi associada nas nanopartículas, respectivamente. Em um estudo feito por Luque-Alcaraz et al. (2016), os autores observaram que as nanopartículas estudadas continham 38% de óleo de citral e 62% de quitosana, valor próximo ao encontrado para a quitosana despolimerizada nas NPs-Q/RL neste trabalho.

5.5.9 Curva de liberação *in vitro*

Para se avaliar a estabilidade das nanopartículas na presença de um meio que mimetize o pH da pele fez-se um ensaio em tampão HAc/NaAc pH 5,5 e mediu-se ramnolípídeo e quitosana livres em solução. Os resultados foram obtidos através da

interpolação dos valores de absorbância obtidos em suas respectivas curvas de padronização mostradas previamente nos ensaios de quantificação (itens 5.5.7 e 5.5.8).

A porcentagem média de ramnolipídeo liberado das nanopartículas foi menor do que 1,0% (Figura 24) e para quitosana não foi detectada a presença do polímero no meio. Os resultados mostram que o método de obtenção das nanopartículas foi reprodutível e que as nanopartículas são estáveis a degradação sendo veículos adequados para a incorporação de outras moléculas bioativas.

Figura 24 – Porcentagem de ramnolipídeo liberada das NPs-Q/RL em tampão ácido acético/acetato de sódio pH 5,5.

Fonte: Autoria própria.

Em suma, as NPs-QRL foram menores, mais monodispersas e estáveis, com alto potencial zeta, quando comparadas com as NPs-RL e NPs-Q. Existem vários mecanismos que contribuem para a formação de nanopartículas menores e mais estáveis devido à presença de surfatantes (KVÍTEK et al., 2008; SREEKUMAR et al., 2018; VATANPARAST et al., 2018). A formação de nanopartículas não é afetada apenas pela composição do polímero e surfatante, mas também pelo método usado na obtenção (JONASSEN; KJONIKSEN; HIORTH, 2012b; RASYID et al., 2014; SREEKUMAR et al., 2018). A adição de um surfatante pode estabilizar as partículas e evitar a aglomeração porque a longa cauda hidrofóbica reduz a tensão superficial durante o processo de cavitação, resultando em nanopartículas mais estáveis (KVÍTEK et al., 2008; VATANPARAST et al., 2018). A formação das NPs-Q baseou-se na interação eletrostática dos grupos amino protonados da quitosana com os grupos fosfato do TPP e foram obtidas com a mesma proporção de quitosana e TPP que a utilizada para as NPs-Q/RL como controle de comparação. Nessas nanopartículas, a interação entre a quitosana policatiônica e o poliânion TPP é mais forte do

que na presença do ramnolípido, resultando em nanopartículas maiores devido a aglomeração.

Já para as NPs-Q/RL, a mistura quitosana/ramnolípido precedeu a adição de TPP, resultando em interações mais fracas entre o TPP e a quitosana, pois o grupo carboxílico do ramnolípido está interagindo com alguns grupos amino da quitosana, evitando a formação de pontes entre as moléculas do polímero provocadas pelo TPP (Figura 25). Além disso, a cauda hidrofóbica do ramnolípido fornece uma barreira estérica para o TPP interagir com os grupos amino da quitosana, devido às forças eletrostáticas repulsivas entre as cargas negativas do TPP e o surfatante (BAI; MCCLEMENTS; 2016; VATANPARAST et al., 2018). Essas forças repulsivas podem deixar uma maior quantidade de grupos amino livres, pois a quantidade de grupos -COO^- na estrutura do ramnolípido é menor do que o encontrado para os grupos NH_3^+ da quitosana contribuindo para que a carga de superfície seja positiva. Todos esses fatores em conjunto, resultaram no potencial zeta elevado e mais positivo comparado com os valores encontrados para as NPs-Q, indicando que a presença de grupos amino da estrutura da quitosana é predominante na superfície das nanopartículas, o que é importante para permitir a repulsão eletrostática entre as partículas, produzindo dispersões estáveis, além da natureza catiônica do polímero estar diretamente relacionada à sua atividade biológica.

Figura 25 – Esquema representativo da formação das NPs-Q e NPs-Q/RL.

Fonte: Autoria própria.

Por fim, a formação das nanopartículas foi facilitada através de um equilíbrio entre as interações atrativas e repulsivas da quitosana, do ramnolipídeo e do TPP, que impediu a aglomeração. Como resultado, a adição do ramnolipídeo estabilizou a quitosana nas nanopartículas, resultando em partículas menores, mais uniformes, mais estáveis e, consequentemente, mais quitosana foi adicionada nessas nanopartículas devido a maior área de superfície/volume, quando comparadas com as nanopartículas somente de quitosana. Rasyid et al. (2014) encontraram resultados similares para nanopartículas de quitosana encapsulando o fármaco cetropreno mais eficientemente devido a formação de nanopartículas menores e mais estáveis na presença dos surfatantes ácido oleico e poloxamer 188.

5.6 Atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo

Sabe-se que a quitosana e o ramnolipídeo são compostos com atividade antimicrobiana reconhecida. Para verificar o tipo de interação entre eles, foi avaliada a ação conjunta dos antimicrobianos na forma de nanopartículas. Para isso, a atividade antimicrobiana foi avaliada para os compostos individualmente para comparação com as nanopartículas formadas por eles. Primeiramente, foram feitos ensaios preliminares (dados no apêndice A e B) para otimizar os parâmetros como a escolha do meio de cultura, pH de trabalho, bactérias, interação das proteínas do meio com as nanopartículas, entre outros. Entre as bactérias testadas, *Staphylococcus aureus* foi escolhido como modelo para dar continuidade nos testes, uma vez que, apresentou maior sensibilidade aos compostos testados.

A Tabela 3 mostra os valores de CIM e CBM dos compostos isolados e das nanopartículas encontrados para cada linhagem testada. Os valores de CIM para a solução Q foram de 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. epidermidis*, 58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* DSM 1104, 116 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* ATCC 29213 e 58 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a bactéria Gram-negativa *K. oxytoca*, destacando que sua ação foi bactericida para todas as linhagens testadas. As NPs-Q foram capazes de inibir *S. epidermidis* com CIM e CBM de 11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 23 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, *S. aureus* DSM 1104 apresentando CIM de 92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e *K. oxytoca* com CIM de 92 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o efeito bacteriostático para as duas últimas. Essas diferenças devem-se ao fato das nanopartículas de quitosana conterem uma menor concentração de quitosana como observado na quantificação das nanopartículas.

Vários estudos relataram diferenças no efeito inibitório da quitosana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LAOKULDILOK et al., 2017; NO et al., 2002),

enquanto alguns autores não observaram diferenças significativas (DIVYA et al., 2017; MADUREIRA et al., 2015; MARANGON et al., 2017).

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana da solução de quitosana despolimerizada (Q), nanopartículas de ramnolipídeo (NPs-RL), nanopartículas de quitosana (NPs-Q) e nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) contra bactérias patogênicas.

Linhagens	Q		NPs-RL		NPs-Q		NPs-Q/RL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	$\mu\text{g mL}^{-1}$							
<i>S. aureus</i> ^a	58	232	37	75	92	>92	14/19	29/37
<i>S. aureus</i> ^b	116	464	75	150	>92	>92	29/37	58/75
<i>S. epidermidis</i>	14	29	37	75	11	23	7/9	14/19
<i>K. oxytoca</i>	58	464	>600	>600	92	>92	116/150	>116/150

^a *S. aureus* DSM 1104, ^b *S. aureus* ATCC 29213.

Fonte: Autoria própria.

Os efeitos da quitosana são linhagem-dependente e vários fatores extrínsecos e intrínsecos podem afetar sua ação, como as características do microrganismo e da própria quitosana, tais como: grau de acetilação, massa molar, pH, capacidade de quelação, força iônica, temperatura e tempo de armazenamento, entre outros (KONG et al., 2010; MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017). Laokuldilok et al. (2017) estudaram quitosana com diferentes massas molares e verificaram que bactérias Gram-positivas foram melhor inibidas pela quitosana de maior massa molar (41 kDa), enquanto a quitosana de menor massa molar (5,1 kDa) foi mais eficiente para as bactérias Gram-negativas. Madureira et al. (2015) estudaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana contra patógenos alimentares e relataram diferenças na CIM e CBM para quitosana de alta (624 kDa) e baixa massa molar (107 kDa), sendo a última mais eficiente na inibição do que a primeira, independente da bactéria.

Contraditoriamente, No et al. (2002) reportaram que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis que bactérias Gram-negativas à quitosana de baixa massa molar (470 kDa). Em outro estudo, os autores não verificaram diferenças significativas em relação a massa molar (MELLEARD et al., 2011), o que corrobora com os resultados obtidos em nosso trabalho. Além disso, em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa utilizando quitosana de alta massa molar, o efeito antimicrobiano foi similar ao obtido utilizando-se quitosana de baixa massa molar, com valores de CIM de $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a mesma linhagem de *S. aureus* DSM 1104 (Marangon et al., 2017). Vale ressaltar que a quitosana utilizada foi obtida a partir da β -quitina e possui propriedades diferenciadas quando comparada à quitosana obtida a partir de outras fontes como camarão ou caranguejo (α -quitina), como maior solubilidade devido ao

empacotamento menos denso (CAMPANA-FILHO et al., 2007) e, essas diferenças afetam a interação com a bactéria e consequentemente a atividade antimicrobiana.

Além disso, há controvérsias na tentativa de explicar a atividade antimicrobiana da quitosana. A literatura propõe 3 mecanismos de ação: o mais difundido reporta a interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana que são carregados positivamente e a superfície bacteriana carregada negativamente, provocando alterações da superfície celular e extravasamento do conteúdo intracelular (JEON et al., 2014; SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992). O segundo mecanismo proposto sugere a ligação direta da quitosana ao DNA do microrganismo inibindo o RNAm e a síntese proteica. Entretanto, para que a quitosana possa atravessar a parede celular da bactéria (20-80 nm para bactérias Gram-positivas e <10 nm para Gram-negativas) é necessário que esta apresente tamanho reduzido (SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992). O terceiro está relacionado à capacidade da quitosana de ligar-se à metais e limitar a passagem de nutrientes essenciais a vida bacteriana (RABEA et al., 2003).

As NPs-RL utilizadas neste trabalho apresentaram atividade apenas contra as bactérias Gram-positivas. Os valores de CIM e CBM encontrados para *S. epidermidis* e *S. aureus* DSM 1104 foram de 37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já para *S. aureus* ATCC 29213 os valores de CIM e CBM encontrados foram de 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Rienzo et al. (2016) também observaram efeito inibitório do RL apenas contra bactérias Gram-positivas. Já, os resultados obtidos por Benincasa et al. (2004) mostraram que o RL inibe várias bactérias Gram-negativas. Em outro estudo, os autores corroboram nossos resultados, não encontrando efeito para o RL em bactérias Gram-negativas (LOTFABAD; SHAHCHERAGHI; SHOORAJ, 2013). Esses dados estão diretamente relacionados com o mecanismo de ação descrito na literatura para o ramnolipídeo. Os estudos sugerem que o biosurfatante, por apresentar natureza anfifílica, pode ligar-se a membrana celular de diferentes microrganismos e formar complexos através da interação com fosfolipídios e proteínas de membrana, causando perturbações na sua estrutura e levando ao extravasamento do conteúdo intracelular. Entretanto, o modo de ação do ramnolipídeo ainda não é totalmente compreendido. A presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas confere baixa permeabilidade a moléculas hidrofóbicas e anfipáticas, este fato explicaria a maior resistência das bactérias Gram-negativas ao ramnolipídeo (SHAO et al., 2017; SOTIROVA et al., 2008).

Do mesmo modo que a quitosana, há controvérsias na tentativa de explicar o modo de ação do ramnolipídeo e a maneira como este interage com os microrganismos, uma

vez que, devido à origem biológica, vários fatores afetam suas propriedades tais como o tipo de ramnolipídeo e a distribuição de moléculas homólogas presentes na mistura que dependem da linhagem utilizada, fonte de carbono, processo de extração, entre outros (CHONG; LI, 2017; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010; SHAO et al., 2017; VARJANI; UPASANI, 2017).

A obtenção de nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo resultou em diferentes perfis de sensibilidade em relação as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Observou-se que as NPs-Q/RL foram mais eficazes que o ramnolipídeo e a quitosana isoladamente contra todas as espécies Gram-positivas testadas. A concentração necessária para inibir o crescimento de todas as linhagens de *Staphylococcus* spp. foi reduzida em pelo menos metade da CIM dos compostos isolados, sugerindo efeito sinérgico. Entretanto, as NPs-Q/RL não excederam o desempenho da quitosana na inibição de *K. oxytoca* (Tabela 3). Deve-se notar, no entanto, que os valores de CBM da quitosana encontrados para *K. oxytoca* estavam acima da faixa de concentração testada para as demais amostras (exceto para as NPs-RL) e, as diferenças na eficácia antimicrobiana só puderam ser avaliadas com base nos valores da CIM.

Estes resultados são similares a outros estudos descritos na literatura para nanopartículas de quitosana que apresentaram melhor efeito antimicrobiano quando combinadas com outros compostos bioativos. Sotelo-Boyás et al. (2017) também observaram sinergismo para nanopartículas de dois compostos bioativos, a quitosana e o óleo essencial de limão. Em outro estudo descrito por Alishahi (2014) foi demonstrado que nanopartículas de quitosana contendo um polipeptídeo (nisina) apresentaram sinergismo na inibição de bactérias comparado as nanopartículas dos compostos isolados.

Há muitas hipóteses a respeito do mecanismo de ação de nanomateriais com atividade antimicrobiana (JAMIL; BOKHARI; IMRAN, 2017). Para explicar a heterogeneidade nos resultados desse estudo entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sugere-se que as NPs testadas podem interferir simultaneamente em múltiplos alvos celulares como a parede e a membrana citoplasmática.

Para *Staphylococci* tanto Q como RL apresentaram efeito e, quando essas moléculas foram combinadas em NPs-Q/RL, a atividade foi maior, pois o mecanismo de ação de ambos os compostos está relacionado à desestabilização da parede e membrana celular, respectivamente (DIVYA et al., 2017; MA; GARRIDO-MAESTU; JEONG, 2017; SOTIROVA et al., 2008). Além disso, o menor tamanho, a carga de superfície mais positiva e a melhor estabilidade das partículas são parâmetros que afetam a interação e eficácia antimicrobiana (HUSSAIN et al., 2018; RADOVIC-MORENO et al., 2012). A presença de

mais grupos NH_3^+ livres nas NPs-Q/RL também pode gerar uma maior densidade de carga e, portanto, um aumento potencial na ação antimicrobiana da quitosana, uma vez que, está diretamente relacionado com as interações eletrostáticas que ocorrem com componentes aniônicos da parede e membrana bacteriana (SUDARSHAN; HOOVER; KNORR, 1992). Sugere-se que a alta densidade local de grupos NH_3^+ nas NPs-Q/RL levaram a mais interações eletrostáticas e, conseqüentemente, a desestabilização e o rompimento mais eficazes da parede celular. Finalmente, a suposta interação célula-superfície resultou na liberação do ramnolípido próximo à superfície celular bacteriana, o que pode facilitar o acesso do ramnolípido a membrana celular. Por isso, concomitantemente na mesma nanopartícula, esses compostos provocaram danos maiores em menores concentrações (Figura 26).

Figura 26 – Imagem conceitual da interação das NPs-Q/RL com a superfície celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As interações eletrostáticas promovem a ligação das partículas e liberação local de ramnolípido. As bactérias Gram-negativas permanecem protegidas contra o ramnolípido por sua membrana externa, mas as bactérias Gram-positivas apresentam estruturas celulares alvo para a interação com a quitosana e consequente liberação do biosurfatante.

Fonte: Autoria própria.

Já, para *K. oxytoca*, as NPs-Q/RL apresentaram menor efeito que a quitosana. Isso também pode ser explicado pelo mecanismo de ação descrito na literatura para a quitosana e para o ramnolípido. As NPs-RL não apresentaram atividade devido provavelmente à baixa permeabilidade oferecida pela membrana externa das bactérias Gram-negativas. A Q foi capaz de inibir e matar a bactéria. Contudo, as NPs-Q/RL apresentaram menor efeito que a

solução Q, o que pode ser justificado pela resistência oferecida pela membrana externa da bactéria ao ramnolípídeo (SHAO et al., 2017; SOTIROVA et al., 2008).

5.6.1 Interação nanopartícula-bactéria

Para visualizar a interação da quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL com *S. aureus*, o ramnolípídeo foi corado em vermelho e a quitosana em verde usando como marcadores o vermelho do Nilo e o calcofluor, respectivamente (Figura 27). As células bacterianas não foram coradas por si só, mas as células ligadas às NPs-RL foram claramente visíveis na coloração com vermelho do Nilo, que foi utilizado como marcador para as amostras contendo RL. Nas amostras sem RL, o formato das células bacterianas foi visualizado como conchas vazias com quitosana adsorvida na superfície. Amostras de *S. aureus* sem a presença de partículas foram coradas com vermelho do Nilo e calcofluor e visualizadas utilizando os mesmos parâmetros para verificar se a ocorrência dos sinais eram do ramnolípídeo e da quitosana e não de coloração inespecífica das células (dados não mostrados).

A visualização das culturas de *S. aureus* com ramnolípídeo e quitosana mostrou que as células bacterianas permaneceram uniformemente dispersas quando tratadas com as NPs-RL, enquanto todas as amostras contendo quitosana resultaram em agregação das células bacterianas formando grandes aglomerados. A liberação do ramnolípídeo utilizando como veículo as NPs-Q/RL foi maior e mais próxima à superfície celular. Como todas as imagens obtidas por CLSM foram feitas utilizando os mesmos parâmetros de exposição, foi possível quantificar o sinal de intensidade do ramnolípídeo em células de *S. aureus* para estimar as diferenças relativas e a quantidade de ramnolípídeo ligada à célula. A fluorescência média de intensidade do vermelho do Nilo de células tratadas com as NPs-RL foi aproximadamente o dobro nas células tratadas com as NPs-Q/RL (116 ± 22 e 229 ± 23 , respectivamente) (escala de cinza na Figura 27d). Essa diferença é uma subestimação do real valor, pois a intensidade da fluorescência foi saturada (> 255) para a maioria das células tratadas com as NPs-Q/RL. Pode-se inferir, portanto, que a formulação de nanopartículas de quitosana/ramnolípídeo resultou na transferência de mais ramnolípídeo para as células bacterianas devido à proximidade das NPs-Q/RL com a superfície celular.

Figura 27 – Imagens de CLSM da interação da solução de quitosana $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a), NPs-Q $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b), Nps-RL $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) e NPs-Q/RL $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$; a escala de cinza no canto inferior direito indica a fluorescência média de intensidade do vermelho do Nilo de células tratadas com as NPs-RL e com as NPs-Q/RL (116 ± 22 e 229 ± 23 , respectivamente) (d) com as células planctônicas de *S. aureus* ATCC 29213 por 4 h a 37°C . A quitosana foi corada com Calcofluor (verde) e o ramnolipídeo com vermelho do Nilo (vermelho).

Fonte: Autoria própria.

5.6.2 Ensaio de aglomeração celular

As interações entre as células bacterianas e as nanopartículas geralmente promovem aglomeração. Para confirmação do efeito visualizado na Figura 27 foi feita a quantificação da aglomeração das suspensões bacterianas de *S. aureus*. Esse ensaio fornece uma comparação relativa de quão forte foi a interação dos compostos com as bactérias. Como observado no item 5.6.1, as bactérias aglomeram-se na presença da quitosana, uma vez que, a quitosana carregada positivamente forma pontes unindo as células carregadas negativamente.

Pode-se observar na Figura 28 que as NPs-Q e NPs-Q/RL causaram aglomeração em maior extensão do que as NPs-RL e a solução de quitosana. As NPs-Q/RL promoveram a agregação de forma mais rápida (20 min) quando comparada com as demais amostras.

Yu et al. (2018) observaram um efeito similar em imagens de CLSM, sendo a alta fluorescência diretamente proporcional a agregação e consequente morte das bactérias quando tratadas com nanopartículas de copolímeros encapsulando antibióticos. Os autores, assim como neste estudo, relataram que essas nanopartículas exibiram interações específicas e uma ligação superior para bactérias Gram-positivas.

Figura 28 – Aglomeração de *S. aureus* ATCC 29213 em função da DO_{600} : sem tratamento (●) e tratados com $232 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosana (●), $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-RL (●), $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q (●) e $116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q/RL (●).

Fonte: Autoria própria.

5.7 Ensaio de atividade antibiofilme

5.7.1 Formação e quantificação dos biofilmes

A quantificação da biomassa celular das diferentes linhagens estudadas está apresentada na Tabela 4. Pode-se observar que as linhagens apresentaram capacidade de produzir uma quantidade substancial de biofilme nos *peg-lids*, como detectado usando a solução de Gram-safranina. Notavelmente, *K. oxytoca* apresentou forte capacidade de produção de biofilme *in vitro*, com valor de $DO_{600} > 0,6$, o que está diretamente relacionado com a presença de polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos. Essa observação é apoiada pela constatação de que esses fatores de virulência são necessários para a construção

da arquitetura de um biofilme maduro, sendo responsáveis pela composição da MPE (PATRO; RATHINAVELAN, 2019).

Tabela 4 – Quantificação da biomassa celular das diferentes linhagens após 48 h de incubação a 37 °C.

Linhagens	DO ₆₀₀	DO ₅₃₀ ^a
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,50 ± 0,05	0,07 ± 0,01
<i>S. aureus</i> DSM 1104	0,26 ± 0,04	0,45 ± 0,12
<i>S. epidermidis</i>	0,44 ± 0,04	1,15 ± 0,12
<i>K. oxytoca</i>	1,15 ± 0,08	2,07 ± 0,17

^a valor subtraído do branco (meio de cultura + safranina).

Fonte: Autoria própria.

Os valores apresentados na Tabela 4 corroboram com os valores encontrados por Sonesson et al. (2017), o que indica a formação satisfatória de biomassa celular para os ensaios antibiofilmes. O valor de DO₅₃₀ para *S. aureus* ATCC 29213 inferior em relação aos demais *Staphylococcus* spp. deve-se aos diferentes tipos de adesinas bacterianas que mediam a adesão inicial e subsequentemente as fases de formação do biofilme em Staphylococci, através do reconhecimento de outras moléculas receptoras, que são responsáveis, além da virulência, por mediar a adesão inicial a tecidos e a vários biomateriais (CARDILE et al., 2014; VAUDAUX et al., 1989). Jørgensen et al. (2016) observaram um aumento substancial da biomassa celular de *S. aureus* quando formado na presença de plasma, por exemplo. Ademais, nota-se a presença de grande quantidade de células planctônicas no biofilme dessa bactéria, como pode ser observado no valor de DO₆₀₀ mais alto, que podem ter sido removidas no processo de lavagem. Entretanto, esses valores são adequados para os ensaios antibiofilme, uma vez que, estão acima do limite de detecção dos brancos (média dos brancos e desvio).

Apesar dessas diferenças, as bactérias em geral, apresentam uma tendência natural de aderir a superfícies como um mecanismo de sobrevivência. Contudo, a maneira como isso ocorre depende de diferentes fatores. Vários estudos demonstraram a influência das propriedades da superfície (hidrofobicidade, porosidade, carga, formato) e do microambiente (pH, disponibilidade nutricional, aeração, natureza do biofilme – homogêneo ou heterogêneo) em que os biofilmes se encontram. Além disso, características da bactéria, como a presença de flagelos, fimbrias, pili, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, influenciam na adesão às superfícies (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016; TOYOFUKU et al., 2016). A Figura 29 ilustra a quantificação da biomassa celular nos *peg-lids*.

Figura 29 – Fotografia digital do estudo preliminar de formação e quantificação da biomassa celular dos biofilmes de *S. aureus* DSM 1104 (a), *S. aureus* ATCC 29213 (b) e *K. oxytoca* (c) após 48 h a 37 °C em microplacas com tampas adaptadas (*peg-lids*).

Fonte: Autoria própria.

5.7.2 Determinação da concentração inibitória mínima do biofilme (CIBM) e da concentração de erradicação mínima do biofilme (CEBM)

Os antimicrobianos são muito menos eficazes na eliminação de bactérias que crescem como biofilmes. Isso se deve em parte ao menor alcance dos antimicrobianos devido à proteção da MPE ou diminuição da quantidade dessas substâncias disponível para interagir com as células no biofilme atingindo uma concentração subletal, além disso, ocorre o aumento da tolerância dentro do biofilme (HU; KWON, 2011; RIBEIRO et al., 2016). Como no ensaio de atividade antimicrobiana foi possível evidenciar que as nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo desestabilizam a parede e, posteriormente, a membrana celular, tendo como alvo estruturas e não processos celulares presumiu-se que as nanopartículas seriam eficazes não apenas contra bactérias planctônicas em crescimento ativo, mas também contra células sésseis, promovendo um acúmulo de nanopartículas no biofilme. Portanto, a CEBM foi investigada com intuito de checar essa hipótese.

Primeiramente, foi avaliada a concentração inibitória mínima do biofilme (CIBM) para a quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL contra *S. aureus* DSM 1104, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* DSM 20044 e *K. oxytoca* DSM 5175 através de análise visual após 24 h de tratamento. Pode-se observar na Tabela 5 que as NPs-Q/RL inibiram o crescimento dos biofilmes de *Staphylococcus* spp. em concentrações substancialmente mais baixas do que a quitosana e o ramnolipídeo individualmente. Já para a bactéria Gram-negativa *K. oxytoca*, as NPs-Q/RL não apresentaram ação inibitória, sendo os biofilmes inibidos apenas pela maior concentração de quitosana testada em concordância com os resultados obtidos para o ensaio de atividade antimicrobiana em células planctônicas (Tabela 3).

5 Resultados e Discussão

Tabela 5 – Valores de CIBM da quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL após 24 h de tratamento a 37 °C.

Linhagens	Q	NPs-RL	NPs-Q	NPs-Q/RL
	CIBM	CIBM	CIBM	CIBM
$\mu\text{g mL}^{-1}$				
<i>S. aureus</i> ^a	232	150	>92	58/75
<i>S. aureus</i> ^b	464	300	>92	116/150
<i>S. epidermidis</i>	116	>600	92	58/75
<i>K. oxytoca</i>	464	>600	>92	>232/300

^a *S. aureus* DSM 1104, ^b *S. aureus* ATCC 29213.

Fonte: Autoria própria.

A partir das concentrações em que não foi constatado crescimento visual após 24 h de tratamento foi feita a quantificação das UFC mL⁻¹ com intuito de confirmar os dados qualitativos como pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 – Quantificação das células viáveis dos biofilmes de *S. aureus* DSM 1104 (a), *S. aureus* ATCC 29213 (b), *S. epidermidis* DSM 20044 (c) e *K. oxytoca* DSM 5175 (d) após 24 h de exposição aos compostos. Os dados são apresentados como a média $\pm$ s.d. de três experimentos independentes. * indica a diferença significativa em relação ao controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, $n = 3$).

Fonte: Autoria própria.

Assim como observado previamente, as NPs-Q/RL foram efetivas em concentrações menores para *Staphylococci* quando comparadas aos demais compostos, com o número de células viáveis abaixo do limite de detecção do ensaio nas concentrações de 58/75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as linhagens de *S. aureus* DSM 1104 e *S. epidermidis*. Do mesmo modo, as NPs-Q/RL não foram eficazes em eliminar os biofilmes de *K. oxytoca*, exceto para a maior concentração de quitosana.

Além da CIBM e da quantificação das UFC mL^{-1} , a eficácia dos antimicrobianos contra biofilmes também pode ser avaliada através da determinação da concentração necessária para eliminar até a última célula viável restante no biofilme - conhecido como ensaio de determinação da concentração mínima de erradicação (CEBM). Nenhum dos compostos foi capaz de erradicar o biofilme após 72 h nas concentrações testadas (Tabela 6). Concluiu-se que apesar da incapacidade de detectar células viáveis na contagem das UFC, o biofilme contém algumas células viáveis restantes que podem se restabelecer no meio de cultura quando o tratamento é removido.

A tolerância aos antimicrobianos no biofilme é multifatorial abrangendo mecanismos físicos, fisiológicos e adaptativos, além da resistência convencional (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016). Levando em consideração os mecanismos físicos, a difusão das nanopartículas no biofilme pode ser afetada pelo tamanho e carga.

Tabela 6 – Valores de CEBM da quitosana, NPs-RL, NPs-Q e NPs-Q/RL após 24 h de tratamento a 37 °C. Dados coletados após 72 h de incubação da microplaca de recuperação a 37 °C

Linhagens	Q	NPs-RL	NPs-Q	NPs-Q/RL
	CEBM	CEBM	CEBM	CEBM
	$\mu\text{g mL}^{-1}$			
<i>S. aureus</i> ^a	>464	>600	>92	>232/300
<i>S. aureus</i> ^b	>464	>600	>92	>232/300
<i>S. epidermidis</i>	>464	>600	>92	>232/300
<i>K. oxytoca</i>	>464	>600	>92	>232/300

^a *S. aureus* DSM 1104, ^b *S. aureus* ATCC 29213.

Fonte: Autoria própria.

Estudos anteriores relataram que nanopartículas maiores que 200 nm podem limitar a penetração nos biofilmes, dependendo da densidade do biofilme (LIU et al., 2019). Além disso, a concentração necessária para erradicar os biofilmes é cerca de 1000 vezes mais alta que para as mesmas células crescendo livremente. Essa diferença na susceptibilidade

entre células planctônicas e biofilmes foi observada para todos as nanopartículas testadas, sendo mais resistentes ao tratamento quando organizadas em biofilmes (Tabela 5 e 6). Por outro lado, a carga negativa da matriz e a presença de eDNA e polissacarídeos podem funcionar como agentes quelantes para nanopartículas carregadas positivamente (FLEMMING; WINGENDER, 2010; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

A tolerância fisiológica devido às taxas metabólicas e de crescimento reduzidas e à expressão de fatores de proteção específicos também pode estar relacionada a dificuldade em erradicar biofilmes. Nas regiões mais afastadas da superfície a disponibilidade nutricional e a aeração são menores, o que leva a coexistência de duas populações: uma população metabolicamente ativa e, outra em estado dormente na qual encontram-se os microrganismos viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) e bactérias persistentes. Além disso, dado a elevada proporção de células estacionárias no biofilme, espera-se a predominância de células persistentes, que podem restabelecer a infecção (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016). Portanto, se as partículas não se difundirem na matriz do biofilme e acessarem as camadas mais afastadas da superfície, algumas células podem sobreviver ou desenvolver tolerância (SINGH, S. et al., 2017; SONG; DUPERTHUY; WAI, 2016).

Outra explicação para a dificuldade de encontrar CEBM pode ser atribuída à indução da dispersão, representada pela transição de biofilme para estado de vida planctônico, ocasionada pelo tratamento. A virulência de células dispersas pode contribuir para a notória dificuldade de tratar infecções crônicas (CHUA et al., 2014; FLEMMING et al., 2016).

A Figura 31 ilustra a hipótese de que as NPs-Q/RL adsorvem aos biofilmes, mas não necessariamente penetram nas camadas mais profundas devido ao tamanho da partícula e a forte interação promovida entre os grupos NH_3^+ da quitosana com a matriz extracelular carregada negativamente do biofilme. Contudo, se as nanopartículas liberarem outro composto antimicrobiano que se difunda mais prontamente através da matriz seria possível atingir todo o volume do biofilme e alcançar o efeito desejado.

Figura 31 – Ilustração da interação das NPs-Q/RL com o biofilme de *Staphylococcus* spp.

Fonte: Autoria própria.

5.7.3 Visualização das células viáveis no biofilme

Para confirmar o mecanismo de ação proposto no item 5.7.2, a distribuição de células vivas e mortas no biofilme foi visualizada por CLSM após tratamento com as diferentes amostras (Figura 32).

As imagens 2D da camada de células na parte inferior do biofilme mostraram um forte contraste entre os biofilmes tratados com NPs-Q/RL em comparação com os demais compostos. Esse efeito era esperado, uma vez que, essas nanopartículas mostraram um efeito de erradicação na maioria das células viáveis do biofilme, enquanto a quitosana e o ramnolipídeo isoladamente deixaram a maioria das células viáveis nesta parte do biofilme ao final do tratamento (Figura 32a-d). Comparando-se as imagens 3D dos biofilmes tratados com as NPs-Q e NPs-Q/RL observou-se que a perda da viabilidade celular ocorre predominantemente na superfície do biofilme para as primeiras, enquanto para as nanopartículas combinadas é possível observar que as camadas mais afastadas da superfície também são atingidas (Figura 32e-f).

Este estudo demonstra que, embora as nanopartículas Q/RL liguem-se a matriz do biofilme e não sejam capazes de alcançar as bactérias nas regiões mais afastadas do biofilme, elas podem ser um veículo eficaz na liberação de outros antimicrobianos que se difundirão no biofilme. Estes resultados são muito encorajadores para a perspectiva do uso de nanopartículas antimicrobianas em conjunto com outras abordagens para alcançar uma melhor difusão tecidual no tratamento de infecções crônicas.

Figura 32 – Imagens 2D CLSM (a-d) da camada inferior das células nos biofilmes de *S. aureus* ATCC 29213, mostrando células viáveis coradas com SYTO60 (vermelho) e células mortas coradas com TOTO-1 (verde): biofilmes não tratados (a) ou tratados por 24 h com 116 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosana (b), 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-RL (c) e 116/150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NPs-Q/RL (d). Visualização 3D dos biofilmes tratados com NPs-Q (e) e com NPs-Q/RL (f) mostram que as NPs-Q mataram apenas as bactérias no topo do biofilme, enquanto as NPs-Q/RL foram eficazes em todo o biofilme.

Fonte: Autoria própria.

5.8 Ensaio de citotoxicidade

A seletividade por células bacterianas é crítica para todos os novos antimicrobianos. Com intuito de checar essa seletividade foi avaliada a citotoxicidade da

5 Resultados e Discussão

quitosana e das NPs-RL e NPs-Q/RL em células endoteliais de veia umbilical humana utilizando o método do MTT. As células foram cultivadas em diluições seriadas das amostras em meio de cultura (Figura 33a-c). A faixa de concentração testada foi escolhida para exceder a concentração bactericida encontrada nos ensaios de atividade antimicrobiana e estar dentro da faixa testada em outros estudos de nanopartículas semelhantes (LU; LV; LE, 2019; MÜLLER et al., 2017).

Figura 33 - Viabilidade celular de células HUVEC (%) após o tratamento com quitosana (a), NPs-RL (b) e NPs-Q/RL (c). * indica diferença significativa em relação ao controle sem tratamento (ANOVA, $p < 0.05$, $n=3$).

Fonte: Autoria própria.

Nenhum dos compostos foram citotóxicos contra as células HUVEC em concentrações $\geq 4 \times \text{CIM}$. Para as NPs-Q/RL verificou que em concentrações $\leq 116/150 \mu\text{g mL}^{-1}$ não ocorreu efeito prejudicial na viabilidade celular após 24 h (Figura 33c). Entretanto, as concentrações mais altas resultaram em uma diminuição significativa na viabilidade celular devido provavelmente ao aumento da captação das nanopartículas pelas células (LU; LV; LE, 2019).

As NPs-RL foram as que apresentaram maior citotoxicidade entre as amostras testadas. Esses resultados corroboram com outros estudos de citotoxicidade para surfatantes. Müller et al. (2017) não observaram citotoxicidade a fibroblastos em concentrações de ramnolípídeo $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em outros estudos, os surfatantes foram testados em células cancerígenas e apresentaram citotoxicidade através da interação com os fosfolípídeos da membrana, aumentando a permeabilidade e gerando o rompimento da bicamada. Esses dados ampliam as vertentes de aplicações dos surfatantes no tratamento de células cancerígenas (DUARTE et al., 2014; OTZEN, 2017).

Contudo, a comparação da viabilidade celular das células tratadas com as NPs-Q/RL mostrou que a combinação da quitosana com o ramnolípídeo em nanopartículas diminuiu visivelmente a citotoxicidade do ramnolípídeo. Lu; Lv; Le (2019), assim como neste estudo, observaram que o aumento da concentração de quitosana revestindo nanopartículas de PLGA aumentaram a viabilidade celular indicando um efeito positivo da combinação.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo é o primeiro a desenvolver nanopartículas antimicrobianas através da combinação de quitosana/ramnolipídeo utilizando método de baixo custo, sustentável e reprodutível. Demonstrou-se que a adição do biosurfatante na síntese dessas nanopartículas resulta não somente em partículas menores, mais monodispersas e mais estáveis, como também em atividade antimicrobiana superior contra *Staphylococcus* spp. A eficácia da atividade antibacteriana é atribuída ao aumento da concentração local de quitosana e ramnolipídeo para interagir com a superfície celular bacteriana, permitindo eficiente liberação de ambos os compostos aos seus alvos moleculares em bactérias Gram-positivas. Entretanto, esse efeito não ocorre em Gram-negativas devido às diferenças estruturais e composição da parede celular. As nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo aumentam o efeito antimicrobiano, tanto contra bactérias planctônicas quanto em biofilmes, devido à interação eletrostática entre os grupos amino protonados da quitosana e as cargas negativas da parede celular e matriz extracelular, resultando na liberação sítio-específica de quitosana e ramnolipídeo. Vale ressaltar que as nanopartículas não são citotóxicas nas concentrações inibitórias frente às bactérias sensíveis. Este estudo mostra que a combinação de quitosana/ramnolipídeo em nanopartículas pode aumentar a eficácia antimicrobiana desses compostos, sendo um recurso a ser explorado em aplicações médicas e alimentares. A utilização destas nanopartículas é promissora para o tratamento de infecções recalcitrantes que demandam o desenvolvimento de alternativas mais eficazes para controle e erradicação de patógenos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Boletim segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº 17**: avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017. Brasília, 2019. Disponível em:<<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZTFiOGRhOTYtYzZjOS00NmZmLWE5MWUtN2RkNDhiZGJiOGE1IiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>>. Acesso em: 19 set. 2019.
- ALISHAHI, A. Antibacterial effect of chitosan nanoparticle loaded with nisin for the prolonged effect. **Journal of Food Safety**, v.34, p.111-118, 2014.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n.7, p.397-409, 2018.
- BAI, L; MCCLEMENTS, D.J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.479, p.71-79, 2016.
- BAKER, S. A Return to the pre-antimicrobial era?. **Science**, v.347, p.1064-1066, 2015.
- BENINCASA, M. et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.85, p.1-8, 2004.
- BHATKHANDI, D.S.; PANGARKAR, V.G.; BEENACKERS, A.A.C.M. Photocatalytic degradation for environmental applications – a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.77, p.102-116, 2001.
- BI, H.Y.; LI, Y. Preparation of rhamnolipid-layered double hydroxide nanocomposite for removing p-cresol from water. **Adsorption Science & Technology**, v.36, p.233-246, 2018.
- BISWAS, S. et al. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. **Carbohydrate Polymers**, v.121, p.403-410, 2015.
- BJARNSHOLT, T. et al. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.12, p.791-808, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto em UTIs de 119 hospitais permite salvar 558 vidas**. 2019. Disponível em:<<http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45309-projeto-em-utis-de-119-hospitais-permitiu-salvar-558-vidas>>. Acesso em: 19 set. 2019.
- BRISSE, S.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. The Genus *Klebsiella*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3rded. New York: Springer, 2006. v.6, p.159-196.
- BRUGNEROTTO, J. et al. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v.42, p.9921-9927, 2001.

BUTLER, M.S.; BLASKOVICH, M.A.T.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. **The Journal of Antibiotics**, v.70, p.3-24, 2017.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.63, p.125-132, 1997.

CAMPANA-FILHO, S.P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Química Nova**, v.30, n.3, p.644-650, 2007.

CARDILE, A.P. et al. Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance in vitro. **BMC Research Notes**, v.7, p.1-9, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Healthcare-associated infections (HAI)** – diseases and organisms in healthcare settings. 2011. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>>. Acesso em: 5 set. 2019.

_____. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2019.

_____. **Healthcare-associated infections (HAI)** – type of infections. 2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/infectiontypes.html>>. Acesso em: 5 set. 2019.

_____. **Healthcare-associated infections (HAI)** – HAI data. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/data/portal/index.html>>. Acesso em: 5 set. 2019.

CHANDRASENKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituent analysis of glycosaminoglycans. In: WHISTLER, R.L.; WOLFROM, M.L. (Ed.). **Methods in carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1980. p.89-96.

CHANDUMPAI, A. et al. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.467-474, 2004.

CHEOW, W.S.; HADINOTO, K. Lipid-polymer hybrid nanoparticles with rhamnolipid-triggered release capabilities as anti-biofilm drug delivery vehicles. **Particuology**, v.10, p.327-333, 2012.

CHONG, H.; LI, Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. **Microbial Cell Factories**, v.16, p.1-12, 2017.

CHUA, S.L. et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nature Communications**, v.5, p.1-12, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M7-A9: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 9.ed. Wayne, 2012.

- COSTERTON, J.W. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, n.3, p.137-140, 1995.
- DIVYA, K. et al. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: mode of action and factors affecting activity. **Fibers and Polymers**, v.18, p.221-230, 2017.
- DUARTE, C. et al. Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. **AMB Express**, v.4, p.1-12, 2014.
- EAVES, F.; NAHAI, F. Anaplastic large cell lymphoma and breast implants: FDA report. **Aesthetic Surgery Journal**, v.31, n.4, p.467-468, 2011.
- ELLIOTT, C.; JUSTIZ-VAILLANT, A. Nosocomial infections: a 360-degree review. **International Biological & Biomedical Journal**, v.4, n.2, p.72-81, 2018.
- FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.90, p.21-27, 2012.
- FELDMAN, C. et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia at an urban general hospital. **Journal of Infection**, v.20, p.21-31, 1990.
- FELDMAN, M.D. et al. Who is responsible for evaluating the safety and effectiveness of medical devices? The Role of independent technology assessment. **Journal of General Internal Medicine**, v.23, p.57-63, 2008.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The Biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.623-633, 2010.
- FLEMMING, H.C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p.563-575, 2016.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Medical devices**. 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices>>. Acesso em: 9 set. 2019.
- FREDERIKSEN, B. et al. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme®) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. **Acta Paediatrica**, v.95, p.1070-1074, 2006.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6thed. New York: Wiley BlackWell, 2010. v.1.
- GARNER, J.S. et al. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American Journal of Infection Control**, v.16, n.3, p.128-140, 1988.
- GAVHANE, Y.N.; GURAV, A.S.; YADAV, A.V. Chitosan and its applications: a review of literature. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, n.1, p.312-331, 2013.
- GONTSARIK, M. et al. From structure to function: pH-switchable antimicrobial nano-self-assemblies. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.11, n.3, p.2821-2829, 2019.

- GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K.H. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3rded. New York: Springer, 2006. v.4, p.5-75.
- HANSEN, D.S.; GOTTSCHAU, A.; KOLMOS, H.J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **The Journal of Hospital Infection**, v.38, n.2, p.119-132, 1998.
- HAQUE, M. et al. Health care-associated infections – an overview. **Infection and Drug Resistance**, v.11, p.2321-2333, 2018.
- HASHAD, R.A. et al. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: optimization of formulation parameters for improving process yield at a novel pH using artificial neural networks. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.86, p.50-58, 2016.
- HELVACI, S.S.; PEKER, S.; ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.35, p.225-233, 2004.
- HEMEG, H.A. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.8211-8225, 2017.
- HIEMENZ, P.C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. New York: CRC Press, 1997.
- HOLT, J.G. et al. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9thed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- HORN, M.M. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 2012. 145f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.239-243, 2009.
- HOWARD, S.J.; HOPWOOD, S.; DAVIES, S.C. Antimicrobial resistance: a global challenge. **Science**, v.6, p.1-2, 2014.
- HUH, A.J.; KWON, Y.J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v.156, p.128-145, 2011.
- HUNTER, R.J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. New York: Academic Press, 1981.
- HUSSAIN, S. et al. Antibiotic-loaded nanoparticles targeted to the site of infection enhance antibacterial efficacy. **Nature Biomedical Engineering**, v.2, n.2, p.95-103, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Nanotechnologies** - plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series. 2017.

Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:18401:ed-1:v1:en>>. Acesso em: 1 set. 2019.

JAMIL, B.; BOKHARI, H.; IMRAN, M. Mechanism of action: how nano-antimicrobials act?. **Current Drug Targets**, v.18, p.363-373, 2017.

JANDA, J.M. New members of the family *Enterobacteriaceae*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3rded. New York: Springer, 2006. v.6, p.5-40.

JEON, S.J. et al. Underlying mechanism of antimicrobial activity of chitosan microparticles and implications for the treatment of infectious diseases. **Plos One**, v.9, n.3, p.1-10, 2014.

JONASSEN, H.; KJONIKSEN, A.L.; HIORTH, M. Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v.290, n.10, p.919-929, 2012a.

_____. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. **Biomacromolecules**, v.13, p.3747-3756, 2012b.

JØRGENSEN, N.P. et al. Streptokinase treatment reverses biofilm-associated antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, v.4, n.36, p.1-12, 2016.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.84, p.163-171, 2011.

KHAN, H.A.; BAIG, F.K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.7, n.5, p.478-482, 2017.

KIM, L.H. et al. Physicochemical interactions between rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 3718-3726, 2015.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p.51-63, 2010.

KRAVANJA, G. et al. Chitosan-based (nano)materials for novel biomedical applications. **Molecules**, v.24, n.10, p.1-23, 2019.

KURITA, K. et al. Squid chitin as a potencial alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science: part A polymer chemistry**, v.31, p.485-491, 1993.

KVÍTEK, L. et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). **The Journal of Physical Chemistry**, v.112, n.15, p.5825-5834, 2008.

- LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.22-32, 1999.
- LAOKULDILOK, T. et al. Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of chitooligosaccharides produced using three different enzyme treatments. **Food Bioscience**, v.18, p.28-22, 2017.
- LAVERTU, M. et al. A Validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, n.6, p.1149-1158, 2003.
- LEBRÓN-PALER, A. et al. Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. **Analytical Chemistry**, v.78, p.7649-7658, 2006.
- LEE, J.Y.H. et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. **Nature Microbiology**, v.3, p.1175-1185, 2018.
- LEE, R.J. et al. Two formation mechanisms and renewable antioxidant properties of suspensible chitosan-PPy and chitosan-PPy-BTDA composites. **Synthetic Metals**, v.164, p.6-11, 2013.
- LI, X. et al. Surface treatments on titanium implants via nanostructured ceria for antibacterial and anti-inflammatory capabilities. **Acta Biomaterialia**, v.94, p.627-643, 2019.
- LIU, Y. et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. **Chemical Society Reviews**, v.48, p.428-446, 2019.
- LOTFABAD, T.B.; SHAHCHERAGHI, F.; SHOORAJ, F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.6, p.29-35, 2013.
- LOWE, C. et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.8, p.1242-1247, 2012.
- LU, B.; LV, X.; LE, Y. Chitosan-modified PLGA nanoparticles for control-released drug delivery. **Polymers**, v.11, n.2, p.1-14, 2019.
- LUQUE-ALCARAZ, A.G. et al. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. **Royal Society of Chemistry**, v.6, p.59250-59256, 2016.
- MA, Z.; GARRIDO-MAESTU, A.; JEONG, K.C. Application, mode of action, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.176, p.257-265, 2017.
- MADUREIRA, A.R. et al. Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. **Journal of Food Engineering**, v.167, p.210-216, 2015.

- MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer nano series**: user manual. United Kingdom, 2013.
- MAO, S. et al. The Depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v.281, p.45-54, 2004.
- MARANGON, C.A. et al. Chitosan/gelatin/copaiba oil emulsion formulation and its potential on controlling the growth of pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, v.99, p.163-171, 2017.
- MCINTYRE, W.F.; HEALEY, J.S. Cardiac implantable electronic device infections: from recognizing risk to prevention. **Heart Rhythm**, v.14, n.6, p.846-847, 2017.
- MEKKAWY, A.I. et al. In Vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.759-777, 2017.
- MELLEGARD, H. et al. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. **International Journal of Food Microbiology**, v.148, p.48-54, 2011.
- MÉNDEZ, P.A. et al. Chitosan/OA nanoparticle as delivery system for celecoxib: parameters affecting the particle size, encapsulation, and release. **Journal of Applied Polymer Science**, v.134, p.1-11, 2017.
- MILES, A.A.; MISRA, S.S.; IRWIN, J.O. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Hygiene**, v.38, n.6, p.732-749, 1938.
- MOHAMMED, M.A. et al. An Overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. **Pharmaceutics**, v.9, p.1-26, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOURA, M.R. et al. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. **Journal of Food Engineering**, v.92, p.448-453, 2009.
- MÜLLER, F. et al. Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.116, p.31-37, 2017.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **HSDB**: sodium acetate. 1993. Disponível em: <<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+688>>. Acesso em: 7 nov. 2019.
- NIELSEN, C.K. et al. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.242, p.7-12, 2017.

- NITSCHKE, M.; SILVA, S.S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.58, n.4, p.631-638, 2018.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.2066-2074, 2010.
- NO, H.K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.65-72, 2002.
- OGUNSONA, E.O. et al. Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: a review. **Applied Materials Today**, 2019. Doi: 10.1016/j.apmt.2019.100473.
- OH, J.W.; CHUN, S.C.; CHANDRASEKARAN, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against phytopathogens of tomato. **Agronomy**, v.9, p.1-12, 2019.
- OKSHEVSKY, M.; MEYER, R.L. Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v.105, p.102-104, 2014.
- OMMEN, P.; ZOBOK, N.; MEYER, R.L. Quantification of biofilm biomass by staining: non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v.141, p.87-89, 2017.
- O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally**. Final report and recommendations to the review of antimicrobial resistance. United Kingdom, 2016.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **No dia mundial de higienização das mãos, OMS alerta para prevenção da sepse nos cuidados de saúde**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5657:no-dia-mundial-de-higienizacao-das-maos-oms-alerta-para-prevencao-da-sepse-nos-cuidados-de-saude&Itemid=812>. Acesso em: 19 set. 2019.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.555-567, 2009.
- OTZEN, D. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but different? **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1859, p.639-649, 2017.
- PARANI, M. et al. Engineered nanomaterials for infection control and healing acute and chronic wounds. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.8, p.10049-10069, 2016.
- PATRO, L.P.P; RATHINAVELAN, T. Targeting the sugary armor of *Klebsiella* species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.9, p.1-23, 2019.

- PATSILINAKOS, A. Machine learning analyses on data including essential oil chemical composition and in vitro experimental antibiofilm activities against *Staphylococcus* species. **Molecules**, v.24, n.5, p.1-26, 2019.
- PÉREZ-VAZQUEZ, M. et al. Characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016-2017. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.63, n.6, p.1-26, 2019.
- PILON, L. et al. Chitosan nanoparticle coatings reduce microbial growth on fresh-cut apples while not affecting quality attributes. **International Journal of Food Science & Technology**, v.50, p.440-448, 2015.
- PODSCHUNG, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.4, p.589-603, 1998.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O. et al. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v.99, p.1589-1595, 2008.
- RABEA, E.I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-1465, 2003.
- RADOVIC-MORENO, A.F. et al. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. **ACS Nano**, v.6, n.5, p.4279-4287, 2012.
- RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v.455, p.219-228, 2013.
- RASYID, N.Q. et al. Suspension stability and characterization of chitosan nanoparticle-coated ketoprofen based on surfactants oleic acid and poloxamer 188. **Makara Journal of Science**, v.18, n.3, p.86-90, 2014.
- RAYMOND, L.; MORIN, F.G.; MARCHESSAULT, H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v.246, p.331-336, 1993.
- RIBEIRO, S.M. et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. **Pharmacology and Therapeutics**, v.160, p.133-144, 2016.
- RIENZO, M.A.D. et al. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.363, p.1-8, January 2016.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p.603-632, 2006.
- RODRIGUES, A.I. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. **Scientific Reports**, v.7, p.1-9, 2017.

- SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivates: a review of the structure-activity relationship. **Biomacromolecules**, v.18, n.11, p.3846-3868, 2017.
- SÁNCHEZ, M. et al. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.307, p.246-253, 2007.
- SANTOS, J.E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v.13, n.4, p.242-249, 2003.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS. **The Appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies**. 2006. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_003b.pdf>. Acesso em: 1 set. 2019.
- SHAO, B. et al. Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: a review. **Microbiological Research**, v.200, p.33-44, 2017.
- SHEK, K. et al. Rate of contamination of hospital privacy curtains in a burns/plastic ward: a longitudinal study. **American Journal of Infection Control**, v.46, n.9, p.1019-1021. 2018.
- SILVA, S.S. et al. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.10, p.7864-7873, 2017.
- SINGH, L.; CARIAPPA, M.P.; KAUR, M. *Klebsiella oxytoca*: an emerging pathogen?. **Medical Journal Armed Forces India**, v.62, p.S59-S61, 2016.
- SINGH, P. et al. Production of biosurfactant stabilized nanoparticles. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.8, p.701-707, 2017.
- SINGH, S. et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agentes. **The Open Microbiology Journal**, v.11, p.53-62, 2017.
- SONESSON, A. et al. Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. **Scientific Reports**, v.7, p.1-12, 2017.
- SONG, T.; DUPERTHUY, M.; WAI, S.N. Sub-optimal treatment of bacterial biofilms. **Antibiotics**, v.5, p.1-18, 2016.
- SOTELO-BOYÁS, M.E. et al. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v.77, p.15-20, 2017.
- SOTIROVA, A.V. et al. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, v.56, p.639-644, 2008.

- SOUTHWOOD, R. T. et al. Infection in experimental hip arthroplasties. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.67, p.229-231, 1985.
- SREEKUMAR, S. et al. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles. **Scientific Reports**, v.8, p.1-11, 2018.
- SUDARSHAN, N.R.; HOOVER, D.G.; KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**, v.6, n.3, p.257-272, 1992.
- SUITCHARIT, C. et al. Preparation of depolymerized chitosan and its effect on dyeability of mangosteen dye. **Chiang Mai Journal of Science**, v.38, n.3, p.473-484, 2011.
- TORRES, M.A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TOYOFUKU, M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.80, p.7-12, 2016.
- VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v.232, p.389-397, 2017.
- VATANPARAST, H. The Role of electrostatic repulsion on increasing surface activity of anionic surfactants in the presence of hydrophilic silica nanoparticles. **Scientific Reports**, v.8, p.1-11, 2018.
- VAUDAUX, P. et al. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.160, n.5, p.865-875, 1989.
- VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v.84, n.2, p.377-410, 2012.
- VOGEL, A.I. **Química analítica qualitativa**. 5.ed. São Paulo: Mestre Jou, 1981.
- WANG, H.; REN, J.; ZHANG, Y. Use of *p*-dimethylaminobenzaldehyde as a coloured reagent for determination of gentamycin. **Talanta**, v.40, n.6, p.851-853, 1993.
- WEINER, L.M. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.37, n.11, p.1288-1301, 2016.
- WINN, W. et al. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide.** 2002. Disponível em:<<https://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/whodscsreph200212.pdf?ua=1>>. Acesso em: 19 set. 2019.

_____. **Global health and aging.** 2011. (Technical Report). Disponível em:<https://www.who.int/ageing/publications/global_health.pdf>. Acesso em: 19 set. 2019.

YU, Y. et al. Therapeutic nanoplatforms with bacteria-specific activation for directional transport of antibiotics. **The Royal Society of Chemistry**, v.54, p.12754-12757, 2018.

YUAN, Y. et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vehicles based on atomic force microscopy study. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.41, n.6, p.515–526, 2009.

APÊNDICE A

Atividade antimicrobiana da solução de quitosana despolimerizada (Q), nanopartículas de ramnolipídeo (NPs-RL) e nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) contra bactérias patogênicas em MHB pH 7,4.

Linhagens	Q		NPs-RL		NPs-Q/RL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	$\mu\text{g mL}^{-1}$					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	116	116	>600	>600	58/75	58/75
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	232	>232	>600	>600	>116/150	>116/150
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis ATCC 13076	232	>232	>600	>600	232/300	>116/150

APÊNDICE B

Atividade antimicrobiana da solução de quitosana despolimerizada (Q), nanopartículas de ramnolipídeo (NPs-RL) e nanopartículas de quitosana/ramnolipídeo (NPs-Q/RL) contra bactérias patogênicas em MHB pH 5,5.

Linhagens	Q		NPs-RL		NPs-Q/RL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	$\mu\text{g mL}^{-1}$					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14	116	37	75	7/9	29/37
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	29	>232	>600	>600	58/75	>116/150
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	14	>232	>600	>600	14/19	>116/150