UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de
amônio quaternário com atividade antimicrobiana

Letícia Dias de Melo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de
amônio quaternário com atividade antimicrobiana

Letícia Dias de Melo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Melo, Leticia Dias de
M528p Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de
amônio quaternário com atividade antimicrobiana / Leticia
Dias de Melo. -- São Paulo, 2010.
121p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Carmona-Ribeiro, Ana Maria

1. Microbiologia médica 2. Matéria nanoestrutura I. T.
II. Carmona-Ribeiro, Ana Maria, orientador.

616.01 CDD

Letícia Dias de Melo

Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de amônio
quaternário com atividade antimicrobiana

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais,
Maria Aparecida e Aparecido,
pela estrutura, orientação,
suporte e amor incondicional!

Ao meu futuro marido,
Fábio,
pelo incentivo, dedicação,
compreensão e paciência!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus! Pela saúde, determinação, sabedoria, força e coragem a mim concedidas para conseguir chegar até aqui.

À Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela oportunidade, pela confiança, pelos ensinamentos, conselhos, orientação e pelo exemplo de dedicação e entusiasmo à pesquisa!

À Dra. Elsa Mamizuka, pela apresentação à Prof^a Ana Maria e por me fazer ver que esta pesquisa poderia ser encantadora, como de fato foi! Obrigada pela colaboração!

Aos colegas do laboratório de Biocolóides, que muito contribuíram para a realização deste trabalho: Camilla, Julio, Bruna, Rodrigo, Renata, Mariana. Em especial à Lilian, minha amiga e companheira de experimentos, preocupações e conquistas!

À Dra. Denise F. Siqueira Petri, pela colaboração e pelos ensinamentos!

À Dra. Edla M. Abreu Pereira, pelos ensinamentos, discussões e colaboração!

Aos meus pais! Sem o apoio deles, jamais eu teria conseguido me manter em São Paulo, em todos os aspectos. Obrigada pelo esforço, carinho, compreensão, incentivo, educação, fé... Mãe, obrigada pela amizade, por dividir tudo comigo e ainda por sempre se dispor a passar alguns dias comigo! Pai, obrigada pela serenidade, pelas palavras e infinitas orações!

À Tia Vera, por passar o conhecimento em microbiologia de forma tão apaixonada, que eu me apaixonei pelos “bichinhos”. Obrigada pelo exemplo de dedicação e ensino!

Ao Fábio, por acompanhar cada momento desta dissertação. Obrigada pelos ouvidos, ombros, colo, conselhos, paciência... Dividir todas as minhas alegrias e angústias com você é essencial! Juntos nós somos mais!

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro à pesquisa do laboratório.

A todos que contribuíram, de maneira direta ou indireta, para que esse trabalho se realizasse!

Sê

Se não puderes ser um pinheiro, no topo de uma colina,

Sê um arbusto no vale, mas sê

O melhor arbusto à margem do regato.

Sê um ramo, se não puderes ser uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê um pouco de relva

E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,

Sê apenas uma senda,

Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.

Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que sejas.

(Pablo Neruda)

"Há cinco degraus para se alcançar a sabedoria: calar, ouvir, lembrar, agir, estudar."

RESUMO

MELO, L.D. **Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário com atividade antimicrobiana.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.

Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário (CAQ) foram caracterizados quanto a propriedades físicas e atividade contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Partículas híbridas foram obtidas a partir de fragmentos de bicamada (BF) de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), adicionados consecutivamente de soluções de carboximetilcelulose (CMC) e cloreto de poli (dialildimetilamônio) (PDDA) e, a seguir, caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico para determinação de distribuições de tamanho, diâmetro médio (Dz) e potencial-zeta (ζ). Filmes híbridos foram obtidos por revestimento rotacional de lamínulas de vidro a partir de uma solução clorofórmica de poli (metil metacrilato) (PMMA) e CAQ onde [PMMA] = 10 mg/mL e [CAQs] = 0,03 – 4 mM de DODAB, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ou brometo de tetrapropilamônio (TPAB). Molhabilidade dos filmes e difusibilidade dos CAQs nos filmes imersos em água foram avaliadas por determinação de ângulo de contato e de tensão superficial na interface ar-água, respectivamente. Atividade antimicrobiana foi avaliada por plaqueamento e contagem de viáveis, tanto para os filmes quanto para as partículas. Para os filmes, também foram determinados halos de inibição. Partículas de DODAB BF/ CMC/ PDDA exibiram Dz e ζ dependentes da concentração dos componentes. A 0,1 mM de DODAB, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA, foram obtidas partículas pequenas (Dz = 100 nm; ζ = 30 mV). Com 0,5 mM de DODAB, 0,5 mg/mL de CMC e 0,5 mg/mL de PDDA foram obtidas partículas grandes (Dz = 470 nm; ζ = 50 mV). Contra 10^7 UFC/mL, 1 - 2 μ g/mL de PDDA, sozinho em solução ou em forma de partículas, matou 99 % das células de *P. aeruginosa*. O mesmo ocorreu contra *S. aureus* (10^7 UFC/mL) em 10 μ g/mL de PDDA. A ação antimicrobiana mostrou-se dependente da quantidade de cargas positivas nas partículas e independente do tamanho da partícula. Filmes de PMMA/ CAQ apresentaram maior molhabilidade do que aqueles de PMMA puro. Filmes de PMMA/ DODAB e PMMA/ TPAB submersos em água não causaram alterações de tensão superficial na interface ar-água, indicando baixa difusibilidade destes CAQs a partir dos filmes. Filmes de PMMA/ CTAB submersos em água reduziram a tensão superficial até aproximadamente 60 mN/m, mostrando a difusibilidade do CTAB no filme e sua organização na interface ar-água. O efeito antimicrobiano dos filmes PMMA/ DODAB e PMMA/ CTAB foi dependente da concentração do CAQ utilizada no preparo do filme. Viabilidade celular de 0% contra 10^7 UFC/mL de ambas as bactérias ocorreu com 4 mM de DODAB ou, com 2 ou 0,2 mM de CTAB contra *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, respectivamente. Filmes de PMMA/ TPAB não apresentaram atividade antimicrobiana. Com a emergência de micro-organismos resistentes aos antibióticos, os novos nanomateriais antimicrobianos híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário podem representar uma alternativa de fácil obtenção e baixo custo.

Palavras-chave: Nanomateriais híbridos. Agentes antimicrobianos. Anfífilos catiônicos. Polieletrólitos catiônicos.

ABSTRACT

MELO, L.D. **Particles and films hybrid of polymers and quaternary ammonium compounds with antimicrobial activity.** 2010. Dissertation (Master Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, 2010.

Hybrid particles and films from polymers and quaternary ammonium compounds (QAC) were characterized regarding its physical properties and antimicrobial activity against strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 or *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Hybrid particles were obtained from dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) bilayer fragments (BF), consecutively added of carboximethylcellulose (CMC) and poly (diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) solutions, and then, characterized by dynamic light-scattering for determination of size distributions, z-average diameter (Dz) and zeta-potential (ζ). Hybrid films were obtained by spin-coating of a chloroformic solution of poly (methylmethacrylate) (PMMA) and QAC on glass coverslips at [PMMA] = 10 mg/mL and [QACs] = 0.03–4 mM where QACs were DODAB, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) or tetrapropylammonium bromide (TPAB). Films wettability and QACs diffusibility in the films immersed in water were evaluated by determinations of contact angle and surface tension at air-water interface, respectively. Antimicrobial activity was evaluated by plating and CFU counting both for particles and films. For the hybrid films, width of inhibition zone was also determined. DODAB BF/ CMC/ PDDA particles exhibited Dz and ζ dependent on the concentrations of the components. At 0.1 mM DODAB, 0.1 mg/mL CMC, and 0.1 mg/mL PDDA, small cationic particles were obtained (Dz = 100 nm; ζ = 30 mV). At 0.5 mM DODAB, 0.5 mg/mL CMC and 0.5 mg/mL PDDA, large cationic particles were obtained (Dz = 470 nm; ζ = 50 mV). At 10^7 CFU/mL, cell viability of 1 % for *P. aeruginosa* was obtained for PDDA in solution or covering particles at 1 or 2 μ g/mL PDDA, respectively. Against *S. aureus* (10^7 CFU/mL) at 10 μ g/mL PDDA, a similar result was obtained. The antimicrobial effect was dependent on the amount of positive charge on particles and independent on particle size. The hybrid films of PMMA/ QAC showed higher wettability than those of pure PMMA. PMMA/ DODAB and PMMA/ TPAB hybrid films, submerged in water, did not cause changes in surface tension at the air-water interface, indicating low diffusibility for both DODAB and TPAB in hybrid films. Films of PMMA/ CTAB, submerged in water, reduced the surface tension to about 60 mN/m, showing that CTAB could diffuse from the film to the air-water interface and change its surface tension. The antimicrobial effect of PMMA/ DODAB and PMMA/ CTAB hybrid films was clearly dependent on the QAC concentration used to prepare the films. Cell viability of 0% for *P. aeruginosa* and *S. aureus* (10^7 CFU/mL) occurred at 4 mM DODAB, or 2 and 0.2 mM CTAB, respectively. Films of PMMA/ TPAB showed no antimicrobial activity. With the emergence of microorganisms resistant to antibiotics, the novel hybrid antimicrobial nanomaterials may become important since they are inexpensive and easy to obtain.

Key words: Hybrid nanomaterials. Antimicrobial agents. Cationic amphiphiles. Cationic polyelectrolytes.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustração esquemática da formação de um biofilme	18
Figura 1.2	Adesão da célula bacteriana aos componentes do filme condicionante, sobre um substrato.....	19
Figura 1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 1.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 1.5	Representação esquemática de uma célula bacteriana e da estrutura da parede de bactérias Gram-positivas (GP) ou Gram-negativas (GN)	25
Figura 1.6	Viabilidade celular (%) de <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> em função da concentração de DODAB após 1 hora de interação bactérias-DODAB BF.....	28
Figura 1.7	Microscopia ótica dos filmes híbridos polímero-DODAB: (a) PS/ DODAB; (b) PMMA/ DODAB	35
Figura 1.8	Células de <i>E. coli</i> em lamínulas de vidro (A); em filme de PMMA (B); em filmes híbridos de PMMA/ DODAB (C e D). (Adaptado de PEREIRA <i>et al.</i> , 2008).	36
Figura 1.9	Obtenção de filmes híbridos de polímero (PMMA) e agente microbicida (CAQ) por revestimento rotacional.....	37
Figura 1.10	Possibilidades para dispersão e distribuição de aditivos em polímeros	38
Figura 1.11	Forças de atração presentes em moléculas no interior de um líquido e na interface líquido-ar.	39
Figura 1.12	Componentes de tensões superficiais necessários para a dedução da equação de Young.....	40
Figura 3.1	Dinamômetro ou Dynometer, equipamento utilizado para as medidas de tensão superficial na interface ar-água.	49
Figura 3.2	Determinação de halo de inibição de crescimento bacteriano (HI) pelos filmes híbridos (em verde) a partir das bordas da lamínula (em laranja)	51
Figura 4.1	Distribuição de tamanho dos fragmentos de bicamada de DODAB	52
Figura 4.2	Diâmetro médio (Dz) e potencial zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC em função da concentração de CMC.....	54
Figura 4.3	Diâmetro médio (Dz) e potencial zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDPA, ou partículas, em função da concentração de PDPA	56
Figura 4.4	Distribuição de tamanho das partículas pequenas (A) e grandes (B).....	58
Figura 4.5	Efeito de partículas híbridas pequenas sobre a viabilidade celular bacteriana (%) mostrada em função das concentrações finais de PDPA e DODAB.....	59

Figura 4.6	Viabilidade celular bacteriana (%) em função das concentrações finais de PDDA e DODAB combinados nas partículas grandes	60
Figura 4.7	Viabilidade celular (%) de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> após 1 hora (□) e 24 horas (○) de interação com as partículas híbridas pequenas	61
Figura 4.8	Viabilidade celular (%) de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> após 1 hora (□) e 24 horas (○) de interação com as partículas híbridas grandes	61
Figura 4.9	Sistema sensor para compostos antimicrobianos catiônicos desenvolvido por espécies de <i>Staphylococcus</i>	63
Figura 4.10	Viabilidade celular (%) em função das concentrações finais de PDDA e DODAB carregados pelas partículas pequenas (○) ou grandes (Δ)	65
Figura 4.11	Ângulos de contato de avanço (θ_A) ou recesso (θ_R) e histerese ($\Delta\theta$)	68
Figura 4.12	Tensão superficial (γ) na interface ar-água em função do tempo após imersão dos filmes híbridos de PMMA/ CAQ	70
Figura 4.13	Viabilidade celular bacteriana (%) em função da concentração de DODAB (□), CTAB (Δ) ou TPAB (○) em filmes híbridos de PMMA/ CAQ	71
Figura 4.14	Halo de inibição formado pelos filmes híbridos de PMMA/ CAQ	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Citotoxicidade diferencial de DODAB	29
Tabela 2.	Estruturas químicas do lípide catiônico e dos polieletrólitos e esquemas de seus arranjos.....	53
Tabela 3.	Composição e propriedades físicas de partículas pequenas e grandes.....	58
Tabela 4.	Concentrações do polieletrólito catiônico (PE) e/ou lípide catiônico (LC) necessárias para atingir 99 e 50% de morte celular.....	62
Tabela 5.	Estruturas químicas do polímero e dos CAQs utilizados na preparação dos filmes híbridos.....	67
Tabela 6.	Concentrações de CAQ nos filmes híbridos para 99% ou 50% de morte celular.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	Agar Mueller-Hinton
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BF	Fragmentos de Bicamada
CAQ	Compostos de Amônio Quaternário
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CMC	Carboximetilcelulose Sódica
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DODA	Sais de Dioctadecildimetilamônio
DODAB	Brometo de Dioctadecildimetilamônio
DODAB BF	Fragmentos de Bicamada de DODAB
DODAC	Cloreto de Dioctadecildimetilamônio
GN	Gram-negativa
GP	Gram-positiva
HI	Halo de Inibição
LC	Lípide Catiônico
LPS	Lipopolissacarídeo
NAG	N-acetilglicosamina
NAM	Ácido N-acetilmurânico
PALS	Análise de Fase de Luz Espalhada
PDADMAC	Cloreto de Poli (dialildimetilamônio)
PDDA	Cloreto de Poli (dialildimetilamônio)
PE	Polieletrólito Catiônico
PEG	Poli (etileno glicol)
PMMA	Poli (metil metacrilato)

PS	Poliestireno
SRE	Sistema Retículo-Endotelial
TPAB	Brometo de Tetrapropilamônio
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

γ	Tensão Superficial
θ	Ângulo de Contato
$\gamma_{S/V}$	Tensão Superficial na Interface Sólido-vapor
$\gamma_{S/L}$	Tensão Superficial na Interface Sólido-líquido
$\gamma_{L/V}$	Tensão Superficial na Interface Líquido-vapor
θ_A	Ângulo de Contato de Avanço
θ_R	Ângulo de Contato de Recesso
$\Delta \theta$	Histerese
D_z	Diâmetro Médio
ζ	Potencial-Zeta
μ	Mobilidade Eletroforética
η	Viscosidade
ε	Constante Dielétrica
δ	Desvio padrão Médio

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. MULTIRRESISTÊNCIA, INFECÇÃO HOSPITALAR, BIOFILMES E A NECESSIDADES DE MATERIAIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	16
1.2. MICRO-ORGANISMOS COMO MODELOS DE SUPERFÍCIES BIOLÓGICAS	20
1.3. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	21
1.4. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	23
1.5. COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	26
1.6. POLIELETROLITOS E BICAMADAS LIPÍDICAS COMPODO A ESTRUTURA DE PARTÍCULAS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	30
1.7. FILMES E SUPERFÍCIES COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	32
1.8. TENSÃO SUPERFICIAL E ÂNGULO DE CONTATO	38
2. OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVO GERAL	43
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS	44
3.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FRAGMENTOS DE BICAMADA DE DODAB	44
3.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS DE POLIELETROLITOS E DODAB.....	45
3.4. DETERMINAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO, DIÂMETRO MÉDIO E POTENCIAL-ZETA DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS.....	46
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS	47
3.6. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES HÍBRIDOS DE POLÍMERO E COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO.....	47
3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES HÍBRIDOS	49
3.7.1. <i>Contagem de viáveis pelo método do plaqueamento</i>	49
3.7.2. <i>Halo de inibição</i>	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. CONSTRUÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS PEQUENAS E GRANDES	52
4.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PARTÍCULAS HÍBRIDAS PEQUENAS E GRANDES.....	59
4.3. FILMES HÍBRIDOS: MOLHABILIDADE E DIFUSIBILIDADE DE CAQS NOS FILMES	66
4.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES HÍBRIDOS	71
4.4.1. <i>Contagem de viáveis pelo método do plaqueamento</i>	71
4.4.2. <i>Halo de inibição</i>	73
5. CONCLUSÕES	77
6. PERSPECTIVAS	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Multirresistência, infecção hospitalar, biofilmes e a necessidades de materiais com propriedades antimicrobianas

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema de magnitude global, que vem tornando cada vez mais difícil o tratamento de doenças infecciosas, principalmente em pacientes hospitalizados (CARMELI, 2008). O fenômeno da resistência aos antimicrobianos é evidente dentro do ambiente hospitalar, já que a pressão exercida pelo uso de antimicrobianos pode favorecer o aumento nas taxas de mutação bacteriana, além de selecionar os micro-organismos mais adaptados ou resistentes. O impacto da resistência gera a falência do tratamento e por consequência um aumento nos custos e no número de óbitos por infecção hospitalar (FERNANDES *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., alguns membros da família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. são amplamente conhecidos pela sua virulência e capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos e, provavelmente por este motivo, representam os principais micro-organismos isolados em casos de infecção hospitalar (CARMELI, 2008).

O uso de dispositivos médico-hospitalares implantados é cada vez maior, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e até a taxa de sobrevivência dos pacientes. No entanto, uma vez que estão implantados, são sítios de competição entre as células do hospedeiro e células microbianas (TAMILVANAN *et al.*, 2008). O trato urinário é o sítio mais comum de infecções nosocomiais, principalmente as infecções associadas com cateteres, podendo atingir mais de 400 mil pacientes ao ano em hospitais norte-americanos (KLEVENS *et al.*, 2007). Infecções relacionadas a cateteres também são a causa mais comum de endocardites hospitalares, tendo como principais fatores de risco a duração da cateterização e o local anatômico da inserção do cateter venoso central (COREY & LALANI, 2008; FALCONE *et al.*, 2009). Já dentre as infecções de sítios cirúrgicos, as relacionadas a implantes ortopédicos são de grande importância para a saúde pública, considerando a constante incidência de infecções hospitalares associadas com estes procedimentos, podendo levar à perda do implante e necessidade de uma nova

cirurgia, ou até mesmo à morbidade/ mortalidade do paciente (BERBARI *et al.*, 1998; KÄLICHE *et al.*, 2006).

Mas a crescente ocorrência de infecções no ambiente hospitalar associadas com implantes e dispositivos médico-hospitalares não é uma mera coincidência. Biofilmes desempenham um papel fundamental no que se referem a infecções hospitalares, especialmente àquelas relacionadas com estes biomateriais, tais como cateteres intravasculares, cateteres urinários e implantes ortopédicos (FRANCOLINI & DONELLI, 2010). Alguns micro-organismos, tais como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, apresentam uma alta afinidade por superfícies artificiais e estão frequentemente associados a infecções relacionadas a cateteres e implantes. A capacidade destes micro-organismos de formarem espessos biofilmes em biomateriais é um modo muito eficiente de escapar do reconhecimento do sistema imune do indivíduo hospedeiro da infecção, além de ser uma proteção contra a ação de antimicrobianos (FEDTKE *et al.*, 2004; HOIBY *et al.*, 2010). Além disso, biofilmes podem ser formados em equipamentos, tubulações de sistemas de ventilação, ar condicionado e distribuição de água, podendo funcionar como fontes ativas de liberação de patógenos dentro do ambiente hospitalar (MAH & O'TOOLE, 2001).

A adesão microbiana e o desenvolvimento de um biofilme, *in vitro*, é iniciado por bactérias planctônicas, com livre movimentação, que se ligam reversivelmente a uma superfície, que pode estar coberta por uma camada de proteínas, por exemplo (KOLENBRANDER & PALMER, 2004). Neste estágio, as bactérias ainda são susceptíveis a antibióticos. O próximo estágio é a ligação irreversível dos micro-organismos à superfície, com multiplicação bacteriana e formação de microcolônias na superfície, além do início da produção da matriz exopolimérica envolvendo as microcolônias (HABASH & REID, 1999). Os micro-organismos são mantidos juntos pela matriz biopolimérica produzida por eles próprios. Esta matriz, que contém polissacarídeos, proteínas e DNA provenientes dos micro-organismos, é importante pois propicia estabilidade estrutural e proteção ao biofilme. Além disso, este agrupamento microbiano pode ser composto de uma ou mais espécies, convivendo de uma maneira sociomicrobiológica (WINGENDER *et al.*, 2001; WHITCHURCH *et al.*, 2002; COSTERTON *et al.*, 2003; BJARNSHOLT *et al.*, 2009). Então, o biofilme cresce em espessura, e é neste estágio que o biofilme apresenta máxima resistência aos antibióticos, maior tolerância a biocidas, desinfetantes, além de maior resistência à fagocitose e outros componentes de defesa do sistema imune do

paciente hospedeiro do biofilme (COSTERTON *et al.*, 1987; MAH & O'TOOLE, 2001; HOIBY *et al.*, 2010). Adicionalmente, pode ocorrer liberação de células do biofilme, ou de partes do biofilme, para propagação para outros locais, onde novos biofilmes poderão ser formados. A formação de um biofilme está representada na Figura 1.1.

Figura 1.1 Ilustração esquemática da formação de um biofilme. Etapa 1: adesão de células planctônicas à superfície; etapa 2: produção da matriz exopolimérica e maturação do biofilme; etapa 3: desprendimento de células individuais ou de pedaços de biofilme. Adaptado de FRANCOLINI & DONELLI, 2010.

Antes de ser colocado dentro do corpo, um biomaterial implantável é uma superfície limpa e estéril, frequentemente composta por diversos polímeros. Imediatamente após a implantação, fluidos corporais, tais como saliva, sangue, urina e muco envolvem o implante (HABASH & REID, 1999). Os tipos de componentes que vão aderir ao implante dependem muito das características da superfície do substrato, como sua composição química, carga e hidrofobicidade (HABASH & REID, 1999). A presença do meio irá formar o chamado filme condicionante sobre a superfície do substrato, como representado na Figura 1.2. A formação do filme condicionante altera as características de superfície dos implantes, sendo que as células bacterianas, ao aproximarem-se da superfície, conseguem “ver” apenas os componentes do filme condicionante (REID *et al.*, 1994; REID *et al.*, 1995). O filme, por si só, pode não cobrir completamente a superfície do implante, mas pode formar uma estrutura entrelaçada, como se fosse uma rede sobre a superfície (BUSSCHER *et al.*, 1991). No entanto, muitos implantes com características de superfície alteradas são ineficazes como mecanismos de prevenir a adesão microbiana devido ao condicionamento da superfície por macromoléculas presentes nos fluidos naturais (REID *et al.*, 1993; CORMIO *et al.*, 1996). Embora estudos anteriores tenham deixado claro que, em condições naturais ou artificiais, as macromoléculas nunca revestem a superfície por completo, os filmes condicionantes são fontes importantes de heterogeneidade e modificação das propriedades da superfície

(COMPÈRE *et al.*, 2001; PRADIER *et al.*, 2002). E, portanto, este acontecimento inevitável deve ser cuidadosamente considerado ao desenvolver superfícies modificadas com a intenção de impedir a adesão microbiana (LEJEUNE, 2003).

Biomateriais com a superfície alterada podem ser eficazes *in vitro*, na ausência de componentes que vão formar o filme condicionante (ROBERTS *et al.*, 1993). Porém, *in vivo*, a formação do filme condicionante poderia diminuir a eficácia de tais dispositivos, permitindo a adesão microbiana (REID *et al.*, 1992; CORMIO *et al.*, 1996). E esta eficácia reduzida pode ser resultante da criação de sítios de ligação, pelos componentes do filme, permitindo que micro-organismos se adiram e colonizem as superfícies.

Figura 1.2 Adesão da célula bacteriana aos componentes do filme condicionante, sobre um substrato, através de ponte de íons positivos, e a ocorrência natural de uma rede de cargas negativas entre as superfícies da bactéria e do filme (HABASH & REID, 1999).

O papel do filme condicionante é vital, já que muitos patógenos não possuem mecanismos que lhes permitam aderir direta ou fortemente sobre superfícies de implantes, na ausência do filme condicionante (VEENSTRA *et al.*, 1996). No entanto, existe a possibilidade de reduzir a adesão microbiana em superfícies, quando a modificação desta, mesmo com a formação do filme condicionante, ainda é capaz de manter-se ativa contra os micro-organismos que se aproximarão da superfície para nela aderirem (HABASH & REID, 1999).

Portanto, levando em consideração todas as características dos biofilmes associados com implantes e dispositivos médico-hospitalares, novas estratégias devem ser desenvolvidas para, preferencialmente, prevenir a instalação dos micro-organismos nos biomateriais e evitar a formação dos biofilmes, já que a presença da matriz exopolimérica retarda a difusão de agentes antimicrobianos no biofilme já formado (KASEMO, 2002; LEWIS, 2008).

Atualmente, mesmo que pareça impossível proteger superfícies de biomateriais ou equipamentos, definitivamente, contra a contaminação e colonização microbiana, o desenvolvimento de drogas e revestimentos de superfície que são capazes de, pelo menos, retardar a adesão já é considerável. Isso porque qualquer demora no processo de colonização de superfícies poderia aumentar a eficácia da antibioticoterapia presente, e da resposta do sistema imune do indivíduo portador do dispositivo implantado, por exemplo, erradicando a contaminação antes mesmo de ocorrer a adesão dos micro-organismos na superfície. No entanto, todas as etapas para a formação do biofilme podem representar alvos contra os quais as estratégias de prevenção devem ser direcionadas no desenvolvimento de novos biomateriais antibiofilmes (LEJEUNE, 2003).

1.2. Micro-organismos como modelos de superfícies biológicas

Bactérias podem ser consideradas como colóides, graças ao seu tamanho de poucos micrômetros. E sob o aspecto físico-químico da adesão microbiana, as propriedades da superfície de adesão, entre bactéria e substrato, tais como potencial-zeta e hidrofobicidade, além da composição do meio líquido circundante, são reconhecidos como fatores determinantes de adesão (KLOTZ, 1990; SKVARIA, 1993). Componentes de superfície que contribuem para a hidrofobicidade das células incluem proteínas de superfície, polímeros anfifílicos ou lipídios. Apêndices da superfície celular, tais como as fímbrias, e possivelmente as cápsulas dos micro-organismos são considerados como componentes essenciais da ligação das células bacterianas à superfície (IRVIN, 1990; SKVARIA, 1993, ALTERTHUM, 2008).

A superfície celular da maior parte dos micro-organismos é negativamente carregada, devido à prevalência de fosfato aniônico, carboxilato e grupos sulfato na parede celular (polímeros aniônicos, como ácido teicóico, em bactérias Gram-positivas; lipopolissacarídeos e proteínas em bactérias Gram-negativas) (ALTERTHUM, 2008).

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa são bactérias Gram-negativas, pertencentes à família Pseudomonadaceae. São bacilos retos, de 0,5 a 0,7 μm de espessura por 1,5 a 3,0 μm de comprimento, não fermentadores de glicose, móveis por um ou mais flagelos polares, ilustrada na Figura 1.3 (KONEMAN *et al.*, 2001a; BLONDEL-HILL *et al.*, 2007; LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Figura 1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

É um micro-organismo considerado ubiqüitário, pois pode ser encontrado principalmente na água, mas também no solo, nos vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares. Sua característica de ubiqüidade pode ser explicada por suas poucas necessidades nutricionais, além da sua tolerância a uma grande variedade de condições físicas, como temperatura e desinfetantes. Um exemplo prático que retrata bem a pouca necessidade nutricional de *P. aeruginosa* é a sua capacidade de proliferar em água destilada, além de poder ser encontrada contaminando águas de piscina, soluções de lentes de contato, cosméticos e drogas injetáveis. A preferência de *P. aeruginosa* por ambientes úmidos é ainda mais preocupante em hospitais, já que podem ser encontradas contaminando equipamentos respiratórios, soluções de limpeza e desinfetantes (LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Raramente *P. aeruginosa* causa infecção em indivíduos imunocompetentes, no entanto é um dos principais agentes de infecção em indivíduos com comprometimento do seu sistema de defesa. Exatamente por isso é conhecida como um patógeno oportunista, e um dos mais importantes agentes de infecção hospitalar. Sua importância clínica deve-se à difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos diretamente relacionados à resistência natural e adquirida a antibióticos e desinfetantes, além da expressão de diversos fatores de virulência,

tais como toxinas e componentes estruturais (BLONDEL-HILL *et al.*, 2007; LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Este micro-organismo é considerado o patógeno Gram-negativo mais devastador para pacientes queimados, muito importante em portadores de fibrose cística, sendo ainda frequentemente relacionado a infecções causadas em sítios onde há acúmulo de umidade. Além disso, são bactérias importantes no que se refere à produção de biofilmes, além de representar um dos principais agentes de infecção hospitalar em casos de pneumonia, infecção urinária, infecção de feridas cirúrgicas e bacteremias (KONEMAN *et al.*, 2001a; LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

As cepas de *P. aeruginosa* podem produzir várias substâncias consideradas como responsáveis pelo aumento da colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro. Essas substâncias, junto com uma variedade de fatores de virulência, tais como lipopolissacarídeo, exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular e várias enzimas, tornam *P. aeruginosa* a bactéria de maior importância clínica entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (KONEMAN *et al.*, 2001a). A patogênese deste micro-organismo pode ser resumida em etapas: adesão bacteriana e colonização; invasão local e infecção sistêmica disseminada. Em cada uma dessas etapas existe a participação de um fator de virulência, caracterizando os sinais e sintomas apresentados no transcurso da infecção, sendo que a maior ou menor participação destes fatores depende do local da infecção. Por exemplo, as adesinas não fimbriadas e o alginato podem ser importantes na infecção pulmonar de pacientes com fibrose cística (LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* produz pigmentos hidrossolúveis, difusíveis no meio de cultura, tais como a piocianina, que outorga cor azulada, e a pioverdina, que confere coloração esverdeada. Além destes, outros tipos de pigmentos podem ser observados, porém com menor frequência, tais como a piomelanina e a piorrubina, que confere a cor marrom e vermelha, respectivamente. Esta observação, assim como a produção de odor característico de frutas, produto de uma aminoacetofenona liberada pelo micro-organismo é característica de grande importância na identificação de rotina de *P. aeruginosa* (LINCOPAN & TRABULSI, 2008).

Nas bactérias Gram-negativas, o envelope celular é composto pela parede celular e pela membrana citoplasmática. A parede celular, conforme ilustrada na Figura 1.5, é formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano, as quais não

ultrapassam 5% da massa seca da parede, e ainda por uma membrana externa. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de espaço periplasmático. O peptideoglicano liga-se à membrana externa por uma lipoproteína, e devido à menor concentração de peptideoglicanos, a parede das bactérias Gram-negativas é considerada mais susceptível a quebras quando comparada à de bactérias Gram-positivas. A membrana externa é composta por uma dupla camada lipídica, com a parte interna com predomínio de fosfolipídios, sendo mais hidrofóbica, e a parte externa com predomínio de lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas, sendo mais hidrofílica. Os LPS são constituídos de um lipídio complexo (lipídio A), ao qual está ligado um polissacarídeo (antígeno O), e são também conhecidos como endotoxinas, já que podem provocar uma série de respostas fisiológicas na infecção causada por Gram-negativos (ALTERTHUM, 2008). A presença dos fosfolipídios, proteínas e LPS é responsável pela carga predominantemente negativa da superfície celular bacteriana, devido à presença de grupos fosfato ligados aos açúcares (STRYER, 1995). O espaço periplasmático contém os peptideoglicanos e uma série de enzimas hidrolíticas, responsáveis pela quebra de macromoléculas, enzimas capazes de inativar drogas, tornando a célula resistente a elas, além de proteínas transportadoras de solutos (ALTERTHUM, 2008).

1.4. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Micrococcaceae. O nome *Staphylococcus* provém da palavra grega *staphylé*, que significa “cachos de uva”. Isto porque, como possuem forma esférica, e são capazes de se dividir em todos os planos, tendem a formar arranjos característicos que lembram cachos de uva. Os estafilococos, cujo diâmetro é de 0,5 a 1,0 μm , são anaeróbios facultativos, imóveis e catalase positivos, e estão ilustrados na Figura 1.4 (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Figura 1.4 *Staphylococcus aureus*

Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota normal do corpo humano, *S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente causador dos mais diversos processos infecciosos, variando desde aqueles de localização superficial, até aqueles de caráter sistêmicos, potencialmente fatais. Sua importância clínica tem variado ao longo dos anos, tornando-se mais relevante particularmente devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por cepas multirresistentes (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Além disso, este micro-organismo é capaz de produzir uma série de fatores de virulência, tais como toxinas, enzimas e constituintes da parede celular, como proteínas, cápsula e peptidoglicano (TEIXEIRA *et al.*, 2008; KONEMAN *et al.*, 2001b).

As infecções estafilocócicas podem ser classificadas em superficiais e profundas. As superficiais afetam a pele e o tecido celular subcutâneo e, geralmente, são decorrentes da invasão direta dos tecidos por amostras de *S. aureus* existentes na pele ou nas mucosas. A invasão se faz através de soluções de continuidade provocadas por diferentes fatores, nem sempre perceptíveis. Com exceção da pneumonia por aspiração, as infecções profundas são decorrentes de bacteremias que se originam nos focos de infecções superficiais ou, eventualmente, numa pneumonia por aspiração. O sucesso do *S. aureus* como agente de infecções superficiais ou profundas depende de sua capacidade em sobrepujar as defesas do organismo (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

S. aureus pode ser susceptível à ação de vários antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas. No entanto, ele é também reconhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a esses antimicrobianos (TEIXEIRA *et al.*, 2008; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular, conforme ilustrada na Figura 1.5, é composta por uma espessa camada de peptidoglicano, podendo atingir 45 a 50% da massa seca da parede. O peptidoglicano é uma macromolécula formada

por um arcabouço composto de uma alternância de N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). A este último encontram-se covalentemente ligadas cadeias laterais de tetrapeptídeos. Estas cadeias de tetrapeptídeos situam-se perpendicularmente ao plano da cadeia polissacarídica, e a interligação destas, seja diretamente ou por meio de outros aminoácidos, são responsáveis pela junção das camadas de peptideoglicano. Embora as ligações glicosídicas entre NAG e NAM sejam fortes, apenas estas cadeias não são capazes de prover toda a rigidez que esta estrutura proporciona. A total rigidez do peptideoglicano é atingida quando estas cadeias são interligadas por aminoácidos (ALTERTHUM, 2008).

Figura 1.5 Representação esquemática de uma célula bacteriana e da estrutura da parede de bactérias Gram-positivas (GP) ou Gram-negativas (GN) (Adaptado de ALTERTHUM, 2008).

Outras macromoléculas podem estar presentes na parede celular destes micro-organismos, tais como proteínas e ácidos teicóicos. O termo ácido teicóico inclui todos os polímeros formados por resíduos de glicerol ou ribitol unidos por ligações fosfodiéster. Isto porque os ácidos teicóicos têm sido divididos em dois tipos: ácidos teicóicos de parede ligados ao peptideoglicano, e ácidos lipoteicóicos, que apesar de serem encontrados ao longo da parede, encontram-se intimamente ligados à fração lipídica da membrana plasmática. Suas propriedades incluem facilitar a ligação e a regulação da entrada e saída de cátions na célula, graças ao grupo fosfato que confere uma carga negativa à molécula que se encontra voltada para o lado externo da célula; regular a atividade das autolisinas durante o processo

de divisão celular; constituir sítios receptores de bacteriófagos ou ainda sítios de ligação com o epitélio hospedeiro em algumas bactérias patogênicas (ALTERTHUM, 2008).

1.5. Compostos de amônio quaternário – atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano do grupamento amônio quaternário é amplamente conhecido (DAVIES & FIELD, 1969; MERIANOS, 1991; KANAZAWA *et al.*, 1995; RUSSELL *et al.*, 1999). Desde 1935 a atividade antibacteriana dos sais de amônio quaternário de cadeia longa é conhecida (DOMAGK, 1935). A quarta geração dos antimicrobianos quaternários inclui diversos sais de mono- e dialquil dimetilamônio e polímeros de amônio quaternário, tais como os ionenos, que são polieletrólitos catiônicos com átomos de nitrogênio na cauda da cadeia polimérica (PETROCCI *et al.*, 1979). As propriedades antimicrobiana, antifúngica e tumoricida dos ionenos indicam que os polímeros são mais ativos do que seus monômeros correspondentes, devido à melhor adsorção do polímero à superfície da célula bacteriana e à membrana citoplasmática, geralmente levando ao subsequente rompimento da sua integridade (IKEDA & TAZUKE, 1983). Além dos poliiionenos quaternários, outras classes de polímeros sintéticos contendo nitrogênio quaternário na cauda, com propriedades antimicrobianas, têm sido relatadas. Por exemplo, o polieletrólito cloreto de poli (dialildimetilamônio) (PDDA), que possui grupos de amônio quaternário permanentemente carregados em unidades cíclicas. A atividade antimicrobiana do PDDA ainda é pouco relatada (DVORACEK *et al.*, 2009; MELO *et al.*, 2010). Recentemente, diversos polímeros catiônicos similares ao PDDA foram sintetizados, demonstrando potente atividade antimicrobiana (TIMOFEEVA *et al.*, 2009).

Exemplos de compostos antimicrobianos com o grupamento amônio quaternário em sua estrutura são anfifílicos como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (SALT & WISEMAN, 1970), lípides catiônicos como o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) (TÁPIAS *et al.*, 1994; SICCHIEROLLI *et al.*, 1995; KANAZAWA *et al.*, 1995; RUSSELL & CHOPRA, 1996; MARTINS *et al.*, 1997; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1997; CAMPANHÃ *et al.*, 1999; CAMPANHÃ *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2003; CARMONA-RIBEIRO, 2003; PACHECO *et al.*, 2004;

CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2006; LINCOPAN & CARMONA-RIBEIRO, 2006; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006), polímeros (polieletrólitos) catiônicos (TILLER *et al.*, 2001; THOME *et al.*, 2003; CEN *et al.*, 2003; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006), dendrímeros com diversos graus de ramificação (CHEN & COOPER, 2000; CHEN & COOPER, 2002), ou ainda materiais híbridos orgânico-inorgânico contendo sais de amônio quaternário que mostraram ação antimicrobiana (MARINI *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008).

Lipossomos catiônicos e outros arranjos supramoleculares com carga positiva já foram estabelecidos como agentes antimicrobianos (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2008; TÁPIAS *et al.*, 1994; SICCHIEROLLI *et al.*, 1995; CAMPANHÃ *et al.*, 2001). Em particular, o DODAB é um lípide catiônico sintético, com grande estabilidade química e propriedades anti-infecciosas bastantes descritas (CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Lípides sintéticos catiônicos formadores de bicamadas como os sais de dioctadecildimetilamônio (DODA), quando dispersos em água, formam bicamadas positivamente carregadas com um brometo (DODAB) ou um cloreto (DODAC) como contra-íon. Ligadas a um grupo amônio quaternário, estão duas longas cadeias carbônicas com 18 carbonos cada, conferindo-lhe assim um alto caráter hidrofóbico. Devido a este caráter, DODAB (PM 631) é pouco solúvel em água, porém possui, como outros lípides, a propriedade de se auto-associar em dispersão aquosa como bicamadas abertas ou fechadas, dependendo do método de dispersão (CARMONA-RIBEIRO, 1992). Por sonicação com sonda (CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1991) podem-se obter fragmentos de bicamada (BF) enquanto que pelo método de vaporização clorofórmica (CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1983) ou de aquecimento - método do SNIPPE (KATZ *et al.*, 1995) podem-se obter bicamadas fechadas ou vesículas.

A adesão de vesículas ou a deposição de bicamadas de DODAB ou fosfolipídios sobre superfícies de óxido de silício ou sobre partículas ou filmes poliméricos, na ausência ou presença de polímeros de carga oposta, pode ser uma ferramenta importante para pesquisa e desenvolvimento de biossensores e kits imunológicos (SALAY & CARMONA-RIBEIRO, 1998; SALAY & CARMONA-RIBEIRO, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2004). Ainda, uma notável capacidade de solubilização de drogas hidrofóbicas, como anfotericina B e miconazol, em fragmentos da bicamada de DODAB foi descrita (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2001; PACHECO & CARMONA-RIBEIRO, 2003). No caso da

anfotericina B, também se demonstrou evidente estabilização coloidal do particulado de droga em dispersão aquosa, por deposição dos fragmentos catiônicos sobre os grânulos aniônicos do antifúngico (LINCOPAN & CARMONA-RIBEIRO, 2006).

São sugeridos dois possíveis mecanismos de ação para os compostos de amônio quaternário causarem a perda da viabilidade bacteriana. No primeiro, as superfícies carregadas positivamente poderiam deslocar os cátions divalentes que permanecem juntos à superfície com cargas negativas, presentes nos lipopolissacarídeos, e assim romper a membrana externa de bactérias Gram-negativas (VAARA, 1992). No segundo mecanismo sugerido, as superfícies catiônicas poderiam alterar a conformação e impedir o funcionamento de proteínas e canais de membrana, pelas interações com a cabeça polar do DODAB, acarretando a morte bacteriana (CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2006). De fato, compostos de tetraalquilamônio já foram reconhecidos como eficientes bloqueadores dos canais de potássio KcsA de *Escherichia coli* (LU *et al.*, 2005).

A ação bactericida do DODAB foi demonstrada contra quatro espécies bacterianas de importância clínica, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (CAMPANHÃ *et al.*, 1999). A susceptibilidade das quatro espécies bacterianas ao DODAB foi demonstrada e comparada através de curvas de viabilidade celular e estão apresentadas na Figura 1.6.

Figura 1.6 Viabilidade celular (%) de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em função da concentração de DODAB após 1 hora de interação bactérias-DODAB BF. Concentrações celulares de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL de *E. coli* (a); $2,0 \times 10^7$ UFC/mL de *S. typhimurium* (b); $2,5 \times 10^7$ UFC/mL de *S. aureus* (c); $3,0 \times 10^7$ UFC/mL de *P. aeruginosa* (d). (CAMPANHÃ *et al.*, 1999).

A adsorção de bicamadas catiônicas compostas de DODAB sobre células bacterianas ou fúngicas mudou o sinal da carga das células, de negativo para

positivo, demonstrando uma estreita relação entre a carga positiva de bactérias ou fungos e o efeito bactericida ou fungicida (CAMPANHÃ *et al.*, 1999; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006). Com respeito ao mecanismo de ação de DODAB, não foram observadas lise celular ou ruptura da vesícula catiônica (MARTINS *et al.*, 1997; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006). Essa investigação foi estendida ao efeito do DODAB sobre a viabilidade de fibroblastos normais e transformados em cultura (CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 1997). Após 30 minutos de interação com células eucarióticas em monocamada subconflente, observou-se morte celular a partir de 0,1 milimolar de DODAB, tanto para as células normais quanto para as transformadas. A Tabela 1 ilustra a citotoxicidade do DODAB contra células de mamífero e algumas bactérias ou fungos (CARMONA-RIBEIRO, 2003). Células de mamífero são mais resistentes a DODAB do que bactérias ou fungos, sobrando 50% de fibroblastos viáveis em 1 mM de DODAB enquanto para os micro-organismos, 50% de viabilidade ocorrem na faixa micromolar de concentrações de DODAB. Cerca de 100% de células de mamífero mantêm-se vivas em concentrações de DODAB em que bactérias e fungos não sobrevivem.

Tabela 1. Citotoxicidade diferencial de DODAB (CARMONA-RIBEIRO, 2003).

<i>Tipo de célula</i>	<i>Concentração inicial de células viáveis/ (células/mL)</i>	<i>Concentração de DODAB para 50% de sobreviventes/ (mM)</i>	<i>Referência</i>
Fibroblastos de camundongo Balb-c 3T3 normais (clone A31)	1×10^4	1,000	CARMONA-RIBEIRO <i>et al.</i> , 1997
Fibroblastos de camundongo SVT2 (SV40 transformados)	1×10^4	1,000	CARMONA-RIBEIRO <i>et al.</i> , 1997
<i>Candida albicans</i>	2×10^6	0,010	CAMPANHÃ <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	2×10^7	0,028	MARTINS <i>et al.</i> , 1997
<i>Salmonella typhimurium</i>	2×10^7	0,010	CAMPANHÃ <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3×10^7	0,005	CAMPANHÃ <i>et al.</i> , 1999
<i>Staphylococcus aureus</i>	3×10^7	0,006	CAMPANHÃ <i>et al.</i> , 1999

1.6. Polieletrólitos e bicamadas lipídicas compondo a estrutura de partículas com propriedades antimicrobianas

Carboximetilcelulose (CMC) é um derivado semi-sintético da celulose, e representa o éter de celulose mais importante, possivelmente devido à sua característica de polieletrólito aniônico (JUST & MAJEWICZ, 1985; BAJPAI & MISHRA, 2008). Devido ao fato de ser negativamente carregada, CMC possui a característica de ser inerte frente aos micro-organismos (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2008).

Outro polieletrólito importante é o cloreto de poli (dialildimetilamônio) (PDDA), cuja representação esquemática está na Tabela 2. Este polímero, com grupamentos de amônio quaternário em sua estrutura, é considerado como seguro para a saúde humana, e é amplamente utilizado na fabricação de papel, no tratamento de água potável, na mineração e em processos biológicos, médicos e alimentícios, principalmente ao formar blendas ou ao se associar a outros polímeros de carga oposta (WANDREY *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2008).

A obtenção de partículas em nanoescala certamente dependerá da técnica de automontagem como uma ferramenta necessária. Esta técnica corresponde a multicamadas que se agrupam, camada por camada, por adsorção alternada e consecutiva de polieletrólitos e/ou anfifílicos ou lípides aniônicos ou catiônicos, que estão em soluções aquosas, podendo gerar filmes ou nanopartículas altamente organizados. A atração eletrostática entre os compostos de cargas opostas é a força que dirige essa construção de multicamadas. Com a adsorção do polieletrólito de carga oposta, um grande número de resíduos iônicos permanece exposto na interface com a solução e, então, a carga de superfície é efetivamente revertida (DECHER *et al.*, 1992; LVOV *et al.*, 1993). Partículas na presença de eletrólitos de carga oposta podem permanecer estáveis, isoladas ou aos pares, ou ainda podem flocular, dependendo da concentração e peso molecular do eletrólito, da densidade numérica das partículas, proporção molar de cargas nas partículas, pH e força iônica (COHEN-STUART & FLEER, 1996; BERTRAND *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2003).

Sabe-se, então, que o depósito de monocamadas orgânicas em superfícies sólidas contendo compostos de amônio quaternário tem demonstrado prevenir o depósito e o crescimento de biofilmes bacterianos (MAMIZUKA & CARMONA-

RIBEIRO, 2008). Este conhecimento é essencial para a utilização de DODAB e de outros compostos de amônio quaternário, em associação com polímeros, a fim de desenvolver materiais híbridos com propriedades antimicrobianas.

Partículas com propriedades antimicrobianas têm apresentado grande importância, pois podem ter aplicações farmacêuticas, cosméticas, veterinárias, biotecnológicas, químicas, biomédicas ou preservativas. As partículas antimicrobianas podem adsorver ou serem incorporadas a dispositivos médico-hospitalares, tintas, filtros de ar condicionado ou tubos de ventilação, ou ainda o particulado antimicrobiano poderá ser usado para fabricar filmes finos, com aplicações na fabricação de luvas, em embalagens para alimentos e produtos laboratoriais, em revestimentos para proteção de produtos cosméticos e odontológicos, em aplicações higiênicas e ambientais. Podem ainda carrear diferentes drogas, tanto por interação eletrostática quanto por efeito hidrofóbico, uma vez que os fragmentos de bicamada catiônica possuem sítios propícios à interação com drogas (STEVENS *et al.*, 2009). Além disso, as propriedades físicas e mecânicas de nanopartículas diferem daquelas dos materiais macroscópicos (VIMALA *et al.*, 2009). Por exemplo, o tamanho das nanopartículas pode interferir no seu efeito microbicida. Já foi demonstrado que a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata é influenciada pelo tamanho das partículas, em que quanto menores as partículas, maior o efeito antimicrobiano, possivelmente devido à maior área de superfície que entrará em contato com as células bacterianas (MORONES *et al.*, 2005; PANÁČEK *et al.*, 2006; PAL *et al.*, 2007).

A estabilidade coloidal de partículas revestidas por lípide catiônico e CMC (CORREIA *et al.*, 2004) ou lípide aniônico e PDDA (ARAUJO *et al.*, 2005) revelou-se dependente da concentração do polieletrólito e da existência de carga no particulado. Partículas carregadas são coloidalmente mais estáveis do que aquelas sem carga. Quanto à ação antimicrobiana, mostrou-se ser possível obter um particulado híbrido muito efetivo contra *Candida albicans* a partir de camadas de DODAB, agente antifúngico, CMC e PDDA (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2008). Sendo assim, desenvolvemos partículas híbridas antimicrobianas, preparadas pela automontagem consecutiva de uma bicamada de lípide catiônico em forma de fragmentos de bicamada dispersos em solução aquosa, seguida de uma camada de polieletrólito de carga oposta, que neste caso é a CMC, uma última camada de

polieletrólito de carga oposta à anterior, que neste caso é o PDDA, resultando em arranjo positivamente carregado.

Na categoria de partículas híbridas antibacterianas, junto ao Laboratório de Biocolóides (Departamento de Bioquímica), foram desenvolvidas nanopartículas compostas pelo lípide catiônico DODAB em fragmentos de bicamada, e consecutivamente revestidos pelos polieletrólitos CMC (aniônico) e PDDA (catiônico), compondo partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA, sendo objetos de pedido de patente de invenção protocolado junto ao INPI (Patente: PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MATERIAL ANTIBACTERIANO CONTENDO AS MESMAS, com Nº de Protocolo no INPI/SP: 018100024951).

1.7. Filmes e superfícies com propriedades antimicrobianas

Estudos têm demonstrado a comum contaminação de superfícies em hospitais, tais como maçanetas de portas (OIE *et al.*, 2002), embalagens estéreis (DIETZE *et al.*, 2001), tecidos e plásticos utilizados pela enfermagem (NEELY & MALEY, 2000), canetas utilizadas pelos funcionários (BANERJEE *et al.*, 1999), teclados e torneiras (BURES *et al.*, 2000), estetoscópios (COHEN *et al.*, 1997) e aparelhos de telefones (CIRAGIL *et al.*, 2006), por patógenos potencialmente perigosos. Uma vez que a superfície tenha sido contaminada, pode ocorrer propagação deste patógeno contaminante para outras superfícies e para pacientes próximos à superfície contaminada. Por isso, o desenvolvimento de superfícies ou revestimentos antimicrobianos, que reduzem a contaminação em ambientes inanimados, seria muito útil nos ambientes de uma forma geral, mas particularmente importante na redução das infecções hospitalares (PAGE *et al.*, 2009).

Como os materiais (polímeros) comumente utilizados para a fabricação de dispositivos médico-hospitalares não são antimicrobianos, geralmente requerem modificações para possuir tal propriedade. Modificações na superfície dos biomateriais podem alterar as interações específicas e não específicas com os micro-organismos podendo, assim, reduzir a adesão microbiana (DURAN, 2000). Assim, quando as superfícies são revestidas, ou então inseridas (ou hibridizadas) de

compostos antimicrobianos, podem ocorrer alterações físico-químicas das características da interface, podendo resultar em diminuição ou impedimento da capacidade de adesão de micro-organismos (MIRELES *et al.*, 2001).

Uma superfície que dificulte a adesão microbiana, e consequentemente a formação de biofilmes, é considerada uma estratégia preventiva, em que materiais antiadesivos seriam utilizados na fabricação de dispositivos médico-hospitalares, evitando a colonização e consequente infecção (DURAN, 2000). Uma técnica bastante conhecida é o revestimento de superfícies com uma camada de poli(etileno glicol) (PEG) para prevenir a adesão de micro-organismos, proteínas e células de mamíferos em superfícies. A modificação de superfícies de poliuretano, por exemplo, com PEG já demonstrou ser eficaz no impedimento da adesão microbiana (OSTUNI *et al.*, 2001; HOU *et al.*, 2007). Tais superfícies são antimicrobianas possivelmente devido à repulsão estérica entre PEG e o envelope celular, além dos movimentos dinâmicos das cadeias de PEG, na superfície, juntamente com a falta de sítios ligantes, acabarem dificultando ainda mais a adesão microbiana (PAGE *et al.*, 2009). Portanto, a superfície pode ser capaz de repelir micro-organismos, apesar de não matá-los (ACKART *et al.*, 1975; DESAI *et al.*, 1992; BRIDGETT *et al.*, 1992; ARCIOLA *et al.*, 1993; KOHNEN & JANSEN, 1995; PARK *et al.*, 1998). Ainda existem as superfícies revestidas com polímeros zwitteriônicos. A natureza zwitteriônica dos polímeros mimetiza a natureza encontrada nas bicamadas lipídicas de membranas biológicas. Isto porque a cabeça deste polímero pode atrair grande quantidade de água à superfície, tornando o material bastante hidrofílico, o que favorece as interações reversíveis entre os micro-organismos e a superfície, desfavorecendo a adesão (CHENG *et al.*, 2007).

Alternativamente, os materiais também podem ser impregnados com compostos antimicrobianos que são liberados gradativamente ao longo do tempo, matando assim os micro-organismos, tais como antibióticos, compostos de amônio quaternário, íons de prata ou iodo (NOHR & MACDONALD, 1994; KOHNEN & JANSEN, 1995; SHEARER *et al.*, 2000; SILVER, 2003; LANSDOWN, 2006). Os antimicrobianos são incorporados em uma superfície, normalmente em um polímero, e seriam liberados da superfície para realizar sua função. Uma vantagem clinicamente importante da impregnação de substâncias antimicrobianas em polímeros de biomateriais seria a proteção das superfícies internas e externas dos dispositivos, como cateteres, por exemplo, contra colonização de micro-organismos

(WILCOX *et al.*, 1998). Porém, a liberação e difusão destes compostos apresentam um problema em potencial, que seria a indução da resistência aos antimicrobianos utilizados (PAGE *et al.*, 2009).

Superfícies inseridas com cátions têm demonstrado ação microbicida já há algum tempo (SPEIER & MALEK, 1982). Considerando que as células microbianas são hidrofóbicas e negativamente carregadas, estas superfícies policatiônicas atraem as células dos micro-organismos, e no contato, exercem seu efeito microbicida (KLIBANOV, 2007; PAGE *et al.*, 2009). Segundo Lin e colaboradores (2002), para as superfícies serem bactericidas, devem possuir longas cadeias poliméricas positivamente carregadas e hidrofóbicas inseridas no substrato (LIN *et al.*, 2002). Revestimentos que incorporam agentes com atividade antimicrobiana direta, como contato, por exemplo, foram efetivos em reduzir a adesão bacteriana *in vitro* e em alguns casos reduzindo infecções associadas a implantes *in vivo* (HETRICK & SCHOENFISCH, 2006). Tiller e colaboradores (2001) modificaram a superfície de lâminas de vidro com um polieletrólito catiônico e demonstraram que esta superfície alterada foi capaz de matar micro-organismos, quando estes entraram em contato com a superfície (TILLER *et al.*, 2001). Mais de 90% de células de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* depositadas sobre o vidro, incorporado com o polieletrólito catiônico, foram mortas, sendo que a deposição bacteriana ocorreu em um estado seco do ar, já que esta é a forma mais comum de dispersão de infecções bacterianas quando através da fala, de espirros, tosse ou simplesmente pela respiração (TILLER *et al.*, 2001).

A deposição de monocamadas orgânicas sobre superfícies contendo grupos de amônio quaternário têm demonstrado prevenir a deposição e o crescimento de biofilmes bacterianos (KUGLER *et al.*, 2005). Moléculas com uma rede de cargas positivas, tanto em solução quanto fixos ou adsorvidos em superfícies, são capazes de matar micro-organismos. (KUGLER *et al.*, 2005; VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008). Particularmente, o lípide sintético catiônico DODAB exhibe marcantes propriedades antimicrobianas, possivelmente muito úteis para a produção de revestimentos antimicrobianos (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006; CARMONA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Combinar o lípide DODAB diretamente em um polímero pode fornecer várias vantagens para a entrega deste composto catiônico. Além disso, se for utilizado um polímero comestível ou biodegradável para inserção

deste amônio quaternário, esta associação ainda apresentaria as vantagens ambientais da biodegradabilidade (CUTTER *et al.*, 2001).

Pereira e colaboradores demonstraram em seu trabalho que a combinação do composto de amônio quaternário DODAB com o polímero poli (metil metacrilato) (PMMA) apresenta estabilidade e forma filmes híbridos, finos e homogêneos, sobre *wafers* de silício, diferentemente dos resultados obtidos da associação de DODAB com o polímero poliestireno (PS), ambos representados na Figura 1.7, que demonstrou formar filmes híbridos de estrutura porosa, possivelmente devido à separação de fase entre DODAB e PS (PEREIRA *et al.*, 2008).

Figura 1.7 Microscopia ótica dos filmes híbridos polímero-DODAB (a) PS/ DODAB; (b) PMMA/ DODAB (Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2008).

De acordo com este estudo, filmes híbridos formados pela técnica de revestimento rotacional de uma solução clorofórmica contendo o polímero PMMA e o lípide DODAB, sobre superfícies de *wafers* de silício, exibiram notável atividade microbicida, no contato, contra *E. coli*, ainda que PMMA não exerça influência alguma sobre a célula bacteriana, reforçando a permanência da característica microbicida do composto de amônio quaternário, quando em associação com um polímero. Na Figura 1.8 podem ser observadas células vivas e mortas, coradas em verde e vermelho, respectivamente, de acordo com a técnica utilizada para avaliação da viabilidade celular, pelo uso do kit BacLight™ (PEREIRA *et al.*, 2008). Os controles para as células, observados em lamínulas de vidro (Figura 1.8A) ou filmes somente com PMMA (Figura 1.8B) demonstraram 100% de células vivas após 1 hora de interação filme-bactéria. Os experimentos com os filmes híbridos de PMMA/ DODAB contra células de *E. coli* (Figuras 1.8C e 1.8D) demonstraram 0% de viabilidade.

Figura 1.8 Células de *E. coli* em lamínulas de vidro (A); em filme de PMMA (B); em filmes híbridos de PMMA/ DODAB (C e D). (Adaptado de PEREIRA *et al.*, 2008).

Filmes finos poliméricos são utilizados frequentemente na indústria de microeletrônica, no desenvolvimento de dispositivos sensores ou na proteção contra a adesão de micro-organismos patogênicos em diversas superfícies de interesse biomédico, biotecnológico ou farmacêutico (ITO & AOKI, 2005; DHANABALAN *et al.*, 2000).

Existem vários métodos de obtenção de filmes poliméricos sobre superfícies sólidas (STEWART *et al.*, 2000; MEYERHOFER, 1978). Dentre os diversos está o revestimento rotacional, cujo esquema está representado na Figura 1.9 (SCHUBERT, 1997; PETRI, 2002). O revestimento rotacional permite formar filmes uniformes em substratos planos com espessuras reprodutíveis e controladas. O processo consiste em adicionar a solução do polímero sobre o substrato sólido a ser submetido à rotação, com velocidade constante, com evaporação do solvente. O controle de espessura dos filmes rotacionalmente revestidos depende da concentração do polímero em solução, do peso molecular do polímero, da velocidade de rotação e da taxa de evaporação do solvente (COHEN-STUART *et al.*, 1991). A competição entre solvente e polímero pela adsorção à superfície sólida controla a adsorção do polímero sobre a mesma (MORTON-JONES, 1989; KUEHNER *et al.*, 1994).

O baixo custo e o método simples de obtenção dos filmes, de apenas um passo, certamente seria uma vantagem em relação a outros métodos mais trabalhosos, como modificação covalente de matrizes poliméricas (CARO *et al.*, 2009). Possíveis aplicações para a impregnação de DODAB em matrizes poliméricas seriam no desenho de biomateriais e curativos antimicrobianos.

Figura 1.9 Obtenção de filmes híbridos de polímero (PMMA) e agente microbicida (CAQ) por revestimento rotacional.

Ao se adicionar um aditivo a um material polimérico ocorrem diferentes graus de dispersividade e distribuição do aditivo no polímero (Figura 1.10). A mistura pode resultar em material mal disperso e mal distribuído (Figura 1.10a), mal disperso e bem distribuído (Figura 1.10b), mal distribuído e bem disperso (Figura 1.10c) ou bem distribuído e bem disperso (Figura 1.10d) (KUEHNER *et al.*, 1994).

Na categoria de material híbrido antimicrobiano polímero-lípide bem distribuído e bem disperso está o material PMMA/ DODAB desenvolvido junto aos Laboratórios de Biocolóides (Departamento de Bioquímica) e de Filmes Finos (Departamento Química Fundamental) do IQ-USP e pedido de patente de invenção protocolado junto ao INPI (Patente: MATERIAL ANTIMICROBIANO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE MATERIAL ANTIMICROBIANO, FILME ANTIMICROBIANO E USO, com Nº de Protocolo no INPI/SP: 018070072686). Estes filmes híbridos foram utilizados como base em nosso estudo, com consequente variação dos compostos de amônio quaternário (CAQs) que foram hibridizados com o PMMA, além da variação das doses desses CAQs.

Figura 1.10 Possibilidades para dispersão e distribuição de aditivos em polímeros.

1.8. Tensão superficial e ângulo de contato

Tensão interfacial ou superficial e ângulo de contato são duas grandezas diferentes, porém estreitamente relacionadas. Tensão superficial descreve a interface entre duas fases, e o ângulo de contato descreve a borda da fronteira de duas fases, onde termina em uma terceira fase. Assim, duas fases devem ser especificadas para descrever a tensão superficial, e três fases são necessárias para descrever ângulo de contato (SHAW, 1980b).

Como o próprio nome indica, tensão superficial (γ) é uma força que opera sobre uma superfície e age perpendicularmente para o interior das fronteiras da superfície, tendendo a diminuir a área da interface. De fato, num líquido esta definição é apropriada, pois as moléculas situadas no seu interior são, em média, sujeitas a forças de atração iguais em todas as direções, ao passo que as moléculas situadas na superfície líquido-ar estão submetidas a forças de atração não balanceadas ou não equilibradas, o que resulta em uma força em direção ao líquido. Estas forças de atração estão representadas na Figura 1.11. O maior número possível de moléculas se deslocará da superfície para o interior do líquido, e assim a superfície tenderá a contrair-se espontaneamente. Isso explica porque gotículas de um líquido ou bolhas de um gás tendem a adquirir a forma esférica (SHAW, 1980a).

Figura 1.11 Forças de atração presentes em moléculas no interior de um líquido e na interface líquido-ar.

Pode-se avaliar a tensão superficial de várias maneiras, pelos métodos estáticos e dinâmicos. Os métodos estáticos envolvem, por exemplo, os métodos de ascensão capilar e da gota pendente. Já os métodos dinâmicos podem ser os métodos nos quais a superfície é rompida durante o processo de medida como, por exemplo, o método do anel. Ou então, por métodos nos quais a superfície se encontra em movimento durante a medida como, por exemplo, o método de escoamento (HIEMENZ, 1986). Porém, deve ser levado em consideração que a tensão superficial varia quase linearmente com a temperatura, em que ocorre uma redução da tensão superficial quando há aumento de temperatura. Assim, é necessário que não ocorram grandes variações de temperatura em experimentos envolvendo tensão superficial (SHAW, 1980a).

Já as medidas de ângulo de contato (θ) são utilizadas para caracterizar os estados físicos e químicos de superfícies complexas (ISRAELACHVILLI & GEE, 1989). Quando uma gota de um líquido é colocada sobre uma superfície sólida plana, ela poderá espalhar-se como um filme mais ou menos uniforme, ou permanecerá como uma gota, formando um ângulo de contato com a superfície sólida. A medida de ângulo de contato entre uma gota e uma superfície sólida pode esclarecer processos importantes, tais como molhabilidade, adsorção e adesão, e ainda características da superfície incluindo heterogeneidade química, limpeza e orientação molecular (HIEMENZ, 1986).

Assim, o ângulo de contato é definido como o ângulo, medido no líquido, formado na junção de três fases, sendo geralmente sólido/ líquido/ gás, supondo que a gota de um líquido foi colocada sobre uma superfície perfeitamente lisa, e as três fases estão em equilíbrio. Ele pode ser determinado matematicamente através da equação de Young, a partir de tensões superficiais, que podem ser interpretadas

como forças existentes ao longo do perímetro de uma gota (HIEMENZ, 1986). Esta determinação está ilustrada na Figura 1.12. A equação de Young corresponde a:

$$\gamma_{S/V} = \gamma_{S/L} + \gamma_{L/V} \cos \theta,$$

onde $\gamma_{S/V}$ é a tensão superficial na interface sólido-vapor;

$\gamma_{S/L}$ é a tensão superficial na interface sólido-líquido;

$\gamma_{L/V}$ é a tensão superficial na interface líquido-vapor e

θ é o ângulo de contato entre a gota e o sólido.

Figura 1.12 Componentes de tensões superficiais necessários para a dedução da equação de Young.

O sólido se mostrará completamente umedecido pelo líquido se o ângulo de contato for nulo, e somente parcialmente umedecido se o ângulo de contato tiver um valor finito. A medida de ângulo de contato para gotas de tamanho crescente dá origem ao ângulo de contato de avanço (θ_A), e a medida de ângulo de contato para gotas de tamanho decrescente dá origem ao ângulo de contato de recesso (θ_R). Os ângulos de contato são estáticos ou dinâmicos, dependendo se a fronteira líquido-sólido-ar é estacionária ou se move durante o processo de medição. Para medidas de ângulos de contato estáticos, o método mais utilizado é o da gota séssil ou gota pendente, em que uma gota é colocada sobre uma determinada superfície e o ângulo que ela forma com a superfície durante o avanço ou recesso é medido através de um aparato, descrito posteriormente (HIEMENZ, 1986).

Um aspecto muito importante a ser considerado é o fenômeno da histerese ($\Delta\theta$), que é definido como a diferença entre o ângulo de contato de avanço θ_A e o ângulo de contato de recesso θ_R , ou seja, a diferença que existe entre o ângulo de contato de um líquido avançando sobre uma superfície seca e o ângulo de um líquido retornando sobre a superfície molhada (SHAW, 1980b; HIEMENZ, 1986). A histerese de um ângulo de contato é mais pronunciada quando a superfície não é pura, isto é, quando a superfície não é quimicamente homogênea (SHAW, 1980b). A

rugosidade da superfície também pode ser uma causa da histerese, já que se a superfície contiver poros e cavidades, o líquido irá preencher estas imperfeições da superfície. Além da heterogeneidade e da rugosidade da superfície, o tempo de avaliação do ângulo de contato também pode influenciar na histerese, assim o tempo também é uma variável que deve ser controlada durante o experimento (HIEMENZ, 1986).

Algumas aplicações de caráter biotecnológico são o estudo da influência da molhabilidade de superfícies frente à adesão bacteriana (PETERMMAN *et al.*, 1993) e o estudo da molhabilidade de superfícies poliméricas de poliestireno e do copolímero poli (estireno/ metacrilato) frente à adsorção física de bicamadas de anfifílicos sintéticos, tais como brometos, cloretos e acetatos de dioctadecildimetilamônio (DODAB, DODAC, DODAAc, respectivamente) (LESSA & CARMONA-RIBEIRO, 1996). Em cada um desses estudos, a variação no ângulo de contato está intimamente relacionada com modificações das superfícies no que diz respeito à molhabilidade, devido à adsorção de estruturas orgânicas ou bio-orgânicas sobre as mesmas.

O ângulo de contato está relacionado com a energia de superfície (molhabilidade ou hidrofobicidade e hidrofiliidade), e pode ser utilizado como indicador de facilidade ou dificuldade de um micro-organismo colonizar uma superfície (OKADA *et al.*, 2008). Para superfícies auto-limpantes, sobre a qual os micro-organismos não conseguem aderir, é necessário um caráter extremamente hidrofílico (menor que 10°) ou hidrofóbico (acima de 140°) para conseguir impedir a adesão microbiana (PARKIN & PALGRAVE, 2005). A própria natureza utiliza estas características em algumas folhas de plantas para produzir uma superfície auto-limpante, conhecida como o efeito Lótus. Efeito Lótus é quando gotas de água sobre a superfície de folhas de plantas formam ângulos de contato extremamente elevados, geralmente acima de 140° , e essas gotículas acabam rolando sobre a superfície, removendo sujeira, poeira, bactérias e vírus da superfície das folhas (PARKIN & PALGRAVE, 2005). Imitações deste efeito lótus feitas pelo homem são comuns, como por exemplo, superfícies modificadas para obter características de hidrofobicidade para impedir a adesão microbiana (HOSONO *et al.*, 2005). A principal desvantagem de materiais auto-limpantes baseados em superfícies hidrofóbicas é que ao prevenir a contaminação microbiana na superfície tratada, não soluciona o problema dos micro-organismos patogênicos que incidem sobre a

superfície, já que simplesmente deslocam os micro-organismos para outro lugar, onde eles terão de ser tratados por técnicas microbidas. Portanto, o desenvolvimento de superfícies que já contenham compostos antimicrobianos seria uma abordagem mais interessante e aplicável.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos, em forma de partículas e filmes, utilizando diferentes compostos de amônio quaternário e combinando-os a polímeros, como carboximetilcelulose e poliacrilatos.

2.2. Objetivos específicos

1. Produção de materiais, de baixo custo e fácil obtenção, híbridos polímero-lípide, catiônicos, e com propriedades antimicrobianas;
2. Produção de nanopartículas híbridas por deposição de camadas, com perfeita organização das camadas dos agentes microbicidas catiônicos intercalados com camada inerte de polieletrólito aniônico;
3. Caracterização das nanopartículas através da determinação de tamanho e potencial-zeta, utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz;
4. Preparação de filmes híbridos por revestimento rotacional;
5. Caracterização da molhabilidade dos filmes híbridos através da determinação das medidas de ângulo de contato;
6. Caracterização da difusibilidade dos anfifílicos catiônicos a partir dos filmes híbridos através de determinações de tensão superficial na interface ar-água para filmes submersos em água em função do tempo;
7. Avaliação da atividade antimicrobiana de partículas e filmes contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram reativadas, separadamente, em Caldo TSB (Tryptic Soy Broth – Merck KGaA, Darmstadt, Germany) durante 3 horas a 37 °C, sob agitação, e então semeadas em placas com Ágar Mueller-Hinton (AMH) (Hi-Media Laboratories Pvt, India) e incubadas por 18-24 horas em estufa a 37 °C. Uma alçada desta cultura foi inoculada em 10mL de caldo TSB e incubada a 37 °C, sob agitação, por 3 horas, para ambas as espécies se encontrarem na fase exponencial de crescimento. Esta suspensão bacteriana foi centrifugada por 10 minutos e lavada em solução de D-glicose 0,264M, sendo este processo de centrifugação e lavagem repetido por mais duas vezes. Então, a suspensão em D-glicose foi padronizada com o tubo 0,5 da escala de McFarland, contendo cerca de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL.

3.2. Preparação e caracterização de fragmentos de bicamada de DODAB

DODAB foi disperso em solução de D-glicose 0,264 M pela técnica de sonicação com sonda. Este processo é realizado com uma sonda de titânio, alimentado por ultrassom com potência de 90 W (20 minutos, 70 °C) (CARMONA-RIBEIRO, 1992). Então, a dispersão é centrifugada (60 minutos, 10000g, 4 °C), a fim de eliminar o titânio residual ejetado da sonda. Este procedimento dispersa o pó anfifílico em solução aquosa utilizando alta energia, que não só produz vesículas formadas por bicamadas, mas também rompe tais vesículas, gerando fragmentos de bicamada (CARMONA-RIBEIRO, 1992; CARMONA-RIBEIRO & CHAIMOVICH, 1983). A concentração analítica de DODAB é determinada utilizando a microtitulação com nitrato de mercúrio, que consiste em dosar o contra-íon do anfifílico, brometo, utilizando a difenilcarbazona como solução indicadora (SCHALES & SCHALES, 1941).

3.3. Preparação e caracterização de partículas híbridas de polieletrólitos e DODAB

A construção das partículas híbridas foi realizada pela técnica da automontagem (DECHER & HONG, 1991), em que DODAB foi disperso em forma de fragmentos de bicamada, os quais interagiram com CMC durante 20 minutos, obtendo-se assim um arranjo aniônico composto por DODAB BF/ CMC. A este último arranjo foi adicionada uma solução de PDDA, para interação por 20 minutos, obtendo-se o arranjo catiônico final, composto por DODAB BF/ CMC/ PDDA. Todas as soluções e dispersões foram esterilizadas por filtração antes da construção das partículas, sendo que o solvente utilizado para a preparação destas foi uma solução isotônica de D-glicose 0,264M, também estéril. A solução de D-glicose 0,264M é equivalente a uma solução de NaCl 0,15 M, no que se refere à osmolaridade, e por isso é considerada isotônica. As soluções estoque de DODAB BF, CMC e PDDA para a construção das partículas encontravam-se nas concentrações de 2 mM, 2 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente. CMC utilizada possui grau de substituição de 0,60 a 0,95 e o PDDA utilizado possui massa molar de 100000 a 200000 g/mol.

As dispersões das partículas pequenas foram obtidas em concentrações finais de 0,1 mM de DODAB, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA. Já as dispersões das partículas grandes foram obtidas de maneira similar, porém em concentrações de DODAB, CMC e PDDA 5 vezes maiores, isto é, 0,5 mM de DODAB, 0,5 mg/mL de CMC e 0,5 mg/mL de PDDA. Na Tabela 2 estão apresentadas as estruturas químicas de DODAB, CMC e PDDA, além dos esquemas de DODAB BF e dos arranjos aniônicos de DODAB BF/ CMC e catiônicos de DODAB BF/ CMC/ PDDA. DODAB BF catiônicos foram, numa primeira etapa, cobertos com o polieletrólito aniônico CMC, e então, revestidos pelo polieletrólito catiônico PDDA. Os diâmetros e potenciais-zeta destas dispersões foram determinados em uma faixa de concentrações de CMC ou PDDA.

As soluções estoque e as partículas foram preparadas em solução isotônica de D-glicose 0,264M para preservar a isotonicidade entre os compartimentos interno e externo da célula bacteriana.

3.4. Determinação de distribuição de tamanho, diâmetro médio e potencial-zeta das partículas híbridas

Os diâmetros e potenciais-zeta das dispersões foram determinados utilizando o equipamento ZetaPlus Zeta-Potential Analyser (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA), equipado com um laser de 570 nm e um espalhamento de luz dinâmico a 90° para determinação do diâmetro médio das partículas (GRABOWSKI & MORRISON, 1983; MANUAL DE INSTRUÇÕES BROOKHAVEN, 1997; PECORA, 2000). O diâmetro médio referido neste trabalho, a partir de agora, deve ser compreendido como o diâmetro hidrodinâmico médio D_z . Os potenciais-zeta (ζ) foram determinados pela mobilidade eletroforética (μ) e equação de Smoluchowski $\zeta = \mu\eta/\epsilon$, na qual η e ϵ são viscosidade do meio e constante dielétrica, respectivamente (MANUAL DE INSTRUÇÕES BROOKHAVEN, 1997; O'BRIEN & WHITE, 1978).

A determinação do potencial-zeta das partículas baseia-se no princípio de que quando é aplicado um campo elétrico em partículas carregadas, estas se movem para o pólo positivo ou para o pólo negativo do campo aplicado. O sentido que elas tomam é uma indicação do sinal da carga que carregam. A velocidade com que elas se movem é proporcional ao valor da carga. Utilizando a aproximação de Smoluchowski, o potencial-zeta pode ser determinado através da velocidade eletroforética, admitindo um determinado tamanho de partícula na presença de um campo elétrico. Para medidas de pequenas mobilidades eletroforéticas, o Zeta Potential Analyser baseia-se na análise das diferenças de fase da luz espalhada (PALS), para determinar a mobilidade eletroforética (μ) e, a partir disso, calcular o potencial-zeta (ζ) usando a aproximação de Smoluchowski (MANUAL DE INSTRUÇÕES BROOKHAVEN, 1997).

A determinação do diâmetro das partículas, na dispersão, é realizada no mesmo equipamento. Essas partículas são fontes secundárias de luz espalhada, e por estarem em movimento Browniano, produzem flutuações desordenadas no sinal de intensidade de luz espalhada, com um procedimento temporal dependente do tamanho e forma da partícula. No espalhamento dinâmico quase-elástico de luz, a dependência temporal das flutuações pode ser determinada através de uma função de autocorrelação, cujo coeficiente de decaimento está relacionado com o coeficiente Browniano médio de difusão (D_0) das partículas, que por sua vez está

relacionado com o tamanho (raio hidrodinâmico) da partícula. No limite de baixa concentração das partículas, em que as interações hidrodinâmicas podem ser desprezadas, o diâmetro médio da partícula (d), pode ser calculado através da equação de Stokes-Einstein $D_0 = k_B T / 6 \pi \eta(t) d$, onde k_B é a constante de Boltzmann ($1,38054 \times 10^{-16}$ erg/deg), T é a temperatura em K, $\eta(t)$ (poise) é a viscosidade do solvente (HANUS & PLOEHN, 1999; PECORA, 2000). É importante ressaltar que as medidas de diâmetro determinadas para as partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA são medidas de diâmetro aparentes, já que as medidas determinadas pelo equipamento são todas realizadas supondo que as partículas são esferas rígidas, e estas partículas híbridas são discoidais.

3.5. Determinação da atividade antimicrobiana das partículas híbridas

Foram realizados ensaios com 1 hora e 24 horas de interação entre 0,9 mL da suspensão bacteriana padronizada e 0,1 mL de diferentes diluições de cada particulado. As partículas foram diluídas até 1000 (para partículas compostas por 0,1 mM de DODAB, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA) ou 10000 vezes (para partículas compostas por 0,5 mM de DODAB, 0,5 mg/mL de CMC e 0,5 mg/mL de PDDA), para proceder com as interações. Após o tempo de interação, foi realizado plaqueamento, em triplicata, em AMH, de 100 μ L de cada diluição das partículas, diluídas 20000 vezes em D-glicose 0,264M, para inocular cerca de 100 células por placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O controle positivo foi realizado pela interação de 0,9 mL da suspensão bacteriana e 0,1 mL de solução de D-glicose 0,264M, e plaqueado 100 μ L da diluição de 20000 vezes. A viabilidade celular (%) é apresentada como um valor médio $\pm$ o desvio padrão médio de UFC/mL.

3.6. Preparação e caracterização de filmes híbridos de polímero e compostos de amônio quaternário

Os filmes híbridos polímero-composto de amônio quaternário foram obtidos pela técnica de revestimento rotacional, utilizando como suporte para o filme

lamínulas de vidro, de 20 mm x 20 mm. O polímero utilizado na preparação dos filmes híbridos foi o poli (metil metacrilato) (PMMA) e como compostos de amônio quaternário (CAQs), o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) ou o brometo de tetrapropilamônio (TPAB). Foi utilizado como solvente para a preparação das soluções o clorofórmio, já que este foi um bom solvente tanto para o polímero, quanto para os CAQs. As soluções foram preparadas em concentrações finais de 10mg/mL para o PMMA, e concentrações de CAQs variando de 2,4 mg/mL a 0,01875 mg/mL de DODAB, 1,38 a 0,01092 mg/mL de CTAB ou ainda 1,011 a 0,008 mg/mL de TPAB, preparadas em diluição seriada de fator 2. Tais concentrações de CAQs utilizadas correspondem à mesma faixa de variação no que se refere a proporções molares, o que corresponde a uma variação de 3,8 mM a 0,03 mM. Todos os filmes foram obtidos utilizando o *spinner* Headway PWM32-PS-R790 (Garland, U.S.A.), que opera a uma velocidade de 3000 rpm, durante 30 segundos, a 24 ± 1 °C e $50 \pm 5\%$ de umidade relativa.

As medidas de ângulo de contato (θ) foram realizadas utilizando o método da gota séssil, a 24 ± 1 °C em um equipamento caseiro (ADAMSON & GAST, 1997). Uma gota de água é colocada sobre a superfície em estudo, e o ângulo que ela forma com a superfície durante o avanço e recesso é medido através de sua projeção em um anteparo, e digitalmente fotografado. Através de um programa adequado, que neste caso é o Corel Draw, os ângulos são medidos. Gotas de 8 e 4 μ L de água pura foram depositadas sobre o substrato seco (filme híbrido) utilizando uma microseringa, para determinar os ângulos de contato de avanço (θ_A) e recesso (θ_R), respectivamente. Para evitar os efeitos de dessorção, as medidas de θ levaram, no máximo, 5 minutos.

As medidas de tensão superficial na interface ar-água (γ) dos filmes híbridos foram determinadas pelo método do anel de Du Noüy, utilizando-se o equipamento Dynometer (Byk-Labotron Dynometer, Germany) (Figura 3.1). Neste método mede-se a força necessária para desprender um anel de platina da superfície do líquido, suspendendo o anel pendurado a um braço conectado a uma balança. O Dynometer mede uma determinada massa nas duas direções de ação, seja levantando ou abaixando uma plataforma onde é colocado o recipiente contendo o líquido cuja propriedade quer se determinar (SHAW, 1980a; HIEMENZ, 1986).

Figura 3.1 Dinamômetro ou Dynometer, equipamento utilizado para as medidas de tensão superficial na interface ar-água.

As medidas de γ dos filmes híbridos foram determinadas a fim de verificar se os lípides catiônicos, presentes nos filmes, seriam capazes de ser liberados dos filmes para o líquido em que se encontravam submersos, neste caso, a água ultrapura, de tensão superficial conhecida (72 mN/m). Caso fossem liberados dos filmes, os lípides poderiam se deslocar para a interface ar-água e, então, ocorreria redução dos valores de tensão superficial da água. Para a realização das medidas foram utilizados béqueres de teflon por ser mais hidrofóbico do que os de vidro ou acrílico. As medidas foram procedidas a uma temperatura de 25 °C, em que as lamínulas dos filmes híbridos, com a maior concentração de cada CAQ, foram submersas no béquer de teflon contendo 10 mL de água ultrapura, e realizadas as leituras das respectivas tensões superficiais após transcorrido o tempo desejado, entre 30 minutos e 48 horas.

3.7. Determinação da atividade antimicrobiana dos filmes híbridos

3.7.1. Contagem de viáveis pelo método do plaqueamento

Foram realizados ensaios com 1 hora de interação entre os filmes híbridos, compostos de PMMA e diferentes concentrações de DODAB, CTAB ou TPAB e as suspensões bacterianas. As suspensões de *P. aeruginosa* ou de *S. aureus* foram padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (absorbância de

0,08 a 0,1 em $\lambda=625$ nm) (CHAPIN & LAUDERDALE, 2007) e então diluídas 100 vezes em solução isotônica de D-glicose 0,264M (9,9mL de D-glicose + 100 μ L de suspensão bacteriana padronizada). Desta suspensão bacteriana diluída, foi retirada uma alíquota de 60 μ L e colocada sobre a lamínula de vidro contendo o filme, ou então somente sobre a lamínula de vidro ou filmes contendo apenas PMMA como controles, e deixado interagir filme-bactéria por 1 hora, em câmara úmida. Após o tempo de interação, a lamínula foi colocada em tubo contendo 10mL de D-glicose, e agitado em vórtex por 1 minuto. Após a agitação, foi plaqueada uma alíquota de 100 μ L em AMH e incubado por 24 horas, a 37 °C, para então proceder com a contagem das colônias e, conseqüentemente, obtenção de UFC/mL (JAMPALA *et al.*, 2008). O cálculo para conversão da contagem de colônias (X) em UFC/mL (Z) está descrito abaixo.

N° cols ----- 100 μ L
 X ----- 1000 μ L
 X = _____ UFC/mL

X UFC ----- 1 mL
 Y ----- 10 mL
 Y = _____ UFC

Y UFC ----- 60 μ L
 W ----- 1000 μ L
 W = _____ UFC/mL

W UFC/mL X 10^2 (para corrigir
 diluição de 1:100)
 Z = _____ UFC/mL

3.7.2. Halo de inibição

Foi realizado também um ensaio qualitativo da interação filme-bactéria. As suspensões de *P. aeruginosa* ou de *S. aureus* foram padronizadas de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland (absorbância de 0,08 a 0,1 em $\lambda=625$ nm) e então semeadas, com auxílio de *swab*, em toda a superfície da placa contendo AMH, a fim de formar um “tapete bacteriano” na superfície do ágar. Após semear as células bacterianas, a lamínula contendo o filme híbrido, ou então filmes contendo apenas PMMA ou ainda somente a lamínula de vidro como controles, foram cuidadosamente colocadas sobre o ágar semeado, com o filme híbrido voltado para a superfície do ágar, e incubado por 24 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, foi realizada a leitura do halo de inibição. A atividade antimicrobiana mensurada pelo halo de inibição (HI) deve ser compreendida como a zona de não crescimento bacteriano ao redor da lamínula, assim como está esquematicamente ilustrado na Figura 3.2.

Lembrando que as lamínulas utilizadas para a preparação dos filmes são de vidro, quadradas, medindo 20 mm X 20 mm. Segundo a literatura, a presença de um halo de inibição deve ser interpretada como a liberação do componente antimicrobiano do filme, sendo difundido para o ágar (SUPPAKUL *et al.*, 2008; DVORACEK *et al.*, 2009).

Figura 3.2 Determinação de halo de inibição de crescimento bacteriano (HI) pelos filmes híbridos (em verde) a partir das bordas da lamínula (em laranja). Notar que o filme está em contato com o ágar e o suporte de vidro está voltado para o ar.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção de partículas híbridas pequenas e grandes

Pelo método da sonicação, foram obtidos fragmentos de bicamada (BF) positivamente carregados de DODAB, de aproximadamente 80 nm, e, com potencial-zeta (ζ) de aproximadamente 42 mV. A distribuição de tamanho de DODAB BF está na Figura 4.1. Na Tabela 2 estão representados a estrutura química do DODAB e o esquema do DODAB BF.

Figura 4.1 Distribuição de tamanho dos fragmentos de bicamada de DODAB a 2 mM.

As partículas híbridas e catiônicas foram construídas a partir dos fragmentos de bicamada de DODAB. DODAB BF, catiônicos, foram envolvidos pelo polieletrólito aniônico CMC, até que os arranjos de DODAB BF/ CMC se tornassem estáveis e negativamente carregados. A seguir, os arranjos aniônicos de DODAB BF/ CMC foram revestidos pelo polieletrólito catiônico, até que os arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDPA se tornassem estáveis e positivamente carregados. A Tabela 2 apresenta as estruturas químicas de DODAB, CMC e PDPA, além dos esquemas para DODAB BF e para os arranjos de DODAB BF/ CMC e DODAB BF/ CMC/ PDPA.

Tabela 2. Estruturas químicas do lípide catiônico e dos polieletrólitos e esquemas de seus arranjos.

<i>Arranjos ou Estruturas químicas</i>	<i>Nome e abreviação</i>
<p>$R = H \text{ or } CH_2CO_2H$</p>	Carboximetilcelulose sódica (CMC)
Cloreto de Poli (dialildimetilamônio) (PDAA)
Brometo de Dioctadecildimetilamônio (DODAB)
Fragmentos de bicamada catiônicos de DODAB (DODAB BF)
Esquema do arranjo do sistema particulado DODAB BF / CMC
Esquema do arranjo do sistema particulado DODAB BF / CMC / PDAA

Para a construção de dois tamanhos diferentes de partículas híbridas, pequenas e grandes, partimos de duas concentrações diferentes de DODAB BF, sendo 0,1 ou 0,5 mM, respectivamente. A interação de DODAB BF, catiônicos, nas duas concentrações utilizadas, com o polieletrólito aniônico CMC, em função da concentração de CMC, foi avaliada através de determinações dos diâmetros médios

(Dz) e dos potenciais-zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC. A variação de Dz e ζ destes arranjos, em função da concentração de CMC, está na Figura 4.2.

Figura 4.2 Diâmetro médio (Dz) e potencial zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC em função da concentração de CMC, a 0,1mM (A e B) e 0,5mM (C e D) de DODAB.

A interação do polieletrólito aniônico CMC com os fragmentos de bicamada catiônicos de DODAB, em ambas as concentrações de partida, a princípio resultou em uma redução nos valores de ζ (Figura 4.2B e 4.2D), até o ponto em que ocorreu a neutralização das cargas. Enquanto isso houve um aumento nos valores de Dz (Figura 4.2A e 4.2C), até que se observasse visivelmente o ocorrimto de floculação, no ponto em que ζ era igual a 0 mV. Após o ponto de neutralidade das cargas, e com o aumento da concentração de CMC, os arranjos de DODAB BF/ CMC passaram a possuir características de ζ negativo (Figura 4.2B e 4.2D), ao passo que houve uma estabilização de tamanhos (Figura 4.2A e 4.2C), para então Dz voltar a aumentar com o contínuo aumento da concentração de CMC. Portanto, para construção das partículas foram selecionadas concentrações de CMC, que

demonstraram revestir DODAB BF, resultando em arranjos de DODAB BF/ CMC aniônicos e estáveis. As concentrações escolhidas foram 0,1 ou 0,5 mg/mL de CMC para interagir com 0,1 ou 0,5 mM de DODAB, respectivamente.

Em duas concentrações diferentes de DODAB (0,1 e 0,5 mM), Dz apresentou um comportamento não-monotônico, primeiramente aumentando o tamanho dos particulados presentes na dispersão, alcançando um máximo (ponto este em que foi possível visualizar floculação), diminuindo e então aumentando novamente, em função da concentração de CMC (Figura 4.2A e 4.2C). A menor estabilidade coloidal foi observada quando Dz encontrava-se no máximo, e o potencial-zeta estava em zero, ou seja, quando os arranjos não possuíam uma rede de cargas estabilizando-os (Figura 4.2B e 4.2D). Nesta figura, existem duas regiões de grande estabilidade coloidal, com tamanho pequeno dos particulados e grandes valores absolutos para o potencial-zeta: a primeira para arranjos positivamente carregados, em baixas concentrações de CMC, e a segunda para arranjos negativamente carregados. No entanto, em uma faixa de altas concentrações de CMC, Dz voltou a aumentar com o aumento da concentração de CMC (Figura 4.2A e 4.2C). A explicação mais sensata para este último aumento em Dz seria a chamada *bridging flocculation* (COHEN-STUART, 1991). Partindo da região de maior estabilidade coloidal para os arranjos aniônicos de DODAB BF/ CMC, duas concentrações de CMC foram selecionadas: 0,1 (Figura 4.2A) e 0,5 mg/mL de CMC (Figura 4.2C).

A partir dos arranjos aniônicos de DODAB BF/ CMC, nas concentrações escolhidas, ocorreu a interação com o polieletrólito catiônico PDDA. Determinações dos diâmetros médios (Dz) e dos potenciais-zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA, nas duas diferentes concentrações, foram realizadas em função da concentração de PDDA. A variação de Dz e ζ destes arranjos está na Figura 4.3.

A interação do polieletrólito PDDA com os arranjos aniônicos de DODAB BF/ CMC, nas duas diferentes concentrações, a princípio resultou em aumento nos valores de ζ , até o ponto em que ocorreu a neutralização das cargas. Após o ponto em que ζ era de 0 mV, os arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA passaram a possuir valores de ζ positivos (Figura 4.3B e 4.3D). Com o aumento da concentração de PDDA, os arranjos permaneceram bastante estáveis, com Dz praticamente constante, apenas com uma pequena elevação de Dz na neutralização das cargas, porém, sem visualizar floculação (Figura 4.3A e 4.3C).

Figura 4.3 Diâmetro médio (Dz) e potencial zeta (ζ) dos arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA, ou partículas, em função da concentração de PDDA. Concentrações finais de DODAB são 0,1 (A e B) ou 0,5 mM (C e D). Concentrações finais de CMC são 0,1 (A e B) ou 0,5 mg/mL (C e D).

Em concentrações elevadas de PDDA, os arranjos, já catiônicos, de DODAB BF/ CMC/ PDDA apresentaram aumento de Dz. Sendo assim, para construção das partículas foram selecionadas concentrações de PDDA que mostraram revestir os fragmentos de DODAB BF/ CMC, resultando em arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA estáveis e positivamente carregados. Para construção das partículas híbridas com menor tamanho (pequenas), os arranjos foram formados a partir de 0,1 mM de DODAB, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA. Da mesma forma, para construção das partículas com maior tamanho (grandes), os arranjos foram formados a partir de 0,5 mM de DODAB, 0,5 mg/mL de CMC e 0,5 mg/mL de PDDA.

O comportamento geral de tamanho e potencial-zeta para os arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA ao aumentar a concentração de PDDA (Figura 4.3) foi semelhante ao comportamento observado para os arranjos de DODAB BF/ CMC (Figura 4.2). Entretanto, no potencial-zeta igual a zero, o aumento em Dz foi suave e nenhuma floculação foi visualizada (Figura 4.3), em contraste com a extensa

floculação e aumento no Dz demonstrado na Figura 4.2 para os arranjos de DODAB BF/ CMC a $\zeta = 0$. Em uma faixa de altas concentrações de PDDA, Dz aumentou sugerindo uma pronunciada *bridging flocculation* para as partículas de DODAB BF/ CMC/ PDDA (Figura 4.3), em contraste com a suave *bridging flocculation* para os arranjos de DODAB BF/ CMC (Figura 4.2).

A rigidez das cadeias dos polieletrólitos pode variar substancialmente, entre cadeias flexíveis e rígidas. A rigidez do PDDA poderia causar uma significativa repulsão estérica entre as partículas de DODAB BF/ CMC/ PDDA, levando à ausência de flocação quando $\zeta = 0$ mV, e uma pronunciada *bridging flocculation* em uma faixa de elevadas concentrações de PDDA, demonstrados na Figura 4.3. A repulsão estérica seria um fator determinante da estabilidade coloidal na região de $\zeta = 0$ mV, quando a repulsão eletrostática entre as partículas da dispersão é ausente. Os resultados aqui apresentados concordam com a literatura disponível para sistemas semelhantes a este. Por exemplo, foram apresentadas diferenças marcantes em relação a coacervados obtidos de albumina do soro bovino (BSA – *bovine serum albumin*) com cloreto de poli (dialildimetilamônio) (PDADMAC) ou quitosana (KAYITMAZER *et al.*, 2007). Diversos fatores, tais como a rigidez dos polímeros, curvatura da superfície, e a força das interações polímero-superfície podem determinar a natureza do arranjo (STOLL & CHODANOWSKI, 2002). Uma explicação alternativa também poderia ser uma maior constante de ligação para CMC/ PDDA do que para DODAB BF/ CMC. A coacervação com quitosana ocorreu mais rapidamente do que com PDADMAC. As viscosidades dos coacervados obtidos com a quitosana demonstraram ser mais do que uma ordem de magnitude maior, e ao contrário daqueles obtidos com PDADMAC, demonstraram dependência da temperatura e da taxa de cisalhamento. Para os coacervados com PDADMAC, baixos ângulos de espalhamento de íons sugeriram que os domínios não eram tão interligados como naqueles obtidos com quitosana, além de uma reduzida difusão protéica. As diferenças nas propriedades foram, portanto, correlacionadas com diferenças na estrutura de mesofase (KAYITMAZER *et al.*, 2007).

De forma semelhante, o CMC adsorveu nos DODAB BF, revelando diferenças na estabilidade coloidal quando comparado aos arranjos de DODAB BF/ CMC/ PDDA. Possivelmente, a camada de CMC representou uma cobertura externa muito mais hidratada do que o revestimento fornecido pelo PDDA.

Polieletrólitos catiônicos têm demonstrado atividade biocida contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *E. coli* BL21, com plasmídeos para azurin e resistência à ampicilina) e esporos de bactérias Gram-positivas. O revestimento das bactérias com polieletrólitos foi visível na microscopia de fluorescência graças à emissão de fluorescência por esses polieletrólitos conjugados que permite visualizar interações entre os mesmos e as bactérias (LU *et al.*, 2005).

Composição e propriedades das partículas híbridas catiônicas, pequenas ou grandes, selecionadas para proceder com a avaliação da atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, estão na Tabela 3.

Tabela 3. Composição e propriedades físicas de partículas pequenas e grandes, obtidas a partir de DODAB BF/ CMC/ PDDA pela técnica de auto-montagem.

Arranjo	[DODAB] (mg/mL)	mM	[CMC] (mg/mL)	[PDDA] (mg/mL)	Dz (nm)	ζ (mV)
Partículas Pequenas	0,063	0,1	0,1	0,1	108±1	30±1
Partículas Grandes	0,315	0,5	0,5	0,5	473±5	52±1

Partículas catiônicas, com diâmetros médios de 108±1 e 473±5 nm, e potenciais-zeta iguais a 30±1 e 52±1 mV, respectivamente, apresentaram as distribuições de tamanho mostradas na Figura 4.4.

Figura 4.4 Distribuição de tamanho das partículas pequenas (A) e grandes (B) de DODAB BF/ CMC/ PDDA.

4.2. Atividade antimicrobiana das partículas híbridas pequenas e grandes

Após a construção das partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA, foi avaliada a atividade antimicrobiana de ambas as partículas, pequenas e grandes, contra cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Também foi avaliada a ação antimicrobiana de cada componente da partícula isoladamente, a fim de verificar se a atividade das partículas híbridas era, de fato, maior do que os compostos separadamente, já que na sua composição estão presentes dois compostos com grupamentos de amônio quaternário, DODAB e PDDA. A viabilidade celular bacteriana em função da concentração de PDDA ou da concentração de DODAB como únicos agentes antimicrobianos, ou das concentrações de PDDA e DODAB combinados como partículas pequenas está na Figura 4.5, e como partículas grandes, está na Figura 4.6.

Figura 4.5 Efeito de partículas híbridas pequenas sobre a viabilidade celular bacteriana (%) mostrada em função das concentrações finais de PDDA e DODAB (□). Controles mostram o efeito de DODAB BF (○) ou PDDA (△). A interação ocorreu por 1 hora, e as concentrações celulares foram $4 - 8 \times 10^7$ e $2 - 3 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

As curvas de viabilidade apresentadas nas Figuras 4.5 e 4.6 revelam os potentes efeitos bactericidas de todos os compostos (DODAB e PDDA) e arranjos catiônicos (DODAB BF/ CMC/ PDDA), contra as duas espécies bacterianas testadas, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Figura 4.6 Viabilidade celular bacteriana (%) em função das concentrações finais de PDDA e DODAB combinados nas partículas grandes (□). Controles foram DODAB BF(○) ou PDDA (Δ). A interação ocorreu por 1 hora, e as concentrações celulares foram de $4 - 6 \times 10^7$ e $2 - 4 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

A atividade antimicrobiana das partículas híbridas pequenas e grandes também foi avaliada, contra os dois micro-organismos, após 24 horas de interação, em solução de D-glicose 0,264 M, a fim de verificar se com maior tempo de interação partículas-bactéria, a ação antimicrobiana dos compostos e arranjos catiônicos seria maior do que a ação dos mesmos após 1 hora de interação. A comparação de viabilidade celular após 1 e 24 horas de interação dos micro-organismos com as partículas está na Figura 4.7 para as partículas pequenas, e na Figura 4.8 para as partículas grandes.

Tanto para as partículas pequenas (Figura 4.7) quanto para as partículas grandes (Figura 4.8) é possível observar a atividade antimicrobiana máxima após 1 hora de interação partículas híbridas – bactéria.

Figura 4.7 Viabilidade celular (%) de *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 1 hora (□) e 24 horas (○) de interação com as partículas híbridas pequenas. As concentrações celulares foram de $6 - 8 \times 10^7$ e $2 - 3 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

Figura 4.8 Viabilidade celular (%) de *P. aeruginosa* e *S. aureus* após 1 hora (□) e 24 horas (○) de interação com as partículas híbridas grandes. As concentrações celulares foram de $3 - 5 \times 10^7$ e $2 - 3 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

As doses de DODAB, PDDA ou DODAB/ PDDA hibridizados nas partículas, pequenas ou grandes, necessárias para matar 99% e 50% das células bacterianas, após 1 hora de interação, estão relacionadas na Tabela 4. As doses de DODAB e PDDA necessárias para matar 99% das células de *P. aeruginosa* e *S. aureus* podem

ser consideradas como concentrações bactericidas mínimas (CBM), considerando, porém, as condições especiais do meio circundante das células exigida pelos bactericidas catiônicos para continuar a serem efetivos. Estas condições são, por exemplo, a ausência de meio de cultura e baixa força iônica do meio, a fim de evitar blindagem da dupla camada elétrica dos bactericidas e arranjos catiônicos, o que impediria suas adsorções às células bacterianas.

Tabela 4. Concentrações do polieletrólito catiônico (PE) e/ou lípide catiônico (LC) necessárias para atingir 99 e 50% de morte celular. PE é PDDA e LC é DODAB. Delta (δ) representa o desvio padrão médio.^a Dados de CAMPANHÃ *et al.*, 1999; *Partículas pequenas e **grandes, a partir de 0,1 e 0,5 mM de DODAB, respectivamente.

Dispersão	Dz $\pm$ δ	$\zeta \pm \delta$	[PE] _{99/50}	[LC] _{99/50}	[PE] _{99/50}	[LC] _{99/50}
	(nm)	(mV)	(μg/mL)		(μg/mL)	
			<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
DODAB BF	79 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1		3.0/1.2		-/1.8
DODAB BF				6.3 ^a /3.1 ^a		7.5 ^a /4.4 ^a
PDDA	-	-	1.0/0.5		10.0/0.5	
DODAB/ CMC/ PDDA*	108 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1	2.0/0.9	1.0/0.5	10.0/0.5	6.0/0.3
DODAB/ CMC/ PDDA**	470 $\pm$ 5	52 $\pm$ 1	2.0/0.7	1.0/0.4	10.0/0.4	6.0/0.3

As doses necessárias para matar as células de *S. aureus* foram sempre maiores do que aquelas necessárias para matar as células de *P. aeruginosa* (Tabela 4). De fato, as células Gram-negativas de *P. aeruginosa* foram mais sensíveis a todos os compostos e arranjos catiônicos, obtendo morte celular a concentrações finais bastante baixas, na faixa de 1 – 6 μg/mL. Por outro lado, as células Gram-positivas de *S. aureus* demonstraram menor sensibilidade a todos os compostos e arranjos catiônicos, obtendo morte celular na faixa de 6 – 10 μg/mL de concentrações finais, sendo que contra DODAB BF apenas, 99% de morte celular de *S. aureus* não foi obtido, conforme mostrado na Tabela 4. Recentemente, Otto descreveu um sistema sensor para moléculas antimicrobianas catiônicas em *Staphylococcus* sp., que causaria resistência aos agentes antimicrobianos catiônicos (Figura 4.9) (OTTO, 2009). Este sistema seria composto por uma porção no meio extracelular, com alta densidade de resíduos de aminoácidos negativamente carregados, o qual atrai e interage com as moléculas antimicrobianas catiônicas.

Após esta interação, ocorre uma transdução de sinal, através deste sistema sensor, o que desencadeia a D-alanilação dos ácidos teicóicos e a lisilação do fosfatidilglicerol, promovendo a redução da carga negativa da superfície celular e da membrana, respectivamente, o que acaba por diminuir a atração ou até repelindo as moléculas catiônicas. Tal sistema poderia explicar a menor sensibilidade aos compostos e grupamentos catiônicos exibida por *S. aureus*, em comparação com *P. aeruginosa* (Tabela 4).

Figura 4.9 Sistema sensor para compostos antimicrobianos catiônicos desenvolvido por espécies de *Staphylococcus* (OTTO, 2009).

A eficiência notável do PDDA como agente antimicrobiano foi descrita a partir dos valores obtidos para CBM, no intervalo de concentrações de 1 – 10 µg/mL (Tabela 4). Considerando a média de 150.000g como peso molecular do PDDA, a conversão de µg/mL para concentrações em nanomolar fornece uma faixa equivalente de 6,6 – 66 nM. Desta forma, PDDA pode ser considerado como nanobactericida, enquanto os valores obtidos com DODAB para CBM na faixa de 3 – 7,5 µg/mL (equivalente a 4,7 – 12,0 µM) classificam-no como microbactericida. Na era da química verde, quando o meio ambiente requer proteção, e a resistência microbiana das bactérias patogênicas requer tratamentos cada vez mais agressivos, nanobactericidas podem ser a solução equilibrada. Concentrações em nanoescala

poderiam não prejudicar o meio ambiente, mas ainda assim poderiam matar bactérias patogênicas.

Os compostos e arranjos catiônicos podem ser ordenados de acordo com sua eficiência bactericida contra ambas as espécies bacterianas testadas: DODAB BF/CMC/ PDDA $\approx$ PDDA > DODAB BF (Tabela 4). Esta sequência sugere que a camada que é, de fato, efetiva contra os micro-organismos é a camada mais externa das partículas catiônicas, caso contrário o arranjo teria sido efetivo em doses menores do que as necessárias quando somente PDDA foi utilizado como agente bactericida. A explicação de menor eficiência do DODAB BF quando comparada à atividade bactericida do PDDA pode ser decorrente dos diferentes contra-íons do lípide e do polieletrólito catiônicos: brometo e cloreto, respectivamente. Cloreto liga-se com menor afinidade do que o brometo à porção de amônio quaternário (MORGAN *et al.*, 1995).

O efeito microbicida *in vitro* descrito neste trabalho pode ser diferente do que aconteceria *in vivo*, na quimioterapia antimicrobiana. Lipossomos e partículas carreando agentes antimicrobianos são submetidos ao meio biológico numa sequência específica de eventos: 1) opsonização ou preparação para a fagocitose, isto é, adsorção química ou física de componentes imunes e não imunes do sangue, tais como imunoglobulinas, albumina, complemento e fibronectina; 2) fagocitose ou captação pelos macrófagos do sistema retículo-endotelial (SRE) (fígado e baço); 3) no caso dos carreadores lipídicos, a remoção das moléculas de fosfolipídios das vesículas pelas lipoproteínas de alta densidade (HDL – *high-density lipoproteins*) do plasma, levando à desintegração da vesícula (GREGORIADIS, 1995). Isto significa que os antimicrobianos catiônicos, na forma de lipossomos ou partículas, estarão localizados no interior de macrófagos, ou seja, no mesmo local onde estão as bactérias infectantes do organismo. Na verdade, a capacidade de lipossomos ou partículas transportadoras para entregar antibióticos contra bactérias, *in vivo*, é demonstrada na literatura desde a década de 70 (GREGORIADIS, 1976 a; GREGORIADIS, 1976 b).

Através das doses de PDDA e DODAB, hibridizados nas partículas, necessárias para matar 99% e 50% das células bacterianas (Tabela 4) é possível observar que são praticamente as mesmas, tanto para as partículas pequenas quanto para as partículas grandes. Este resultado sugere que o tamanho das partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA não interfere na atividade

antimicrobiana, mas sim as doses dos componentes catiônicos presentes nas partículas é que são determinantes para tal atividade.

Para confirmar se a atividade antimicrobiana das partículas híbridas realmente independe do tamanho das partículas, mas sim está relacionada às concentrações de DODAB e PDDA presentes nestes arranjos catiônicos, o perfil da viabilidade celular foi comparado para as partículas pequenas e grandes, estas últimas diluídas para encontrarem-se nas mesmas concentrações das partículas pequenas, e os resultados estão na Figura 4.10.

Figura 4.10 Viabilidade celular (%) em função das concentrações finais de PDDA e DODAB carregados pelas partículas pequenas (○) ou grandes (Δ). As partículas grandes foram diluídas em 5 vezes para atingir as mesmas doses dos compostos catiônicos carregados pelas partículas pequenas, ambas com as mesmas doses finais de DODAB e PDDA. O tempo de interação entre partículas-bactérias foi de 1 hora. As concentrações celulares finais foram de $4 - 8 \times 10^7$ e $2 - 3 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

As partículas grandes, em concentrações finais de 0,5 mM de DODAB, 0,5 mg/mL de CMC e 0,5 mg/mL de PDDA, foram diluídas em 5 vezes para obter as mesmas concentrações finais das partículas pequenas, que estão em concentrações finais de 0,1 mM de DODAB, 0,1 mg/mL de CMC e 0,1 mg/mL de PDDA. A comparação entre as curvas na Figura 4.10 comprova a independência do efeito antimicrobiano no tamanho das partículas, e a dependência na quantidade de cargas positivas das partículas. Tal resultado, de fato, é consistente com os valores

de MBC equivalentes demonstrados na Tabela 4 para as partículas híbridas pequenas e grandes.

4.3. Filmes híbridos: molhabilidade e difusibilidade de CAQs nos filmes

Conforme já foi descrito na literatura, um trabalho anterior do grupo da professora Ana Maria Carmona-Ribeiro (PEREIRA *et al.*, 2008) demonstrou que a combinação do CAQ DODAB com o polímero poli (metil metacrilato) (PMMA) apresenta estabilidade e forma filmes híbridos finos e homogêneos, sobre superfícies de *wafers* de silício (Figura 1.7).

Tais filmes, objetos de patente de invenção, foram utilizados como base neste estudo, porém variando os CAQs que foram hibridizados com o polímero PMMA, a dose dos CAQs nos filmes e o suporte dos mesmos. Os filmes híbridos de polímero e CAQs foram obtidos por revestimento rotacional a partir de uma solução clorofórmica de PMMA e CAQ depositada sobre uma lamínula de vidro. As estruturas químicas dos CAQs DODAB, CTAB e TPAB e do polímero PMMA estão na Tabela 5.

Tabela 5. Estruturas químicas do polímero e dos CAQs utilizados na preparação dos filmes híbridos.

Estruturas químicas	Nome e abreviação
Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)
Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)
Brometo de tetrapropilamônio (TPAB)
Poli (metil metacrilato) (PMMA)

A figura 4.11 apresenta os ângulos de contato de avanço (θ_A) e recesso (θ_R), e as histereses ($\Delta\theta$), ou seja, a diferença entre os valores de ângulo de contato de avanço e de recesso, em função da concentração de DODAB, CTAB ou TPAB presentes nos filmes híbridos de PMMA/ CAQ. As concentrações dos CAQs apresentadas nos gráficos representam as concentrações de DODAB, CTAB ou TPAB, em mM, presentes na solução clorofórmica utilizada na preparação dos filmes híbridos por revestimento rotacional para $[PMMA] = 10 \text{ mg/mL}$.

Figura 4.11 Ângulos de contato de avanço (θ_A) (A) ou recesso (θ_R) (B) e histerese ($\Delta\theta$) em função da concentração de DODAB (□), CTAB (△) ou TPAB (○) para filmes híbridos de PMMA/ CAQ. * θ_A para filmes de PMMA/ DODAB sobre *wafers* de silício (PEREIRA *et al.*, 2008). As barras de erros representam o desvio padrão médio.

Quanto menor o ângulo de contato formado pela gota de água em contato com a superfície do filme, maior a molhabilidade da superfície que está sendo analisada. Sendo assim, para os filmes híbridos PMMA/ CAQ, o ângulo de contato (θ) mostrou uma dependência com a concentração de CAQ. Ao aumentar as concentrações de CAQs presentes nos filmes híbridos, houve uma redução nos valores de ângulo de contato (Figura 4.11A e 4.11B), sugerindo maiores características de molhabilidade para os filmes com altas concentrações de CAQs

do que os filmes compostos somente pelo polímero PMMA ou por baixas concentrações de CAQs. Estes resultados podem ainda sugerir que ao hibridizar o polímero com os CAQs, estes tenham permanecido na interface sólido-ar, pois a exposição de algumas porções do amônio quaternário dos anfífilicos, na interface filme-ar, poderia explicar a diminuição dos valores de ângulo de contato nos filmes híbridos com as maiores concentrações de CAQs. Já os valores da histerese obtidos para os filmes híbridos PMMA/ CAQs (Figura 4.11C) demonstram que a diferença entre os valores do ângulo de contato de avanço e o ângulo de contato de recuo é maior quando a concentração de CAQ presente no filme é também maior, sendo que esta diferença diminui com a redução da quantidade de CAQs presentes nos filmes. Sendo assim, pode-se sugerir que os filmes apresentam maiores características de homogeneidade e menor rugosidade quanto menores as concentrações de CAQs hibridizadas com o polímero PMMA, ao passo que ao aumentar a quantidade de CAQs nos filmes, estes podem apresentar características de superfície mais heterogênea e rugosa, o que acaba por elevar a diferença entre θ_A e θ_R . A diferença observada na Figura 4.11A entre os ângulos de contato de avanço para os filmes híbridos PMMA/ DODAB, obtidos pelos nossos experimentos comparados com os valores obtidos por Pereira e colaboradores pode ser explicada pelas características da superfície utilizada para a preparação dos filmes (PEREIRA *et al.*, 2008). O trabalho de 2008 utilizou como suporte, para produzir os filmes híbridos de PMMA/ DODAB, *wafers* de silício. Tais superfícies são extremamente lisas, com baixíssima rugosidade. Já o vidro, das lamínulas utilizadas em nosso trabalho como suporte para a obtenção de todos os filmes híbridos PMMA/ CAQ, apresenta superfície mais rugosa e com maior molhabilidade em comparação com os *wafers* de silício, o que acaba por gerar menores ângulos de contato formados pela superfície do filme em contato com a gota de água.

A Figura 4.12 apresenta a variação dos valores de tensão superficial (γ) dos filmes híbridos PMMA/ CAQ em função do tempo de submersão destes filmes em 10 mL de água ultrapura. A variação de γ foi determinada para o filme com maior concentração de CAQ, hibridizado com PMMA, ou seja, para o filme contendo 3,8 mM de CAQ em uma solução clorofórmica contendo 10 mg/mL de PMMA. Este valor de CAQ corresponde a aproximadamente 2,4 mg/mL de DODAB, 1,38 mg/mL de CTAB ou 1,011 mg/mL de TPAB.

Figura 4.12 Tensão superficial (γ) na interface ar-água em função do tempo após imersão dos filmes híbridos de PMMA/ DODAB (□), CTAB (Δ) ou TPAB (○), preparados a partir de 10 mg/mL de PMMA e 3,8 mM de CAQ na solução clorofórmica. Os filmes ficaram submersos em 10 mL de água ultrapura.

Os valores de tensão superficial (γ) dos filmes híbridos de PMMA/ DODAB e PMMA/ TPAB (Figura 4.12) não apresentaram alterações significativas em relação à γ da água, que é de 72,0 mN/m, até 48 horas após a submersão do filme híbrido em água ultrapura. Este resultado pode sugerir que ambos os CAQs DODAB e TPAB não estejam difundindo do filme para a solução e desta para a interface ar-água. Isso porque as duplas cadeias hidrocarbônicas de 18 carbonos do DODAB poderiam estar presas na malha polimérica por interação hidrofóbica com a mesma (PEREIRA *et al.*, 2008). A pequena molécula de TPAB, composta por quatro caudas hidrofóbicas, de 3 carbonos cada cauda, ligadas ao átomo de nitrogênio, possivelmente também permaneceria presa no emaranhado polimérico formado pela matriz de PMMA através de suas caudas, não alterando, portanto, os valores de γ . De fato, este CAQ apresentou reduções mais discretas nos valores de ângulo de contato e menores valores de histerese (Figura 4.11), o que reforça a idéia de que a molécula de TPAB permaneça presa à malha polimérica de PMMA, com mínima exposição dos grupamentos de amônio quaternário na superfície do filme. Já os resultados obtidos com os filmes híbridos de PMMA/ CTAB foram diferentes dos obtidos com os outros filmes híbridos de PMMA/ DODAB e PMMA/ TPAB. A redução da tensão superficial em função do tempo para o filme de PMMA/ CTAB (Figura 4.12) chegou a ser de 10 mN/m em relação à tensão superficial da água (72 mN/m)

sugerindo a liberação deste anfifílico do filme híbrido para a solução e desta para a interface ar-água.

4.4. Atividade antimicrobiana dos filmes híbridos

4.4.1. Contagem de viáveis pelo método do plaqueamento

A viabilidade celular (%) dos filmes híbridos de PMMA/ CAQ contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi realizada através de 1 hora de interação filmes-bactéria. Após o tempo de interação, as lamínulas contendo os filmes híbridos e as células bacterianas foram colocadas em solução de glicose, para agitação, diluição e posterior plaqueamento para contagem de células que permaneceram viáveis após o contato com o filme. Na Figura 4.13 está representada a atividade antimicrobiana dos filmes híbridos em função da concentração dos diferentes CAQs hibridizados nos filmes de PMMA, ou seja, em função das concentrações de DODAB, CTAB ou TPAB.

Figura 4.13 Viabilidade celular bacteriana (%) em função da concentração de DODAB (□), CTAB (Δ) ou TPAB (○) em filmes híbridos de PMMA/ CAQ. A interação filme-bactéria ocorreu por 1 hora. Concentrações celulares foram $2,5 \times 10^7$ e $1,5 \times 10^7$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente. Controles foram realizados interagindo bactérias com filmes contendo apenas PMMA ou com lamínulas nuas, obtendo 100 % de células viáveis.

As curvas de viabilidade celular apresentadas na Figura 4.13 demonstram a alta eficiência bactericida dos filmes híbridos de PMMA/ DODAB e PMMA/ CTAB contra os dois micro-organismos testados. Para DODAB, os filmes hibridizados com a maior concentração deste CAQ foram capazes de matar 100% das células bacterianas que permaneceram por 1 hora em contato com o mesmo, e os filmes hibridizados com as menores concentrações de DODAB apresentaram 100% de células viáveis, após o tempo de contato. Considerando os filmes de PMMA/ CTAB, mesmo na menor concentração deste CAQ (correspondente a 0,03 mM) hibridizado com PMMA, não foi possível atingir 100% de células viáveis após 1 hora de interação. Isso significa que até mesmo as menores concentrações de CTAB utilizadas na obtenção dos filmes híbridos PMMA/ CTAB conseguiram matar uma porcentagem de células bacterianas, em relação aos controles dos filmes contendo apenas PMMA ou somente lamínulas de vidro. Portanto, as curvas de viabilidade celular para PMMA/ CTAB, apresentadas na Figura 4.13, foram desenhadas considerando que 100% da viabilidade celular bacteriana ocorreram com a interação filmes controle - bactérias. A Figura 4.13 também apresenta a ausência de atividade antimicrobiana dos filmes híbridos de PMMA/ TPAB. Um resultado bastante interessante, já que da mesma forma que DODAB e CTAB, a molécula de TPAB também contém o grupamento amônio quaternário, que é majoritariamente considerado o responsável pelo mecanismo da atividade antimicrobiana dos compostos que o possuem. No entanto, neste caso de filmes poliméricos hibridizados com moléculas contendo o grupamento amônio quaternário, o resultado sugere a importância da porção hidrofóbica da molécula catiônica para que esta possa exercer seu mecanismo de ação contra células bacterianas. Ou ainda, caso a molécula de TPAB esteja presa no interior da malha polimérica, este resultado poderia sugerir a importância da exposição do grupamento amônio quaternário na superfície do filme para o desempenho da atividade antimicrobiana pela molécula de CAQ.

As doses de DODAB ou CTAB presentes nos filmes híbridos PMMA/ CAQ necessárias para matar 99% e 50% das células bacterianas, após 1 hora de interação, estão relacionadas na Tabela 6. Não estão relacionadas as concentrações referentes aos filmes híbridos de PMMA/ TPAB, pois estes não apresentaram atividade antimicrobiana.

Tabela 6. Concentrações de CAQ nos filmes híbridos para 99% ou 50% de morte celular.

Filme híbrido	Bactéria	[CAQ] _{99/50}	
		(mg/mL)	(mM)
PMMA/ DODAB	<i>P. aeruginosa</i>	2,2 / 0,2	3,5 / 0,32
PMMA/ CTAB		0,5 / 0,04	1,4 / 0,11
PMMA/ DODAB	<i>S. aureus</i>	2,0 / 0,1	3,2 / 0,16
PMMA/ CTAB		0,05 / 0,01	0,14 / 0,03

Como no caso da atividade antimicrobiana das partículas híbridas, as doses de DODAB ou CTAB necessárias para matar 99% das células de *P. aeruginosa* e *S. aureus* podem ser consideradas como CBM, respeitando-se as condições especiais dos meios circundantes das células, exigidas pelos bactericidas catiônicos para continuarem a ser efetivos. As doses de CTAB, presentes nos filmes, necessárias para matar 99% e 50% das células bacterianas testadas (*P. aeruginosa* e *S. aureus*) foram sempre menores do que as doses de DODAB necessárias para exercerem o mesmo efeito antimicrobiano (Tabela 6). A difusibilidade do CTAB provavelmente determinou sua maior atividade antimicrobiana em relação ao DODAB, que foi retido mecanicamente na malha polimérica de PMMA. Todavia, a falta de atividade do TPAB mostrou que a porção hidrofóbica da molécula de CAQ também é importante para determinar a atividade.

4.4.2. Halo de inibição

As lamínulas contendo os filmes híbridos de PMMA/ CAQ foram delicadamente depositadas sobre a superfície de um ágar, previamente semeada com *P. aeruginosa* ou *S. aureus*, com os filmes voltados para o ágar. A formação de uma zona de não crescimento bacteriano, ou halo de inibição, ao redor das lamínulas de vidro (20 mm X 20 mm) contendo os filmes híbridos, foi avaliada. Como controle foi realizado o ensaio com os filmes contendo somente PMMA ou então somente lamínulas de vidro dispostas sobre a superfície de AMH semeada com os micro-organismos. Para ambos os CAQs, DODAB e TPAB, não foi observada a formação de halo de inibição ao redor das lamínulas com os filmes híbridos, em

todas as concentrações de CAQs utilizadas na preparação dos filmes, para os dois micro-organismos testados. Porém, os filmes híbridos de PMMA/ CTAB apresentaram a formação de halo de inibição, apenas contra *S. aureus*, nas duas maiores concentrações de CTAB utilizadas na solução clorofórmica para obtenção dos filmes, ou seja, concentrações de 3,8 e 2 mM, que representam concentrações de 1,38 e 0,728 mg/mL de CTAB, respectivamente. A Figura 4.14 apresenta os halos de inibição formados, ou não, pelos filmes de PMMA/ CAQ contra *S. aureus*, em função da concentração de CAQ presentes na solução clorofórmica em que os filmes foram preparados. Não foi observada a formação de halo de inibição pelos filmes híbridos de PMMA com DODAB, CTAB ou TPAB, contra *P. aeruginosa*.

Figura 4.14 Halo de inibição formado pelos filmes híbridos de PMMA/ CAQ, DODAB ($\square$), CTAB (Δ) ou TPAB ($\circ$) contra *S. aureus*, em função da concentração do CAQ na solução clorofórmica de preparação dos filmes.

Tanto com os filmes híbridos de PMMA/ DODAB quanto com os filmes de PMMA/ TPAB não houve a formação de halo de inibição ao redor das lamínulas (Figura 4.14) e nem a alteração nos valores de γ (Figura 4.12), sugerindo que ambos os CAQs, DODAB e TPAB, devem, de fato, permanecer preso ao polímero do filme, não sendo capaz de difundir-se pelo ágar e exercer atividade antimicrobiana por difusão. Já os resultados apresentados pela formação de halo de inibição pelos filmes híbridos de PMMA/ CTAB, contra *S. aureus* (Figura 4.14), confirmam os resultados apresentados na Figura 4.12 referente às medidas de tensão superficial. A redução nos valores de γ , obtida em função do tempo, para o filme com a maior

concentração de CTAB (Figura 4.12), e a formação de halo de inibição com os filmes preparados com as duas maiores concentrações deste CAQ (Figura 4.14), confirmam que o CTAB deve, de fato, difundir do filme para o meio em que está inserido, seja o meio líquido como a água, ou hidrogel como o ágar do meio. Porém, a atividade antimicrobiana demonstrada pela formação de halo de inibição foi obtida somente quando o filme de PMMA/ CTAB estava em contato com as células de *S. aureus*. Na verdade, a difusão de CTAB do filme para o ágar, formando um halo de inibição do crescimento bacteriano já havia sido anteriormente relatada (DVORACEK *et al.*, 2009). Neste trabalho de 2009, filmes antimicrobianos foram preparados pela técnica de automontagem, em que camadas aniônicas compostas pelo ácido poliacrílico, e camadas catiônicas compostas pelo antimicrobiano CTAB foram alternadamente depositadas sobre uma superfície. Quando estes filmes foram expostos a um ambiente úmido, o agente antimicrobiano (CTAB) foi capaz de difundir-se para fora do filme, inibindo o crescimento bacteriano em regiões vizinhas ao filme. Quanto maior a quantidade de camadas depositadas no filme pelo processo da automontagem, maior a atividade antimicrobiana demonstrada devido à maior quantidade de CTAB impregnando o filme e se difundindo a partir do mesmo para interação com os micro-organismos (DVORACEK *et al.*, 2009). Estes autores ainda demonstraram que as células Gram-positivas de *S. aureus* foram mais sensíveis ao CTAB do que células de bactérias Gram-negativas, que neste caso foram de *E. coli* (DVORACEK *et al.*, 2009). Com os filmes híbridos de PMMA/ CTAB, também obtivemos resultados semelhantes, em que bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) foram mais sensíveis aos agentes antimicrobianos dos filmes do que bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*) (Tabela 6), já que a formação do halo de inibição pelos filmes de PMMA/ CTAB ocorreu apenas contra as células de *S. aureus*.

A maior atividade antimicrobiana apresentada pelos filmes híbridos de PMMA/ CTAB, ou a menor dose de CTAB presentes nos filmes, necessárias para matar 99% e 50% das células de *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabela 6), pode ser relacionada com a maior capacidade de difusão de CTAB dos filmes, quando comparado com o DODAB. O anfifílico CTAB, sendo capaz de difundir-se dos filmes, pode permanecer na suspensão bacteriana aquosa, a qual permaneceu em contato com o filme híbrido, e conseguir entrar mais em contato com as células bacterianas do que se estivesse preso à rede polimérica do filme. Consequentemente, sua ação

antimicrobiana pode ser maior do que a ação do composto anfifílico que não consegue difundir-se do filme, como o DODAB, que deve ser capaz de matar os micro-organismos apenas em contato com as moléculas do anfifílico que estão expostas na superfície do filme. Sendo assim, não é possível comparar a atividade antimicrobiana de DODAB e CTAB, quando as formas de interação com as células bacterianas podem ser diferentes. Por outro lado, a necessidade da presença da porção hidrofóbica da molécula de um anfifílico, para que este exerça uma ação antimicrobiana já foi publicado. Em concentrações submicelares, a ligação da porção hidrofóbica de uma molécula às células de micro-organismos desencadeou a morte celular (AHLSTRÖM *et al.*, 1997). Estes pesquisadores analisaram a atividade de CAQs, em dispersão, com caudas hidrocarbônicas de diferentes comprimentos, contra *Candida albicans*, em condições experimentais diferentes das utilizadas em nosso trabalho. Dos compostos testados, o brometo de hexadeciltrimetilamônio, ou também conhecido como CTAB, foi capaz de ligar-se mais eficientemente às células de *C. albicans* devido ao seu maior balanço hidrofóbico-hidrofílico, quando comparado aos outros CAQs testados (AHLSTRÖM *et al.*, 1997). Além disso, um trabalho mais recente demonstrou, através de experimentos de isoterma de adsorção, que moléculas de CTAB ($7,8 \times 10^9$ moléculas/célula) conseguem adsorver mais em uma célula de *C. albicans* do que moléculas de DODAB ($3,7 \times 10^9$ moléculas/célula) (VIEIRA & CARMONA-RIBEIRO, 2006). Este resultado pode também explicar a maior eficiência bactericida de CTAB devido à sua maior capacidade de adsorção às células de micro-organismos do que o DODAB.

Portanto, o CTAB, possuindo características de difusibilidade dos filmes aliadas a características de maior adsorção às células de micro-organismos, pode justificar as baixas doses presentes na solução clorofórmica, para obtenção dos filmes híbridos, necessárias para exercer sua alta atividade antimicrobiana.

5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos, em forma de partículas e filmes, utilizando diferentes CAQs e polímeros foi o objetivo deste estudo. Com os resultados obtidos, concluímos:

1. Particulados de DODAB BF/ CMC/ PDDA demonstraram alta potência bactericida contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*;
2. PDDA resultou altamente efetivo como agente bactericida tanto isoladamente, em solução, como em composição com as partículas híbridas;
3. *P. aeruginosa* demonstrou ser mais sensível às partículas híbridas do que *S. aureus*;
4. Filmes híbridos de PMMA/ CTAB ou PMMA/ DODAB demonstraram alta potência bactericida contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em contraste com os filmes de PMMA/ TPAB, que não apresentaram atividade antimicrobiana contra os dois micro-organismos testados;
5. CTAB mostrou difusibilidade através dos filmes, evidenciada pela redução da tensão superficial na interface ar-água e pelo halo de inibição;
6. *S. aureus* foi mais sensível aos filmes híbridos do que *P. aeruginosa*;
7. Partículas e filmes antimicrobianos, híbridos de polímeros e CAQs, podem ser utilizados na preparação, revestimento ou incorporação de materiais, tornando-os antimicrobianos, com potencial para aplicações nas áreas farmacêutica, médica, alimentícia e biotecnológica.

6. PERSPECTIVAS

1. Avaliação da toxicidade das partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA;
2. Avaliação da atividade antimicrobiana das partículas híbridas de DODAB BF/ CMC/ PDDA contra *Candida albicans*;
3. Caracterização da rugosidade da superfície e da espessura dos filmes híbridos de PMMA-CAQs através de análises por microscopia de força atômica e elipsometria, respectivamente;
3. Construção de outros novos materiais híbridos antimicrobianos;
4. Preparação de filmes híbridos de polímeros biodegradáveis como ésteres de celulose e CAQs;
5. Preparação de filmes pela técnica de auto-montagem híbridos de DODAB BF, CMC e PDDA;
6. Preparação de partículas híbridas de PMMA com CAQs;
7. Avaliação da atividade antimicrobiana e da toxicidade destes novos materiais híbridos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKART, W.B.; CAMP, R.L.; WHEELWRIGHT, W.L.; BYCK, J.S. Antimicrobial polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.9, n.1, p.55-68, 1975.

ADAMSON, A.W.; GAST, A.P. In: **Physical Chemistry of Surfaces**. 6.ed. New York: Wiley, 1997.

AHLSTRÖM, B.; CHELMINSKA-BERTILSSON, M.; THOMPSON, R.A.; EDEBO, L. Submicellar complexes may initiate the fungicidal effects of cationic amphiphilic compounds on *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.3, p.544-550, 1997.

ALTERTHUM, F. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.7-19.

ARAUJO, F.P.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Colloid stability of sodium dihexadecyl phosphate/poly(diallyldimethylammonium chloride) decorated látex. **Langmuir**, v.21, n.21, p.9495-9501, 2005.

ARCIOLA, C.R.; RADIN, L.; ALVERGNA, P.; CENNI, E.; PIZZOFEERRATO, A. Heparin surface treatment of poly(methylmethacrylate) alters adhesion of a *Staphylococcus aureus* strain: Utility of bacterial fatty acid analysis. **Biomaterials**, v.14, n.15, p.1161-1164, 1993.

BAJPAI, A.K.; MISHRA, A. Carboxymethyl cellulose (CMC) based semi-IPNs as carriers for controlled release of ciprofloxacin: an in vitro dynamic study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.19, n.5, p.2121-2130, 2008.

BANERJEE, D.; FRAISE, A.; CHANA, K. Writing pens are an unlikely vector of cross-infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Hospital Infection**, v.43, n.1, p.73-75, 1999.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S.J. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive Cocci. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. Washington: ASM Press, 2007. v.1, p.390-411.

BERBARI, E.F.; HANSEN, A.D.; DUFFY, M.C.; STECKELBERG, J.M.; ILSTRUP, D.M.; HARMSSEN, W.S.; OSMON, D.R. Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, n.5, p.1247-1254, 1998.

BERTRAND, P.; JONAS, A.; LASCHEWSKY, A.; LEGRAS, R. Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. **Macromolecular Rapid Communication**, v.21, n.7, p.319-348, 2000.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P.O.; FIANDACA, M.J.; PEDERSEN, J.; HANSEN, C.R.; ANDERSEN, C.B.; PRESSIER, T.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric Pulmonology**, v.44, n.6, p.547-558, 2009.

BLONDEL-HILL, E.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. Washington: ASM Press, 2007. v.1, p.734-748.

BRIDGETT, M.J.; DAVIES, M.C.; DENYER, S.P. Control of staphylococcal adhesion to polystyrene surfaces by polymer surface modification with surfactants. **Biomaterials**, v.13, n.7, p.411-416, 1992.

BURES, S.; FISHBAIN, J.T.; UYEHARA, C.F.T.; PARKER, J.M.; BERG, B.W. Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, v.28, n.6, p.465-471, 2000.

BUSSCHER, H.J.; STOKOOS, I.; SCHAKENRAAD, J.M. Two-dimensional spatial arrangement of fibronectin adsorbed to biomaterials with different wettabilities. **European Cells and Materials**, p.49-57, 1991.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. **Journal of Lipid Research**, v.40, n.8, p.1495-1500, 1999.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Candida albicans*. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.105, n.34, p.8230-8236, 2001.

CARMELI, Y. Strategies for managing today's infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, suppl.3, p.22-31, 2008.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.733, n.1, p.172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CASTUMA, C.E.; SESSO, A.; SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecyl phosphate dispersions. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, n.13, p.5361-5366, 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. **Chemical Society Reviews**, v.21, p. 209-214, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; ORTIS, F.; SCHUMACHER, R.I.; ARMELIN, M.C.S. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. **Langmuir**, v.13, n.8, p.2215-2218, 1997.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer-forming synthetic lipids: Drugs or carriers? **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.22, p.2425-2446, 2003.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; VIEIRA, D.B.; LINCOPAN, N. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, n.1, p.33-54, 2006.

CARO, A.; HUMBLLOT, V.; MÉTHIVIER, C.; MINIER, M.; SALMAIN, M.; PRADIER, C. Grafting of lysozyme and/or poly (ethylene glycol) to prevent biofilm growth on stainless steel surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.7, p.2101-2109, 2009.

CEN, L.; NEOH, K.G.; KANG, E.T. Surface functionalization technique for conferring antibacterial properties to polymeric and cellulosic surfaces. **Langmuir**, v.19, n.24, p.10295-10303, 2003.

CHAPIN, K.C.; LAUDERDALE, T. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. Washington: ASM Press, 2007. v.1, p.334-364.

CHEN, C.Z.S.; COOPER, S.L. Recent advances in antimicrobial dendrimers. **Advanced Materials**, v.12, n.11, p.843-846, 2000.

CHEN, C.Z.S.; COOPER, S.L. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. **Biomaterials**, v.23, n.16, p.3359-3368, 2002.

CHENG, G.; ZHANG, Z.; CHEN, S.F.; BRYERS, J.D.; JIANG, S.Y. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v.28, n.29, p.4192-4199, 2007.

CIRAGIL, P.; GUL, M.; ARAL, M. Bacterial contamination of computers and telephones in a university hospital in Turkey. **The Journal of Hospital Infection**, v.62, n.2, p.247-248, 2006.

COHEN, H.A.; AMIR, J.; MATALON, A.; MAYAN, R.; BENI, S.; BARZILAI, A. Stethoscopes and otoscopes - a potential vector of infection? **Family Practice**, v.14, n.6, p.446-449, 1997.

COHEN-STUART, M.A.; FLEER, G.J.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHEUTJENS, J.M.H.M. Adsorption of ions, polyelectrolytes and proteins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.34, p.477-535, 1991.

COHEN-STUART, M.A. Adsorbed polymers in colloidal systems. From statics to dynamics. **Polymer Journal**, v.23, n.5, p.669-682, 1991.

COHEN-STUART, M.A.; FLEER, G.J. Adsorbed polymer layers in nonequilibrium situations. **Annual Reviews of Materials Science**, v.26, n.1, p.463-500, 1996.

COMPÈRE, C.; BELLON-FONTAINE, M.-N.; BERTRAND, P.; COSTA, D.; MARCUS, P.; POLEUNIS, C.; PRADIER, C.-M.; RONDOT, B.; WALLS, M.G. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. **Biofouling**, v.17, n.2, p.129-145, 2001.

COREY, G.R.; LALANI, T. Risk of intravascular cardiac device infections in patients with bacteraemia: impact on device removal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, suppl.1, p.S26-S29, 2008.

CORMIO, L.; VUOPIO-VARKILA, J.; SIITONEN, A.; TALJA, M.; RUUTU, M. Bacterial adhesion and biofilm formation on various double-j stents in vivo and in vitro. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v.30, n.1, p.19-24, 1996.

CORREIA, F.M.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Colloid stability of lipid/polyelectrolyte decorated latex. **Langmuir**, v.20, n.22, p.9535-9540, 2004.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.435-464, 1987.

COSTERTON, W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF, M.; PASMORE, M.; POST, C.; EHRLICH, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.10, p.1466-1477, 2003.

CUTTER, C.N.; WILLETT, J.L.; SIRAGUSA, G.R. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, n.4, p.325-328, 2001.

DAVIES, A.; FIELD, B.S. Action of biguanides, phenols and detergents on *Escherichia coli* and its spheroplasts. **Journal of Applied Bacteriology**, v.32, n.2, p.233-238, 1969.

DECHER, G.; HONG, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. **Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie**, v.95, n.11, p.1430-1434, 1991.

DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v.210-211, part.2, p.831-835, 1992.

DESAI, N.P.; HOSSAINY, S.F.; HUBBELL, J.A. Surface-immobilized polyethylene oxide for bacterial repellence. **Biomaterials**, v.13, n.7, p.417-420, 1992.

DHANABALAN, A.; MATTOSO, L.H.C.; OLIVEIRA Jr, O.N. Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films of conducting polymers. **Current Trends in Polymer Science**, v.5, p.19-39, 2000.

DIETZE, B.; RATH, A.; WENDT, C.; MARTINY, H. Survival of MRSA on sterile goods packaging. **The Journal of Hospital Infection**, v.49, n.4, p.255-261, 2001.

DOMAGK, G. Eine neue klasse von desinfektionsmitteln. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v.61, p.829-832, 1935.

DURAN, L.W. Preventing medical device related infections. **Medical Device Technology**, v.11, n.6, p.14-17, 2000.

DVORACEK, C.M.; SUKHONOSOVA, G.; BENEDIK, M.J.; GRUNLAN, J.C. Antimicrobial behavior of polyelectrolyte-surfactant thin film assemblies. **Langmuir**, v.25, n.17, p.10322-10328, 2009.

FALCONE, M.; BARZAGHI, N.; CAROSI, G.; GROSSI, P.; MINOLI, L.; RAVASIO, V.; RIZZI, M.; SUTER, F.; UTILI, R.; VISCOLI, C.; VENDITTI, M. *Candida* infective endocarditis: report of 15 cases from a prospective multicenter study. **Medicine**, v.88, n.3, p.160-168, 2009.

FEDTKE, I.; GOTZ, F.; PESCHEL, A. Bacterial evasion of innate host defenses - the *Staphylococcus aureus* lesson. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, n.2-3, p.189-194, 2004.

FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.A.V.; RIBEIRO-FILHO, N. In: **Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.1797.

FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.59, n.3, p.227-238, 2010.

GRABOWSKI, E.; MORRISON, I. Particle size distribution from analysis of quasi-elastic light scattering data. In: **Measurements of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering**; Ed. Dahneke B, Wiley-Interscience: New York, 1983, p.199-236.

GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.12, p.527-537, 1995.

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v.295, n.13, p.704-710, 1976. a.

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v.295, n.14, p.765-770, 1976. b.

HABASH, M.; REID, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.39, n.9, p.887-898, 1999.

HANUS, L.H.; PLOEHN, H.J. Conversion of intensity-averaged photon correlation spectroscopy measurements to number-averaged particle size distributions. 1. Theoretical development. **Langmuir**, v.15, n.9, p.3091-3100, 1999.

HETRICK, E.M.; SCHOENFISCH, M.H. Reducing implant-related infections: Active release strategies. **Chemical Society Reviews**, v.35, n.9, p.780-789, 2006.

HIEMENZ, P.C. Surface tension and contact angle: Application to pure substances. In: **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 2.ed., Marcel Dekker: New York, 1986. p.287-352.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.4, p.322-332, 2010.

HOSONO, E.; FUJIHARA, S.; HONMA, I.; ZHOU, H. Superhydrophobic perpendicular nanopin film by the bottom-up process. **Journal of the American Chemical Society**, v.127, n.39, p.13458-13459, 2005.

HOU, S.; BURTON, E.A.; SIMON, K.A.; BLODGETT, D.; LUK, Y.Y.; REN, D. Inhibition of *Escherichia coli* biofilm formation by self-assembled monolayers of functional alkanethiols on gold. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.13, p.4300-4307, 2007.

IKEDA, T.; TAZUKE, S. Biologically active polycations: antimicrobial activities of poly[trialkyl(vinylbenzyl)ammonium chloride]-type polycations. **Makromolekulare Chemie, Rapid Communications**, v.4, p.459-461, 1983.

IRVIN, R.T. Hydrophobicity of proteins and bacterial fimbriae. In: DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. **Microbial Cell Surface Hydrophobicity**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1990. p.137-177.

ISRAELACHVILI, J.N.; GEE, M.L. Contact angles on chemically heterogeneous surfaces. **Langmuir**, v.5, n.1, p.288-289, 1989.

ITO, S.; AOKI, H. Nano-imaging of polymers by optical microscopy. **Advances in Polymer Science**, v.182, p.131-169, 2005.

JAMPALA, S.N.; SARMADI, M.; SOMERS, E.B.; WONG, A.C.L.; DENES, F.S. Plasma-enhanced synthesis of bactericidal quaternary ammonium thin layers on stainless steel and cellulose surfaces. **Langmuir**, v.24, n.16, p.8583-8591, 2008.

JUST, E.K.; MAJEWICZ, T.G. Cellulose ethers. In: **Encyclopedia of polymer science and engineering**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1985. v.3, p.226-269.

KÄLICKE, T.; SCHIERHOLZ, J.; SCHLEGEL, U.; FRANGEN, T.M.; KÖLLER, M.; PRINTZEN, G.; SEYBOLD, D.; KLÖCKNER, S.; MUHR, G.; ARENS, S. Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis Implants: An in vitro and in vivo study. **Journal of Orthopaedic Research**, v.24, n.8, p.1622-1640, 2006.

KANAZAWA, A.; IKEDA, T.; ENDO, T. A novel-approach to mode of action of cationic biocides - morphological effect on antibacterial activity. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.1, p.55-60, 1995.

KASEMO, B. Biological surface science. **Surface Science**, v.500, n.1-3, p.656-677, 2002.

KATZ, D.; KRAAIJEVELD, C.A.; SNIPPE, H. Synthetic lipid compound as antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killed-virus vaccines. In: STEWART-TULL, D.E.S. **The Theory and Practical Application of Adjuvants**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p.37-50.

KAYITMAZER, A.B.; STRAND, S.P.; TRIBET, C.; JAEGER, W.; DUBIN, P.L. Effect of polyelectrolyte structure on protein – Polyelectrolyte coacervates: Coacervates of bovine serum albumine with poly(diallyldimethylammonium chloride) versus chitosan. **Biomacromolecules**, v.8, n.11, p.3568-3577, 2007.

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; RICHARDS, C.L.Jr.; HORAN, T.C.; GAYNES, R.P.; POLLOCK, D.A.; CARDÓ, D.M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Reports**, v.122, n.2, p.160-166, 2007.

KLIBANOV, A.M. Permanently microbicidal materials coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v.17, n.24, p.2479-2482, 2007.

KLOTZ, S.A. Role of hydrophobic interactions in microbial adhesion to plastics used in medical devices. In: DOYLE, R.J.; ROSENBERG, M. **Microbial Cell Surface Hydrophobicity**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1990. p.107-136.

KOHNEN, W.; JANSEN, B. Polymer materials for the prevention of catheter-related infections. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.283, n.2, p.175-186, 1995.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER Jr, R.J. Human oral bacterial biofilms. In: GHANNOUM, M.A.; O'TOOLE, G.A. **Microbial biofilms**. Washington, D.C: ASM Press, 2004. p.85-117.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. Bacilos Gram-negativos não fermentadores. In: **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001. p.263-329.a

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. Cocos Gram-positivos: parte I: Estafilococos e microrganismos relacionados. In: **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001. p.551-588.b

KUGLER, R.; BOULOSSA, O.; RONDELEZ, F. Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. **Microbiology**, v.151, n.5, p.1341-1348, 2005.

KUEHNER, M; TAMPE, R; SACKMANN, E. Lipid mono- and bilayer supported on polymer films: composite polymer lipid films on solid substrates. **Biophysical Journal**, v.67, n.1, p.217-226, 1994.

LANSDOWN, A.B.G. Silver in healthcare: an enigma and pathological fascination. **Bulletin of the Royal College of Pathologists**, v.133, p.36-38, 2006.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, v.11, p.179-184, 2003.

LESSA, M.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer wetting on polymer surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.182, n.1, p.166-171, 1996.

LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.322, p.107-131, 2008.

LIN, J.; QIU, S.; LEWIS, K.; KLIBANOV, A.M. Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines. **Biotechnology Progress**, v.18, n.5, p.1082-1086, 2002.

LINCOPAN, N.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Lipid-covered drug particles: combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.1, p.66-75, 2006.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.369-381.

LU, L.; RININSLAND, F.H.; WITTENBURG, S.K.; ACHYUTHAN, K.E.; MCBRANCH, D.W.; WHITTEN, D.G. Biocidal activity of a light-absorbing fluorescent conjugated polyelectrolyte. **Langmuir**, v.21, n.22, p.10154-10159, 2005.

LU, J.; WANG, X.; XIAO, C. Preparation and characterization of konjac glucomannan/poly(diallyldimethylammonium chloride) antibacterial blend films. **Carbohydrate Polymers**, v.73, n.3, p.427-437, 2008.

LVOV, Y.; DECHER, G.; MOHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). **Langmuir**, v.9, n.2, p.481-486, 1993.

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

MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic liposomes as antimicrobial agents, In: **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, Ed.A. Méndez-Vilas, 2008.

MANUAL DE INSTRUÇÕES DO POTENCIAL-ZETA ANALYZER. Brookhaven Instruments Corporation, 750, Blue Point Road, Holtsville, NY 11742.

MARINI, M.; BONDI, M.; ISEPPI, R.; TOSELLI, M.; PILATI, F. Preparation and antibacterial activity of hybrid materials containing quaternary ammonium salts via sol-gel process. **European Polymer Journal**, v.43, n.8, p.3621-3628, 2007.

MARTINS, L.M.S.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic vesicles as bactericides. **Langmuir**, v.13, n.21, p.5583-5587, 1997.

MELO, L.D.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. **Langmuir**, v.26, n.14, p.12300-12306, 2010.

MERIANOS, J.J. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p.225-255.

MEYERHOFER, D. Characteristics of resist films produced by spinning. **Journal of Applied Physics**, v.49, n.7, p.3993-3997, 1978.

MIRELES, J.R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.20, p.5848-5854, 2001.

MORGAN, J.D.; NAPPER, D.H.; WARR, G.G. Thermodynamics of ion exchange selectivity at interfaces. **Journal of Physical Chemistry**, v.99, n.23, p.9458-9465, 1995.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMIREZ, J.T.; YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v.16, n.10, p.2346-2353, 2005.

MORTON-JONES, D.H. Mixing. In: **Polymer processing**. London: Chapman & Hall Ltd., 1989. p.55-73.

NEELY, A.N.; MALEY, M.P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.2, p.724-726, 2000.

NOHR, R.S.; MACDONALD, G.J. New biomaterials through surface segregation phenomenon: new quaternary ammonium compounds as antibacterial agents. **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v.5, n.6, p.607-619, 1994.

O'BRIEN, R.W.; WHITE, L.R. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v.74, p.1607-1626, 1978.

OIE, S.; HOSOKAWA, I.; KAMIYA, A. Contamination of room door handles by methicillin-sensitive/methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Hospital Infection**, v.51, n.2, p.140-143, 2002.

OKADA, A.; NIKAIIDO, T.; IKEDA, M.; OKADA, K.; YAMAUCHI, J.; FOXTON, R.M.; SAWADA, H.; TAGAMI, J.; MATIN, K. Inhibition of biofilm formation using newly developed coating materials with self-cleaning properties. **Dental Materials Journal**, v.27, n.4, p.565-572, 2008.

OSTUNI, E.; CHAPMAN, R.G.; LIANG, M.N.; MELULENI, G.; PIER, G.; INGBER, D.E.; WHITESIDES, G.M. Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells. **Langmuir**, v.17, n.20, p.6336-6343, 2001.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – The ‘accidental’ pathogen. **Nature Reviews: Microbiology**, v.7, n.8, p.555-567, 2009.

PACHECO, L.F.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.258, n.1, p.146-154, 2003.

PACHECO, L.F.; VIEIRA, D.B.; CORREIA, F.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic bilayers and *Candida albicans* cells. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v.128, p.175-177, 2004.

PAGE, K.; WILSON, M.; PARKIN, I.P. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. **Journal of Materials Chemistry**, v.19, n.23, p.3819-3831, 2009.

PAL, S.; TAK, Y.K.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.6, p.1712-1720, 2007.

PANÁČEK, A.; KVÍTEK, L.; PRUCEK, R.; KOLÁR, M.; VECEROVÁ, R.; PIZÚROVÁ, N.; SHARMA, V.K.; NEVECNÁ, T.; ZBORIL, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n.33, p.16248-16253, 2006.

PARK, K.D.; KIM, Y.S.; HAN, D.K.; KIM, Y.H.; LEE, E.H.B.; SUH, H.; CHOI, K.S. Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. **Biomaterials**, v.19, n.7-9, p.851-859, 1998.

PARKIN, I.P.; PALGRAVE, R.G. Self-cleaning coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v.15, n.17, p.1689-1695, 2005.

PECORA, R. Dynamic light scattering measurements of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v.2, p.123-131, 2000.

PEREIRA, E.M.A.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Assemblies of cationic lipids on polymeric films. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v.374, p.617-622, 2002.

PEREIRA, E.M.A.; VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic bilayers on polymeric particles: effect of low NaCl concentration on surface coverage. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.108, n.31, p.11490-11495, 2004.

PEREIRA, E.M.A.; KOSAKA, P.M.; ROSA, H.; VIEIRA, D.B.; KAWANO, Y.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Hybrid materials from intermolecular associations between cationic lipids and polymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.112, n.31, p.9301-9310, 2008.

PETERMMAN, L.B.; BAROUX, B.; FONTAINE, M.N.B. The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. In: MITTAL, K.L. **Contact angle, Wettability and Adhesion**, Utrecht: VSP, 1993. p.839-848.

PETRI, D.F.S. Characterization of spin-coated polymer films. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, p.695-699, 2002.

PETROCCI, A.N.; CLARKE, P.; MERIANOS, J.; GREEN, H. Quaternary ammonium antimicrobial compounds: old and new. **Developments in Industrial Microbiology**, v.20, p.11-14, 1979.

PRADIER, C.M.; COSTA, D.; RUBIO, C.; COMPÈRE, C.; MARCUS, P. Role of salts on BSA adsorption on stainless steel in aqueous solution. I. FT-IRRAS and XPS characterization. **Surface and Interface Analysis**, v.34, n.1, p.50-54, 2002.

REID, G.; DENSTEDT, J.D.; KANG, Y.S.; LAM, D.; NAUSE, C. Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo. **Journal of Urology**, v.148, n.5, p.1592-1594, 1992.

REID, G.; LAM, D.; POLICOVA, Z.; NEUMANN, A.W. Adhesion of two uropathogens to silicone and lubricious catheters: influence of pH, urea and creatinine. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.4, n.1, p.17-22, 1993.

REID, G.; DAVIDSON, R.; DENSTEDT, J.D. XPS, SEM and EDX analysis of conditioning film deposition onto ureteral stents. **Surface and Interface Analysis**, v.21, n.8, p.581-586, 1994.

REID, G.; TIESZER, C.; BAILEY, R.R. Bacterial biofilms on devices used in nephrology. **Nephrology**, v.1, p.269-275, 1995.

REIS, E.A.O.; CARASCHI, J.C.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; PETRI, D.F.S. Polyelectrolytes at charged particles: particle number density, molecular weight, and charge ratio effects. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.107, n.32, p.7993-7997, 2003.

ROBERTS, J.A.; KAACK, M.B.; FUSSELL, E.N. Adherence to urethral catheters by bacteria causing nosocomial infections. **Urology**, v.41, n.4, p.338-342, 1993.

RUSSELL, A.D.; CHOPRA, I. **Understanding antibacterial action and resistance**. Ellis Horwood: Chichester, p.2-5, 1996.

RUSSELL, A.D.; HUGO, W.B.; AYLIFFE, G.A.J. In: **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. Blackwell Science: Oxford, 1999.

SALAY, L.C.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic bilayer wetting on SiO₂ surfaces. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.20, p.4011-4015, 1998.

SALAY, L.C.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Wetting of SiO₂ surfaces by phospholipid dispersions. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.13, n.10, p.1165-1179, 1999.

SALT, W.G.; WISEMAN, D. Relation between uptake of cetyltrimethylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.22, n.4, p.261-264, 1970.

SCHALES, O.; SCHALES, S.S. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**, v.140, p.879-884, 1941.

SCHUBERT, D.W. Spin coating as a method for polymer molecular weight determination. **Polymer Bulletin**, v.38, n.2, p.177-184, 1997.

SHAW, D.J. Liquid-gas and liquid-liquid interfaces. In: **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 3.ed. Editora Edgard Blücher Ltd.: Essex, 1980. p.60-107.a

SHAW, D.J. The solid-liquid interface. In: **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 3.ed. Editora Edgard Blücher Ltd.: Essex, 1980. p.127-147.b

SHEARER, A.E.H.; PAIK, J.S.; HOOVER, D.G.; HAYNIE, S.L.; KELLEY, M.J. Potential of an antibacterial ultraviolet-irradiated nylon film. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.2, p.141-146, 2000.

SICCHIEROLLI, S.M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bacteria flocculation and death by cationic vesicles. **Langmuir**, v.11, n.8, p.2991-2995, 1995.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, n.2-3, p.341-353, 2003.

SKVARIA, J. A physico-chemical model of microbial adhesion. **Journal of the Chemical Society: Faraday Transactions**, v.89, n.15, p.2913-2921, 1993.

SPEIER, J.L.; MALEK, J.R. Destruction of microorganisms by contact with solid surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.89, n.1, p.68-76, 1982.

STEVENS, K.N.J.; CRESPO-BIEL, O.; VAN DEN BOSCH, E.E.M.; DIAS, A.A.; KNETSCH, M.L.W.; ALDENHOFF, Y.B.J.; VAN DER VEEN, F.H.; MAESSEN, J.G.; STOBBERINGH, E.; KOOLE, L.H. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. **Biomaterials**, v.30, n.22, p.3682-3690, 2009.

STEWART, P.A.; HEARN, J.; WILKINSON, M.C. An overview of polymer latex film formation and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.86, n.3, p.195-267, 2000.

STOLL, S.; CHODANOWSKI, P. Polyelectrolyte adsorption on an oppositely charged spherical particle. Chain rigidity effects. **Macromolecules**, v.35, n.25, p.9556-9562, 2002.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4.ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995. p.1064.

SUPPAKUL, P.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W.; MILTZ, J. Efficacy of polyethylene-based antimicrobial films containing principal constituents of basil. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, p.779-788, 2008.

TAMILVANAN, S.; VENKATESHAN, N.; LUDWIG, A. The potential of lipid- and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on device-related nosocomial infections. **Journal of Controlled Release**, v.128, n.1, p.2-22, 2008.

TÁPIAS, G.N.; SICCHIEROLLI, S.M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Escherichia coli*. **Langmuir**, v.10, n.10, p.3461-3465, 1994.

TEIXEIRA, L.M.; SANTOS, K.R.N.; BUERÍS, V.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.175-182.

THOME, J.; HOLLANDER, A.; JAEGER, W.; TRICK, I.; OEHR, C. Ultrathin antibacterial polyammonium coatings on polymer surfaces. **Surface and Coatings Technology**, v.174-175, p.584-587, 2003.

TILLER, J.C.; LIAO, C.J.; LEWIS, K.; KLIBANOV, A.M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.11, p.5981-5985, 2001.

TIMOFEEVA, L.M.; KLESHCHEVA, N.A.; MOROZ, A.F.; DIDENKO, L.V. Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity. **Biomacromolecules**, v.10, n.11, p.2976-2986, 2009.

VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiological Reviews**, v.56, n.3, p.395-411, 1992.

VEENSTRA, G.J.C.; CREMERS, F.F.M.; VAN DIJK, H.; FLEER, A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.2, p.537-541, 1996.

VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.244, n.2, p.427-431, 2001.

VIEIRA, D.B.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Competitive adsorption of cationic bilayers and chitosan on látex: optimal biocidal action. **Langmuir**, v.19, n.3, p.924-932, 2003.

VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic lipids and surfactants as anti-fungal agents: mode of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.4, p.760-767, 2006.

VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic nanoparticles for delivery of amphotericin B: preparation, characterization and activity in vitro. **Journal of Nanobiotechnology**, v.6, n.6, 2008.

VIMALA, K.; SIVUDU, K.S.; MOHAN, Y.M.; SREEDHAR, B.; RAJU, K.M. Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates: A rational methodology for antibacterial application. **Carbohydrate Polymers**, v.75, n.3, p.463-471, 2009.

WANDREY, C.; HERNÁNDEZ-BARAJAS, J.; HUNKELER, D. Diallyldimethylammonium chloride and its polymers. **Advances in Polymer Science**, v.145, p.123-182, 1999.

WHITCHURCH, C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C.; MATTICK, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v.295, n.5559, p.1487, 2002.

WILCOX, M.; KITE, P.; DOBBINS, B. Antimicrobial intravascular catheters – Which surface to coat? **The Journal of Hospital Infection**, v.38, n.4, p.322-324, 1998.

WINGENDER, J.; STRATHMANN, M.; RODE, A.; LEIS, A.; FLEMMING, H.-C. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods in Enzymology**, v.336, p.302-314, 2001.

APÊNDICES

- Apêndice 1.** Esboço do relatório descritivo de pedido de patente protocolado junto ao INPI (Patente: PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MATERIAL ANTIBACTERIANO CONTENDO AS MESMAS, com N° de Protocolo no INPI/SP: 018100024951).
- Apêndice 2.** Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. MELO, L.D.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. *Langmuir*, v.26, n.14, p.12300-12306, 2010.
- Apêndice 3.** Resumo selecionado para apresentação oral junto à “*International Conference on Antimicrobial Research*” (3-5 Novembro, 2010, Valladolid, Espanha). Antimicrobial films from quaternary ammonium compounds and poly(methylmethacrylate).
- Apêndice 4.** Notificação de aceite do capítulo “*Antimicrobial Biomimetics*” do Livro “*Advances in Biomimetics*”.
- Apêndice 5.** Resumo do capítulo “*Antimicrobial Biomimetics*” do livro “*Advances in Biomimetics*” aceito para publicação.

ANEXOS

- Anexo 1.** Currículo Lattes
- Anexo 2.** Ficha do aluno - USP

Apêndice 1. Esboço do relatório descritivo de pedido de patente protocolado junto ao INPI (Patente: PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MATERIAL ANTIBACTERIANO CONTENDO AS MESMAS, com N^o de Protocolo no INPI/SP: 018100024951).

PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS HÍBRIDAS ANTIBACTERIANAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO E MATERIAL ANTIBACTERIANO CONTENDO AS MESMAS

Inventores: Ana Maria Carmona-Ribeiro; Elsa Masae Mamizuka; Letícia Dias de Melo

A presente invenção trata de partículas com propriedades antimicrobianas, apresentando um composto anfifílico ou lipídico com grupamento amônio quaternário e dois polieletrólitos, sendo um aniônico e um catiônico, este último também contendo grupamento amônio quaternário. A concentração do composto de caráter anfifílico variou de 0,01 a 1,0 mM, sendo preferencialmente, 0,1 ou 0,5 mM. A concentração do polieletrólito aniônico variou de 0,01 a 1,0 mg/mL, sendo preferencialmente 0,1 e 0,5 mg/mL. A concentração do polieletrólito catiônico variou de 0,05 a 5,0 mg/mL, sendo preferencialmente 0,1 e 0,5 mg/mL. Todos os compostos foram preparados em solução aquosa de D-glicose 0,264M, sem adição de qualquer eletrólito, para se evitar precipitações.

Segundo a invenção, o material aqui descrito apresenta composto anfifílico com grupamento amônio quaternário, disperso em forma de fragmentos de bicamada, envolvidos por polieletrólito aniônico e, então, revestidos por polieletrólito com grupamentos catiônicos de amônio quaternário, agindo como potentes partículas antimicrobianas. Em uma forma particular da invenção, as partículas antimicrobianas são formadas por fragmentos de bicamada do lípide catiônico DODAB (DODAB BF) revestidos consecutivamente por CMC e PDDA. A sugestão do mecanismo de ação destes particulados seria que o primeiro ataque ao microrganismo poderia ocorrer pelo polieletrólito catiônico na camada externa da partícula. Então, a camada inerte de carboximetilcelulose seria repelida devido à sua propriedade aniônica, e o fragmento de DODAB seria exposto, podendo assim também entrar em contato com o microrganismo e exercer sua ação microbica.

O processo de obtenção do material aqui descrito também é objeto da presente invenção. Tal processo apresenta as seguintes etapas:

- a. Obtenção dos fragmentos de bicamada do lípide catiônico por sonicação com sonda em solução de baixa força iônica (0,01-0,1 mM de sal monovalente).
- b. Adição de polieletrólito aniônico para interação com material obtido no item anterior por 0,1-24 h, preferencialmente 20 minutos.
- c. Adição de polieletrólito catiônico para interação com material obtido no item anterior por 0,1-24 h, preferencialmente 20 minutos.

A invenção contempla partículas antimicrobianas, obtidas desta forma, porém com dois diferentes tamanhos e densidades de carga positiva, de acordo com as concentrações dos compostos constituintes das partículas. As partículas com as menores concentrações de cada componente (concentrações de DODAB BF/CMC/PDDA respectivamente de 0,1 mM / 0,1 mg/mL / 0,1 mg/mL) apresentaram

diâmetro médio de 108 ± 1 nm e potencial-zeta de 30 ± 1 mV. Já as partículas compostas de DODAB BF 0,5 mM, CMC 0,5 mg/mL e PDDA 0,5 mg/mL apresentaram diâmetro médio de 470 ± 5 nm e potencial-zeta de 52 ± 1 .

O material antimicrobiano anteriormente descrito apresenta aplicações farmacêuticas, cosméticas, veterinárias, biotecnológicas, químicas, biomédicas ou preservativas. As partículas antimicrobianas podem adsorver ou serem incorporadas a dispositivos médico-hospitalares, tintas, filtros de ar condicionado ou tubos de ventilação, ou ainda o particulado antimicrobiano poderá ser usado para fabricar filmes finos, com aplicações em fabricação de luvas, em embalagens para alimentos e produtos laboratoriais, em laminados para revestimento de bancadas, em revestimentos para proteção de produtos cosméticos e odontológicos, em aplicações higiênicas e ambientais. Podem ainda carrear diferentes drogas tanto por interação eletrostática quanto por efeito hidrofóbico uma vez que os fragmentos de bicamada catiônica possuem sítios propícios à interação com drogas.

Apêndice 2.

Antimicrobial particles from cationic lipid and polyelectrolytes. MELO, L.D.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. *Langmuir*, v.26, n.14, p.12300-12306, 2010.

Langmuir

Article

pubs.acs.org/Langmuir

© 2010 American Chemical Society

Antimicrobial Particles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes

Letícia D. Melo, Elsa M. Mamizuka, and Ana M. Carmona-Ribeiro*

Biocolloids Lab, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, CEP 05513-970, São Paulo SP, Brazil

Received April 15, 2010. Revised Manuscript Received June 8, 2010

Hybrid nanoparticles from cationic lipid and polymers were prepared and characterized regarding physical properties and antimicrobial activity. Carboxymethylcellulose (CMC) and polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA) were sequentially added to cationic bilayer fragments (BF) prepared from ultrasonic dispersion in water of the synthetic and cationic lipid dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB). Particles thus obtained were characterized by dynamic light-scattering for determination of z-average diameter (Dz) and zeta-potential (ζ). Antimicrobial activity of the DODAB BF/CMC/PDDA particles against *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus* was determined by plating and CFU counting over a range of particle compositions. DODAB BF/CMC/PDDA particles exhibited sizes and zeta-potentials strictly dependent on DODAB, CMC, and PDDA concentrations. At 0.1 mM DODAB, 0.1 mg/mL CMC, and 0.1 mg/mL PDDA, small cationic particles with Dz = 100 nm and ζ = 30 mV were obtained. At 0.5 mM DODAB, 0.5 mg/mL CMC and 0.5 mg/mL PDDA, large cationic particles with Dz = 470 nm and ζ = 50 mV were obtained. Both particulates were highly reproducible regarding physical properties and yielded 0% of *P. aeruginosa* viability (10^7 CFU/mL) at 1 or 2 μ g/mL PDDA dissolved in solution or in form of particles, respectively. 99% of *S. aureus* cells died at 10 μ g/mL PDDA alone or in small or large DODAB BF/CMC/PDDA particles. The antimicrobial effect was dependent on the amount of positive charge on particles and independent of particle size. A high microbicide potency for PDDA over a range of nanomolar concentrations was disclosed. *P. aeruginosa* was more sensitive to all cationic assemblies than *S. aureus*.

Introduction

Antimicrobial particles based on silver,^{1,2} biodegradable polymers such as poly(lactide-co-glycolide),^{3–5} metal oxide,⁶ or zeolites⁷ have been finding many applications in the industry of fabrics,⁸ plastic,^{2,7} or biomaterials for drug delivery.^{3–5}

On the other hand, molecules with a net positive charge are able to kill microorganisms both in solution^{9,10} or upon attachment or

adsorption to surfaces,^{11–16} particles,^{17,18} liposomes,^{19–21} or bilayers.^{22,23} Various cationic architectures have been tested such as polyelectrolyte layers^{14,15,17} and hyperbranched dendrimers.^{24,25}

Since 1935, the antibacterial activity of the long-chained quaternary ammonium salts has been known.²⁶ The fourth generation of quaternary antimicrobials included several mono- and dialkyl dimethylammonium and polymeric quaternary ammonium salts such as the ionenes, which are polyelectrolytes with positively charged nitrogen atoms located in the backbone of the polymeric chain.²⁷ The antimicrobial, antifungal, and tumoricidal properties of ionenes indicated that the polymers are more active than the corresponding monomers due to favored polymer adsorption onto the bacterial cell surface and the cytoplasmic membrane eventually leading to subsequent disruption of its integrity.²⁸ Besides the quaternary polyionenes, other classes of synthetic antimicrobial polymers with pendant quaternary nitrogen away from the backbone chain of the polymer have been reported. For example, the polyelectrolyte poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) bears permanently charged quaternary ammonium groups in its cyclic unities. PDDA has been

*Corresponding author. Phone: (+55 11) 3091-2164. Fax: (+55 11) 3815-5579. E-mail: amcr@usp.br.

(1) Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.

(2) Roe, D.; Karandikar, B.; Bonn-Savage, N.; Gibbins, B.; Roulet, J. B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*(4), 869–876.

(3) Haerdi-landerer, M. C.; Suter, M. M.; Steiner, A.; Wittenbrink, M. M.; Pickl, A.; Gander, B. A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*(2), 332–340.

(4) Sharma, A.; Sharma, S.; Khuller, G. K. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*(4), 761–766.

(5) Pandey, R.; Khuller, G. K. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*(1), 266–268.

(6) Sadiq, I. M.; Chowdury, B.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. *Nano-medicine* **2009**, *5*(3), 282–286.

(7) Xu, X.; Ding, H.; Wang, B. *Adv. Mater. Res.* **2010**, *96*, 151–154.

(8) Gorenek, M.; Gorjanc, M.; Bukosek, V.; Kovac, J.; Jovancic, P.; Mihailovic, D. *Textile Res. J.* **2010**, *80*(3), 253–262.

(9) Fidai, S.; Farer, S. W.; Hancock, R. E. W. *Methods Mol. Biol.* **1997**, *78*, 187–204.

(10) Friedrich, C. L.; Moyle, D.; Beverige, T. J.; Hancock, R. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*(8), 2086–2092.

(11) Isquith, A. J.; Abbott, E. A.; Walters, P. A. *Appl. Microbiol.* **1972**, *24*(6), 859–863.

(12) Endo, Y.; Tani, T.; Kodama, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*(9), 2050–2055.

(13) Kugler, R.; Bouloussa, O.; Rondelez, F. *Microbiology* **2005**, *151*, 1341–1348.

(14) Tiller, J. C.; Liao, C.; Lewis, K.; Klivanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*(11), 5981–5985.

(15) Thome, J.; Holländer, A.; Jaeger, W.; Trick, I.; Oehr, C. *Surf. Coat. Technol.* **2003**, *174–175*, 584–587.

(16) Pereira, E. M. A.; Kosaka, P. M.; Rosa, H.; Vieira, D. B.; Kawano, W.; Petri, D. F. S.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*(31), 9301–9310.

(17) Vieira, D. B.; Lincopan, N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **2003**, *19*(3), 924–932.

(18) Vieira, D. B.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Nanobiotechnol.* **2008**, *6*, 6.

(19) Tapias, G. N.; Sicchierolli, S. M.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1994**, *10*(10), 3461–3465.

(20) Sicchierolli, S. M.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1995**, *11*(8), 2991–2995.

(21) Campanha, M. T. N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*(34), 8230–8236.

(22) Lincopan, N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*(3), 412–418.

(23) Lincopan, N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*(5), 727–734.

(24) Chen, C. Z. S.; Cooper, S. L. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 843–846.

(25) Chen, C. Z. S.; Cooper, S. L. *Biomaterials* **2002**, *23*(16), 3359–3368.

(26) Domagk, G. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1935**, *61*, 829–832.

(27) Petrocchi, A. N.; Clarke, P.; Merianos, J.; Green, H. *Dev. Ind. Microbiol.* **1979**, *20*, 11–14.

(28) Ikeda, T.; Tazuke, S. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1983**, *4*, 459–461.

Table 1. Chemical Structure of Cationic Lipid and Polyelectrolytes and Schemes of Their Assemblies

Chemical structures or assemblies	Name and abbreviation
Diocetadecyldimethylammonium bromide (DODAB)
DODAB bilayer fragments (BF)
Carboxymethyl cellulose (CMC)
R = H or CH ₂ CO ₂ H
Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDAA)
Anionic particle: DODAB BF / CMC
Cationic particle: DODAB BF/ CMC/ PDAA

considered safe for human health and is widely used in paper manufacturing, water treatment and mining industries and biological, medical and food processing. PDAA antimicrobial activity has been incidentally reported.^{18,29,30} Recently several cationic polymers similar to PDAA were synthesized with high antimicrobial activity.³¹

Cationic liposomes and other positively charged supramolecular assemblies have also been established as antimicrobial agents.^{18–21,32–36} In particular, diocetadecyldimethylammonium bromide (DODAB) is a cationic, bilayer-forming synthetic lipid with a high chemical stability and well-described anti-infective properties. Adsorption of DODAB bilayers onto bacterial cells changes the sign of the cell surface charge from negative to positive with a clear relationship between positive charge on

bacterial cells and cell death.^{34,37} Depending on DODAB dispersion method, large vesicles or bilayer fragments (BF) are obtained.³⁸ DODAB BF obtained by sonication with a macrotip presented antimicrobial activity in vitro, solubilized water insoluble drugs such as fungicides, stabilized hydrophobic drug particles, were the basis of an effective amphotericin B formulation in vivo against systemic candidiasis in mice and exhibited synergism while carrying miconazole against *C. albicans*.^{39–41} In this work, the layer-by-layer (LbL) procedure⁴² is employed to produce hybrid antimicrobial and cationic particles from DODAB BF supporting consecutive layers of anionic carboxymethylcellulose (CMC) and cationic PDAA. Thereby, cationic microbicides such as the DODAB lipid and the cationic polyelectrolyte are assembled in a single supramolecular structure. Assemblies were characterized regarding their physical and bactericidal properties by determining size distribution, zeta-potential and

(29) Wandrey, C.; Hernandez-Barajas, J.; Hunkeler, D. *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *145*, 123–182.

(30) Lu, J.; Wang, X.; Xiao, C. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 427–437.

(31) Timofeeva, L. M.; Kleshcheva, N. A.; Moroz, A. F.; Didenko, L. V. *Biomacromolecules* **2009**, *10*(11), 2976–2986.

(32) Carmona-Ribeiro, A. M. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2000**, *72*(1), 39–43.

(33) Martins, L. M. S.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *Langmuir* **1997**, *13*(21), 5583–5587.

(34) Campanha, M. T. N.; Mamizuka, E. M.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*(8), 1495–1500.

(35) Carmona-Ribeiro, A. M. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*(22), 2425–46.

(36) Carmona-Ribeiro, A. M.; Vieira, D. B.; Lincopan, N. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2006**, *5*(1), 33–54.

(37) Vieira, D. B.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*(4), 760–767.

(38) Carmona-Ribeiro, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*(3), 209–214.

(39) Pacheco, L. F.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*(1), 146–154.

(40) Vieira, D. B.; Pacheco, L. F.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *293*(1), 240–247.

(41) Lincopan, N.; Carmona-Ribeiro, A. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*(1), 66–75.

(42) Decher, G.; Hong, J. D. *Ber. Bunsen Ges.* **1991**, *95*, 1430–1434.

antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus* in vitro from plating and CFU counting.

Material and Methods

Chemicals. Dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) 99.9% pure was obtained from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). Carboxymethylcellulose sodium salt (CMC) with a nominal mean degree of substitution (DS) of 0.60–0.95 was purchased from Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) 20% w/v with 100 000–200 000 molecular weight was obtained from Sigma (Steinheim, Germany).

Preparation of DODAB Bilayer Fragments (BF) Dispersion. DODAB was dispersed in 0.264 M D-glucose solution using a titanium microtip probe.³⁸ The microtip probe was powered by ultrasound at a nominal output of 90 W (20 min, 70 °C) to disperse 32 mg of DODAB powder in 25 mL of isotonic 0.264 M D-glucose solution. The dispersion was centrifuged (60 min, 10000 g, 4 °C) in order to eliminate residual titanium ejected from the microtip. This procedure dispersed the amphiphile powder in aqueous solution using a high-energy input, which not only produced bilayer vesicles but also disrupted these vesicles, thereby generating open bilayer fragments (BF).^{38,43} Analytical concentration of DODAB was determined by halide microtitration⁴⁴ and adjusted to 2 mM.

Preparation and Characterization of Hybrid Particles. Stock solutions of CMC and PDDA were prepared at 2 and 20 mg/mL in isotonic D-glucose 0.264 mM aqueous solution, respectively. The pH of these unbuffered aqueous solutions was 6.3. The 0.264 M D-glucose solution is equivalent to a 0.15 M NaCl solution regarding osmolality and thus said isotonic. CMC stock solution was added to aliquots of the DODAB BF dispersion over a range of CMC concentrations and allowed to interact for 20 min before adding PDDA solution. After 20 min of interaction, samples were ready to be characterized regarding z-average diameters, zeta-potentials or antimicrobial activity. Dispersions of small particles were obtained from final DODAB, CMC and PDDA concentrations equal to 0.063, 0.100, and 0.100 mg/mL, respectively. Dispersions of large particles were obtained similarly but at DODAB, CMC, and PDDA final concentrations 5 times larger, i.e., 0.315, 0.500, and 0.500 mg/mL, respectively. Table 1 shows DODAB, CMC and PDDA chemical structures and presents schemes for DODAB BF, DODAB BF/CMC, or DODAB BF/CMC/PDDA assemblies. Cationic DODAB BF were first covered by the anionic polyelectrolyte (CMC) and then wrapped by the cationic polyelectrolyte (PDDA). Sizes and zeta-potentials were determined over a range of CMC or PDDA concentrations.

Table 2 presents composition of cationic hybrid particles selected for the determination of antimicrobial activity against *P. aeruginosa* or *S. aureus*. One should notice that DODAB concentration was given both in µg/mL and in mM.

Determination of z-Average Diameter and Zeta-Potential for Dispersions. Sizes and zeta-potentials were determined by means of a ZetaPlus Zeta-Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) equipped with a 570 nm laser and dynamic light scattering at 90° for particle sizing.⁴⁵ The z-average diameter referred to in this work from now on should be understood as the mean hydrodynamic diameter *D_z*. Zeta-potentials (ζ) were determined from the electrophoretic mobility μ and Smoluchowski's equation $\zeta = \mu\eta/\epsilon$, where η and ϵ are medium viscosity and dielectric constant, respectively. Stock solutions and particles were prepared in 0.264 M D-glucose

Table 2. Composition of Small and Large Hybrid Particles Obtained from DODAB BF, CMC, and PDDA by Means of the Layer-by-Layer (LbL) Technique

assembly	[DODAB], mg/mL	[DODAB], mM	[CMC], mg/mL	[PDDA], mg/mL
small particles	0.063	0.1	0.100	0.100
large particles	0.315	0.5	0.500	0.500

solution to preserve isotonicity between the internal and the external bacterial cell compartments.

Organisms and Culture Conditions. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (American Type Culture Collection) 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were reactivated, each one separately, for 2–5 h at 37 °C in 3 mL of Tryptic Soy Broth TSB (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Thereafter, bacteria were spread on plates of Mueller-Hinton Agar MHA (Hi-Media Laboratories Pvt, India) and incubated (37 °C, 24 h). Two or three isolated colonies of each species were taken from the plates and incubated in 10 mL of TSB (160 rpm, 37 °C, 2–3 h). Each culture was pelleted and separated from its nutritive medium by centrifugation (8000 rpm, 15 min.). The supernatant was replaced by a 0.264 M D-glucose solution before resuspending the bacteria pellet. The centrifugation/resuspension procedure was repeated twice before using the bacteria for evaluating the antimicrobial activity. Bacteria suspension turbidity (625 nm) was adjusted to 0.5 of the McFarland scale, yielding a final cell concentration of $\sim(2-5) \times 10^7$ CFU/mL.

Cell Viability Assays. Interaction between bacteria and dispersions proceeded for 1 or 24 h at room temperature. Thereafter, mixtures were diluted (1:20 000), 0.1 mL of the diluted mixture was spread on agar plates in triplicate, plates were incubated (24 h/37 °C), and CFU counting was performed. Cell viability (%) was presented as a mean value $\pm$ mean standard deviation. Since viability profiles did not change for 1 or 24 h the data to be shown in the next section will be limited to cell viabilities obtained after 1 h of interaction time.

Results and Discussion

Preparation and Characterization of DODAB BF/CMC/PDDA Assemblies. The effect of CMC concentration on sizes (*D_z*) and zeta-potentials of DODAB BF/CMC assemblies is in Figure 1. At two different DODAB concentrations (0.1 and 0.5 mM), *D_z* displayed a nonmonotonic behavior first increasing, reaching a maximum (where flocculation could be visualized), decreasing and then increasing again as a function of [CMC] (Figure 1A,C). The lowest colloid stability was observed when *D_z* was at maximum and the zeta-potential was zero, i.e., when assemblies did not bear any stabilizing net charge (Figure 1B, D). There were two regions of high colloid stability, low particle sizes and large absolute values for the zeta-potential: the first for assemblies positively charged and the second for assemblies negatively charged under conditions of charge overcompensation. However, over a range of high CMC concentrations, *D_z* further increased with [CMC] (Figure 1A,C). The most reasonable explanation for this latter increase would be bridging flocculation.⁴⁶ From the region of high colloid stability for the negatively charged DODAB BF/CMC assemblies, two CMC concentrations were selected: 0.1 (Figure 1A) and 0.5 mg/mL CMC (Figure 1C). These anionic assemblies further interacted with the cationic polyelectrolyte PDDA.

The effect of PDDA concentration on *D_z* and zeta-potentials of DODAB BF/CMC/PDDA assemblies is in Figure 2. The general behavior of sizes and zeta-potentials for DODAB BF/CMC/PDDA assemblies upon increasing [PDDA] was similar to

(43) Carmona-Ribeiro, A. M.; Chaimovich, H. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 733(1), 172–179.

(44) Schales, O.; Schales, S. S. *J. Biol. Chem.* 1941, 140, 879–884.

(45) Grabowski, E.; Morrison, I. In *Measurements of Suspended Particles by Quasi-elastic Light Scattering*; Dahneke, B. Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1983; pp 199–236.

(46) Cohen-Stuart, M. A. *Polym. J.* 1991, 23, 669–682.

Figure 1. Mean z-average diameter (D_z) and zeta-potential (ζ) of DODAB BF/CMC assemblies as a function of CMC concentration at 0.1 (A,B) and 0.5 mM DODAB (C,D).

Figure 2. Mean z-average diameter (D_z) and zeta-potential (ζ) of DODAB BF/CMC/PDDA assemblies as a function of PDDA concentration. DODAB final concentrations were 0.1 (A, B) or 0.5 mM (C, D). CMC final concentrations were 0.1 (A, B) or 0.5 mg/mL (C, D).

the one observed for DODAB BF/CMC assemblies (Figure 1). However, at zeta-potential equal to zero, the increase in D_z was mild and no flocculation was visualized in contrast to the extensive flocculation and increase in D_z that was shown in Figure 1 for the DODAB BF/CMC assembly at $\zeta = 0$. Over a range of high [PDDA], D_z increased suggesting pronounced bridging flocculation for DODAB BF/CMC/PDDA assemblies (Figure 2) in contrast to the mild bridging flocculation for DODAB BF/CMC (Figure 1).

Stiffness for polyelectrolyte chains can substantially vary between a fully flexible and a rigid rod-like polymer.⁴⁷ PDDA stiffness would cause a significant steric repulsion between DODAB BF/CMC/PDDA particles leading to absence of flocculation at $\zeta = 0$ mV and pronounced bridging flocculation over a range of high [PDDA] shown in Figure 2. Steric repulsion would be a powerful determinant of colloid stability around $\zeta = 0$ when

(47) Ulrich, S.; Seijo, M.; Stoll, S. *J. Phys. Chem. B* 2007, 111(29), 8459–8467.

Figure 3. Bacteria viability (%) as a function of final concentrations of PDDA and DODAB combined as small particles (□). Controls for DODAB BF only (○) or PDDA only (Δ) are also shown. Interaction time was 1 h. Final cell concentrations were $4\text{--}8 \times 10^7$ and $2\text{--}3 \times 10^7$ CFU/mL for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively.

electrostatic repulsion between particles is absent. The present results agree with the literature available for similar systems. For example, remarkable differences relative to coacervates obtained for bovine serum albumin (BSA) with poly (diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC) or chitosan were obtained.⁴⁸ Several factors, such as polymer rigidity, surface curvature, and strength of polymer–surface interactions, can determine the nature of the assembly.⁴⁹ An alternative explanation would be a higher binding constant for CMC/PDDA than for DODAB BF/CMC.

Coacervation with chitosan occurred more readily than with PDADMAC. Viscosities of coacervates obtained with chitosan were reported to be more than an order of magnitude larger and, unlike those with PDADMAC, showed temperature and shear rate dependence. For the coacervates with PDADMAC, small-angle neutron scattering data suggested solid-like domains that were not so interconnected as those with chitosan. These dense domains occupied a smaller volume fraction than those with chitosan and diminished protein diffusion. The differences in properties were thus correlated with differences in mesophase structure.⁴⁸ Similarly CMC adsorbed onto DODAB BF revealed differences in colloid stability when compared to DODAB BF/CMC/PDDA. Possibly, the CMC layer represented a much more hydrated outer coverage than the one provided by PDDA.

Light-absorbing fluorescent conjugated polyelectrolytes have been useful to visualize the interaction between cationic conjugated polyelectrolytes and bacteria.⁵⁰ The cationic polyelectrolytes have shown biocidal activity against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *E. coli*, BL21, with plasmids for Azurin and ampicillin resistance) and Gram-positive bacterial spores (*Bacillus anthracis*, *Sterne*). A surface coating of PE was visible from fluorescence microscopy on both types of bacteria.⁵⁰

Small and large DODAB BF/CMC/PDDA cationic assemblies to be tested against bacteria were selected at 0.1 (Figure 2A) and 0.5 mg/mL PDDA (Figure 2C). These particles were cationic with z-average diameters of 108 ± 1 (Figure 2A) and 473 ± 5 nm (Figure 2C) exhibiting zeta-potentials equal to 30 ± 1 (Figure 2B) or 52 ± 1 mV (Figure 2D), respectively. They were named after their sizes as small and large particles, respectively. The final composition of small and large particles was given in Table 2.

Antimicrobial Activity of DODAB BF/CMC/PDDA Small and Large Particles. Cell viability as a function of [PDDA] only, [DODAB] only or [PDDA] and [DODAB] combined as small (Figure 3) or large particles (Figure 4) revealed the potent effects of all cationic compounds or assemblies as bactericides against two bacteria species, *P. aeruginosa* and *S. aureus* (Figures 3 and 4).

Doses of DODAB, PDDA or DODAB/PDDA in particles required for killing 99% and 50% of bacterial cells after 1 h interaction time are summarized in Table 3. DODAB BF and PDDA doses required to kill 99% of *P. aeruginosa* and *S. aureus* cells (Table 3) can be considered as minimal bactericidal concentrations (MBC) determined, however, under the special conditions for the cell surrounding medium required by the cationic bactericides to be effective, namely, absence of the cell culture medium and very low ionic strength in order to avoid screening of the electric double layer of the cationic bactericides and cationic assemblies that would prevent their adsorption to the bacterial cells.

Doses for killing *S. aureus* were always higher than those required for killing *P. aeruginosa* (Table 3). Tetraalkyl ammonium compounds have been recognized as efficient blockers of the potassium channels KcsA of the Gram-negative *E. coli*.⁵¹ In fact, the Gram-negative *P. aeruginosa* was very sensitive to all cationic compounds and assemblies, dying at very small final concentrations over the range of $1\text{--}6 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, the Gram-positive *S. aureus* was less sensitive to all cationic compounds and assemblies, dying over the $6\text{--}10 \mu\text{g/mL}$ of final concentrations. Recently, Otto described a sensor system for cationic antimicrobial molecules in *Staphylococcus* sp., which causes resistance to cationic antimicrobial agents.⁵² This system would consist of a short extracellular loop with a high density of negatively charged amino acid residues and would attract and interact with cationic antimicrobial compounds. Transduction of this interaction signal would trigger the D-alanylation of teichoic acids and the lysylation of phosphatidylglycerol, resulting in a decreased negative charge of the cell surface and membrane, respectively, leading to decreased attraction or repulsion of cationic molecules. This system might explain the smaller sensitivity to cationic compounds and assemblies exhibited by *S. aureus* in comparison to *P. aeruginosa* (Table 3).

(48) Kayitmazer, A. B.; Strand, S. P.; Tribet, C.; Jaeger, W.; Dubin, P. L. *Biomacromolecules* 2007, 8(11), 3568–3577.

(49) Stoll, S.; Chodanowski, P. *Macromolecules* 2002, 35(25), 9556–9562.

(50) Lu, L.; Rininsland, F. H.; Wittenburg, S. K.; Achyuthan, K. E.; McBranch, D. W.; Whitten, D. G. *Langmuir* 2005, 21(22), 10154–10159.

(51) Raja, E.; Vales, E. *Biophys. Chem.* 2009, 142(1–3), 46–54.

(52) Otto, M. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7(8), 555–567.

Figure 4. Bacteria viability (%) as a function of final concentrations of PDDA and DODAB combined as large particles (□). Controls for DODAB BF only (○) or PDDA only (Δ) are also shown. Interaction time was 1 h. Final cell concentrations were $4\text{--}6 \times 10^7$ and $2\text{--}4 \times 10^7$ CFU/mL for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively.

Table 3. z-Average Diameter (Dz) and Zeta-Potential (ζ) of Dispersions and Particles Plus Concentrations of Cationic Polyelectrolyte ([PE]) and/or Cationic Lipid ([CL]) Required to Achieve 99 and 50% of Cell Death^a

dispersion	Dz $\pm$ δ (nm)	$\zeta \pm \delta$ (mV)	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
			[PE] _{99/50} ($\mu\text{g/mL}$)	[CL] _{99/50} ($\mu\text{g/mL}$)	[PE] _{99/50} ($\mu\text{g/mL}$)	[CL] _{99/50} ($\mu\text{g/mL}$)
DODAB BF	79 $\pm$ 1	42 $\pm$ 1		3.0/1.2		-/1.8
DODAB BF				6.3 ^b /3.1 ^b		7.5 ^b /4.4 ^b
PDDA			1.0/0.5		10.0/0.5	
DODAB/CMC/PDDA ^c	108 $\pm$ 1	30 $\pm$ 1	2.0/0.9	1.0/0.5	10.0/0.5	6.0/0.3
DODAB/CMC/PDDA ^d	470 $\pm$ 5	52 $\pm$ 1	2.0/0.7	1.0/0.4	10.0/0.4	6.0/0.3

^a PE is PDDA and CL is DODAB. Delta (δ) represents the mean standard deviation. ^b Data from ref 34. ^c Small particles from 0.1 mM DODAB. ^d Large particles from 0.5 mM DODAB.

A remarkable efficiency of PDDA as antimicrobial agent was depicted from its MBC values over the $1\text{--}10\text{ }\mu\text{g/mL}$ range of PDDA concentrations (Table 3). From $150\,000\text{ g}$ as PDDA molecular weight, the conversion of $\mu\text{g/mL}$ to nanomolar concentration yields an equivalent range of $6.6\text{--}66\text{ nM}$. Thus, PDDA can be considered as a nanobactericide (!) whereas DODAB with MBC from $3\text{--}7.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (equivalent to $4.7\text{--}12.0\text{ }\mu\text{M}$) can be classified as a microbactericide. In the green chemistry era when the environment requires protection and microbial resistance of pathogenic bacteria requires aggressive treatments, NANObactericides might be the balanced solution.

The cationic compounds and assemblies can be ordered after their bactericidal efficiency against both bacteria species: DODAB BF/CMC/PDDA $\approx$ PDDA $>$ DODAB BF (Table 3). This sequence suggests that the layer that is actually effective against the bacteria is the outermost layer of the cationic assembly, otherwise the assembly would have been effective at doses that would be smaller than the one required for PDDA alone. The explanation for the lower efficiency of DODAB BF when compared to PDDA alone can be found in the different counterions: bromide and chloride, respectively. Chloride binds with lower affinity to the quaternary ammonium moiety than bromide does.⁵³

The microbicidal effect described in this work in vitro may be different from the one taking place in vivo aiming at antimicrobial chemotherapy. Liposomes and particles while carrying antimicrobial agents are submitted to the biological milieu following a specific sequence of events: (1) opsonization or preparation for phagocytosis, i.e., chemi- or physisorption of immune and

nonimmune components in blood such as immunoglobulins, albumin, complement, and fibronectin; (2) phagocytosis or macrophages uptake by the fixed macrophages of the reticulo-endothelial (RES) system (liver and spleen); (3) in the case of lipid carriers, remotion of the phospholipid molecules from the vesicles by high-density lipoproteins (HDL) in the plasma leading to vesicle disintegration.⁵⁴ This means that the cationic antimicrobials in form of liposomes or particles will be located inside the macrophages, i.e., in the same place where the infecting bacteria are. In fact, the ability of liposomal or particulate carriers to deliver antibiotics to bacteria in vivo has been demonstrated in the literature since the seventies.^{55,56}

In order to check if the antimicrobial activity is dependent on particle size over a range of DODAB and PDDA concentrations the cell viability profile was compared for large and small particles (Figure 5). Large particles at 0.5 mM DODAB, 0.5 mg/mL CMC, and 0.5 mg/mL PDDA were diluted five times to obtain the same final concentrations of the small particles at 0.1 mM DODAB, 0.1 mg/mL CMC, and 0.1 mg/mL PDDA. The comparison between the curves in Figure 5 revealed the independence of the antimicrobial effect on the particle size and the dependence on the amount of positive charges on particles. This is consistent with the equivalent MBC values for small and large particles (Table 3).

The systems here described might become potentially useful in clinical treatment, prophylaxis and disinfection. DODAB BF was previously employed in vivo not only by themselves as cationic antimicrobial drugs but also as drug carriers.^{17,18} PDDA as the outermost layer of a particle might become more interesting than

(53) Morgan, J. D.; Napper, D. H.; Warr, G. G. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*(23), 9458–9465.

(54) Gregoriadis, G. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*(12), 527–537.

(55) Gregoriadis, G. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*(13), 704–710.

(56) Gregoriadis, G. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*(14), 765–770.

Figure 5. Cell viability (%) as a function of final concentrations of PDDA and DODAB carried by small (○) or large (△) particles. Large particles were diluted 5 times to obtain the same doses of cationic compounds carried by the small particles so that small and large particles carried the same final dose of DODAB and PDDA. Interaction time was 1 h. Final cell concentrations were $4\text{--}8 \times 10^7$ and $2\text{--}3 \times 10^7$ CFU/mL for *P. aeruginosa* and *S. aureus*, respectively.

PDDA in solution because macrophages readily take up foreign particles in general. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first instance in the literature where the PDDA antimicrobial action is systematically described.

At last, the severe problems in treating bacterial infections due to increasing bacterial resistance to antibiotics require novel approaches in drug delivery. Potential applications of cationic particulates as antibiotic carriers would circumvent the high cost of other efficient but more expensive carriers such as the liposomes.⁵⁷

Conclusions

In vitro, DODAB or PDDA dispersions are effective as bactericides over the micro- and nanomolar range of concentrations,

respectively, and DODAB BF/CMC/PDDA hybrid particles were as effective as PDDA alone. In vivo, the hybrid cationic particles might become more useful as bactericides than PDDA alone due to phagocytosis by macrophages belonging to the reticulo-endothelial system, which are important to fight microbial infection. The LbL procedure determining sequential adsorption driven by electrostatic attraction was a simple method to obtain organized particles in vitro at low ionic strength. These particles might become disorganized at higher ionic strength and in vivo releasing inner contents of cationic lipid. *P. aeruginosa* was more sensitive to cationic agents and assemblies than *S. aureus*.

Acknowledgment. L.D.M. thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a MSc fellowship. Financial support from CNPq is gratefully acknowledged.

(57) Drulis-Kawa, Z.; Dorotkiewicz-Jach, A. *Int. J. Pharm.* **2010**, *387*(1–2), 187–198.

Apêndice 3.

Resumo selecionado para apresentação oral junto à “International Conference on Antimicrobial Research - ICAR” (3-5 Novembro, 2010, Valladolid, Espanha). Antimicrobial films from quaternary ammonium compounds and poly(methylmethacrylate).

International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2010)
Valladolid (Spain), 3-5 November 2010

Antimicrobial films from quaternary ammonium compounds and poly(methylmethacrylate)

L. D. Melo^{1,2}, E. M. Mamizuka², E. M. A. Pereira¹, D. F. S. Petri³ and A. M. Carmona-Ribeiro^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Microbial adhesion and biofilm formation on medical devices represent a common occurrence that can lead to serious illness and even to patient death. Besides, surfaces may act as reservoirs of microbes which could lead to the spread of infection upon being touched by healthcare workers or patients.¹ Treatment of established biofilms with antimicrobial agents are difficult because the organisms are encased within a protecting microenvironment. Main approaches to reduce adhesion are based either on killing microbes upon contact or preventing adhesion without killing bacteria.² Cationic surfactants and lipids such as dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) have been established as anti-infective agents.³ Microbicidal coatings based on immobilization of the DODAB lipid in a polymeric network of poly(methylmethacrylate) (PMMA) yielded stable and homogeneous hybrid films on silicon wafers.⁴ In this work these hybrid films containing quaternary ammonium compounds (QACs) such as DODAB or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) are further evaluated regarding physical properties and antimicrobial activity against two bacterial species of clinical interest which are particularly important in formation of biofilms, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The films were prepared by spin-coating of a chloroformic solution of DODAB or CTAB and PMMA on a glass coverslip. In this chloroformic solution, DODAB or CTAB concentrations ranged from 0.03 to 3.8 mM, which corresponds to 0.01875 to 2.4 mg/mL of DODAB or 0.01092 to 1.38 mg/mL of CTAB, whereas PMMA concentration was fixed at 10 mg/mL. After chloroform vaporization, the spin-coated films were characterized by determination of contact angle and surface tension as a function of QAC concentration. After one hour film-bacteria interaction, antimicrobial activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus* was quantitatively evaluated from plating and CFU counting as previously described for other films.⁵ Hybrid PMMA-QAC films showed higher wettability than pure PMMA with wettability increasing as a function of QAC concentration. Regarding the surface tension, for PMMA-DODAB films immersed in aqueous solutions, surface tension at the air-water interface remained constant and equal to the surface tension of water showing that DODAB remains mechanically imprisoned in the polymeric network and does not leave the film to occupy the air-water interface. For PMMA-CTAB films, immersed in aqueous solutions, surface tension at the air-water interface showed a slight reduction up to 60 mN/m, suggesting that CTAB diffuses more readily than DODAB from the polymeric network. The antimicrobial effect of these hybrid films was clearly dependent on QAC concentration. For PMMA-DODAB films, 0% cell viability was obtained for films prepared from 2.4 mg/mL QAC solution for both bacteria species tested. Regarding PMMA-CTAB films, 0% cell viability for *P. aeruginosa* and *S. aureus* was obtained from 0.7 and 0.07 mg/mL QAC solution, respectively.

1. Page, K.; Wilson, M.; Parkin, I.P. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J Mater Chem* 2009, 19: 3819-3831.

2. Tiller, J.C., et al. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *PNAS* 2001, 98 (11): 5981-5985.

3. Carmona-Ribeiro, A.M., et al. Cationic surfactants and lipids as anti-infective agents. *Anti-Infect Agents Med Chem* 2006, 5: 33-54.

4. Pereira, E.M.A., et al. Hybrid materials from intermolecular associations between cationic lipid and polymers. *J Phys Chem B* 2008, 112: 9301-9310.

5. Jampala, S.N., et al. Plasma-enhanced synthesis of bactericidal quaternary ammonium thin layers on stainless steel and cellulose surfaces. *Langmuir* 2008, 24(16): 8583-8591.

Keywords antimicrobial surfaces; hybrid films; cationic lipid; pathogenic bacteria.

Acknowledgments Financial support from CNPq is gratefully acknowledged.

Apêndice 4. Notificação de aceite do capítulo “Antimicrobial Biomimetics” do Livro “Advances in Biomimetics”.

INTECH OPEN ACCESS
PUBLISHER

T/F +385 51 315 152
E info@intechweb.org
www.intechweb.org

TO:
Ana Carmona-Ribeiro

São Paulo SP
Brasil

DATE: Jun 08, 2010

INTECH NOTIFICATION OF ACCEPTANCE

Dear Professor Ana Carmona-Ribeiro,

On behalf of the Editorial Board it is my pleasure to inform you that the manuscript entitled "Antimicrobial Biomimetics", written by Ana Carmona-Ribeiro, Lilian Barbassa and Letícia Melo has been accepted to be published in the book "Advances in Biomimetics", ISBN 978-953-7619-X-X.

We firmly believe that your contribution will be of great importance for the scientific community.

Sincerely yours,

Aleksandar Lazinica, President and CEO

Aleksandar Lazinica

INTECH

INTECH International Offices:

OFFICE RIJEKA:
Janeza Trdine 9
51000 RIJEKA
Croatia

OFFICE VIENNA:
Zieglgasse 14
A-1070 Vienna
Austria

DISTRIBUTION CENTRE:
Phoenix Consulting Services Ltd.
3/240 Vivek Khand, Gomti Nagar.
Lucknow-226010, India

**Apêndice 5. Resumo do capítulo “*Antimicrobial Biomimetics*” do livro
 ”*Advances in Biomimetics*” aceito para publicação.**

Antimicrobial Biomimetics

Ana Maria Carmona-Ribeiro, Lilian Barbassa and Letícia Dias de Melo

A vast territory for research is open from mimicking the behaviour of microorganisms to defend themselves from competitors. Antibiotics secreted by bacteria or fungi can be copied to yield efficient molecules which are active against infectious diseases. In this review, peptides, lipids, particles and films are overviewed unraveling novel antimicrobial approaches against infectious diseases.

Anexo 1. Currículo Lattes

Letícia Dias de Melo

Bolsista de Mestrado do CNPq

Farmacêutica com habilitação em Análises Clínicas, formada pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Mestranda em Análises Clínicas - área de Microbiologia - pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Bacteriologia.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 17/11/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/8000959927795130>

Dados pessoais

Nome Letícia Dias de Melo

Nome em citações bibliográficas MELO, Letícia Dias de

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Instituto de Química.
Prof, Lineu Prestes, 748, Bloco 4 Superior, Sala 451, Laboratório de Biocolóides
Cidade Universitária
05599-970 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30912164
URL da Homepage: lemelodias@usp.br

Formação acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em andamento em Farmácia (Análises Clínicas) (Conceito CAPES 6) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Materiais antimicrobianos híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário, *Orientador:* Ana Maria Carmona Ribeiro.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, , .
Palavras-chave: Polímeros; Lípides catiônicos; Nanomateriais antimicrobianos.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia / *Subárea:* Microbiologia.
Grande área: Ciências Exatas e da Terra / *Área:* Química / *Subárea:* Nanobiotecnologia.

2004 - 2008 Graduação em Farmácia e Bioquímica .
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

Formação complementar

- 2009 - 2009** Nanotecnologia aplicada aos sistemas oftálmicos. (Carga horária: 3h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
- 2008 - 2008** Preparação e Aplicação de Nanopartículas. (Carga horária: 3h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
- 2006 - 2006** Mecanismos de Resistência aos Antibióticos (BGN). (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
- 2005 - 2005** Pharmaceutical Care. (Carga horária: 3h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 2005 - 2005** Bactérias Multirresistentes. (Carga horária: 3h).
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.
- 2004 - 2004** Advanced Laboratory Methods for Identification.
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

Atuação profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

- 2009 - Atual** Vínculo: Pós-graduanda, Enquadramento Funcional: Pós-graduanda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

- 02/2009 - Atual** Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .
- Projetos de pesquisa
[Materiais antimicrobianos híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário](#)

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

Vínculo institucional

- 2004 - 2008** Vínculo: Acadêmica, Enquadramento Funcional: Acadêmica, Carga horária:

40, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

05/2008 - 12/2008 Atividades de Participação em Projeto, Departamento de Análises Clínicas.

Projetos de pesquisa

[PIC - Detecção de Staphylococcus aureus resistentes à metilina em portadores de HIV.](#)

03/2004 - 12/2008 Pesquisa e desenvolvimento, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Linhas de pesquisa

[Bacteriologia Clínica - Universidade Estadual de Maringá](#)

7/2006 - 6/2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Projetos de pesquisa

[Estudo fenotípico da resistência aos antimicrobianos apresentados por bactérias mais frequentemente isolados no Hospital Universitário de Maringá, com carga horária total de 632 horas.](#)

09/2007 - 05/2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.

Projetos de pesquisa

[PIBITI - Desenvolvimento e produção de formulação farmacêutica para o tratamento do vitiligo e do câncer de próstata \(MCT/FINEP-INOVAÇÃO DE PRODUTOS TERAPÊUTICOS\), com carga horária total de 792 horas.](#)

04/2007 - 03/2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia e Farmacologia.

Projetos de pesquisa

[Aprimoramento de técnicas homeopáticas, com carga horária total de 240 horas.](#)

04/2007 - 11/2007 Estágios , Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Farmácia e Farmacologia.

Estágio realizado

Estágio em Farmácia de Dispensação.

- 03/2006 - 12/2006** Outras atividades técnico-científicas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.
- Atividade realizada
Monitoria na disciplina de Microbiologia, totalizando 265 horas..
- 11/2004 - 10/2006** Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.
- Projetos de pesquisa
[Estudo da ocorrência de Mycobacterium bovis e outras micobactérias em leite comercializado na região de Maringá-Paraná.](#)
- 3/2004 - 11/2005** Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas.
- Projetos de pesquisa
[PIC - Estudo da ocorrência de Mycobacterium bovis e outras micobactérias em leite comercializado na região de Maringá-Paraná.](#)
- 02/2001 - 07/2005** Outras atividades técnico-científicas, Centro de Ciências Humanas Letras e Artes, Departamento de Letras.
- Atividade realizada
Conclusão do Curso de Língua Inglesa, no Instituto de Línguas da Universidade Estadual de Maringá, com total de 528 horas..
- 4/2004 - 5/2004** Estágios, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Análise Clínicas.
- Estágio realizado
Estágio em Práticas e Laboratório, com carga horária total de 128 horas.

Linhas de Pesquisa

1. Bacteriologia Clínica - Universidade Estadual de Maringá

Objetivos: Pesquisar assuntos referentes à área da Bacteriologia Clínica, com especial enfoque à resistência bacteriana e infecção hospitalar..

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia.

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Microbiologia / *Subárea:* Bacteriologia.

Setores de atividade: Saúde Humana; Saúde e Serviços Sociais.

Palavras-chave: Resistência; Bactérias; Bacteriologia.

Projetos de Pesquisa

2009 - Atual Materiais antimicrobianos híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário

Descrição: Projeto que busca o desenvolvimento e a caracterização de novos materiais híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário, com ação antimicrobiana, quer seja na forma de filmes híbridos ou na forma de nanopartículas..

Situação: Em andamento; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1) Doutorado (3) .
Integrantes: Ana Maria Carmona-Ribeiro - Coordenador / Elsa Masae Mamizuka - Integrante / Denise Freitas Siqueira Petri - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

2008 - 2008 PIC - Detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em portadores de HIV.

Descrição: Projeto de Iniciação Científica que tem por objetivo buscar o estado de carreador de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em vestíbulo nasal e orofaringe de indivíduos portadores do HIV..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (1) / Mestrado acadêmico (3) / Doutorado (1) .

Integrantes: Rosilene Fressatti Cardoso - Integrante / Vera Lúcia Dias Siqueira - Coordenador / Rubia Andréa Falleiros de Pádua - Integrante / Regiane Bertin de Lima Scodro - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

2007 - 2008 PIBITI - Desenvolvimento e produção de formulação farmacêutica para o tratamento do vitiligo e do câncer de próstata (MCT/FINEP-INOVAÇÃO DE PRODUTOS TERAPÊUTICOS), com carga horária total de 792 horas.

Descrição: Projeto de Iniciação Tecnológica Industrial, cujo objetivo geral desta proposta é desenvolver dois subprojetos: Subprojeto (a) Estudos Pré-clínicos e Testes Clínicos de uma Formulação Farmacêutica em Fase de Desenvolvimento para o Tratamento do Vitiligo. Realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* para o desenvolvimento de um creme para pigmentação. Investigar mecanismos de ação da substância bioativa. Subprojeto (b) - Desenvolvimento Através da Utilização da Nanotecnologia de uma Formulação Farmacêutica Contendo Isoflavona para o Tratamento de Câncer de Próstata. Que terão as seguintes ações: 1. Lançamento de produtos com um novo conceito no mercado; 2.A projeção de sua imagem vinculada a um produto com alto grau de cura, e que aumente o bem estar das pessoas que sofrem com o vitiligo e câncer de próstata; 3.Desenvolver um produto natural e de alta qualidade para um mercado com enorme demanda; Projeto aprovado no Edital MCT-MS-FINEP/Ação Transversal/Cooperação ICT-Empresas/ Inovação em Produtos Terapêuticos, Referência 2291/06. Com a dedicação semanal de 20horas, totalizou, ao fim do período, 792 horas..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (2) / Mestrado acadêmico (2) .

Integrantes: Benedito Prado Dias Filho - Coordenador / Celso Vataru Nakamura - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

Financiador(es): Financiadora de Estudos e Projetos - Auxílio financeiro..

2007 - 2008 Aprimoramento de técnicas homeopáticas, com carga horária total de 240 horas.

Descrição: Projeto de Ensino que visa ampliar o estudo da homeopatia para além da universidade. Estudos teóricos e aprimoramento de técnicas homeopáticas, com carga horária total de 240 horas/aula..

Situação: Concluído; *Natureza:* Outra.

Integrantes: Anélio Dias Nascimento Junior - Coordenador / Letícia Dias de Melo - Integrante.

2006 - 2008 Estudo fenotípico da resistência aos antimicrobianos apresentados por bactérias mais frequentemente isolados no Hospital Universitário de Maringá, com carga horária total de 632 horas.

Descrição: Projeto de Pesquisa com o objetivo de avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos, e as alterações deste ao longo dos anos, apresentado por bactérias mais comumente isoladas no HU-UEM. Carga horária total de 632 horas..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (2) / Especialização (1) / Mestrado acadêmico (2) / Doutorado (2) .

Integrantes: Rosilene Fressatti Cardoso - Integrante / Vera Lúcia Dias Siqueira - Coordenador / Sonia Aparecida Sgarioni Bertão - Integrante / Rubia Andreia Falleiros de Pádua - Integrante / Maria Cristina B Tognim - Integrante / Jeisiane Teixeira da Cruz - Integrante / Sonia Aparecida de Carvalho - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

Número de produções C, T & A: 4.

2004 - 2006 Estudo da ocorrência de Mycobacterium bovis e outras micobactérias em leite comercializado na região de Maringá-Paraná.

Descrição: Projeto de pesquisa realizado ao longo de 2 anos, e que deu origem a um PIC com duração de 1 ano, cujo objetivo foi avaliar a ocorrência de micobactérias, inclusive M. bovis, em amostras de leite bovino coletados na região de Maringá-Paraná. Com a dedicação de 12 horas por semana, totalizando neste projeto 1308 horas..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (2) / Especialização (1) / Mestrado acadêmico (3) / Doutorado (1) .

Integrantes: Rosilene Fressatti Cardoso - Coordenador / Vera Lúcia Dias Siqueira - Integrante / Dirceu Vedovello Filho - Integrante / Sonia Aparecida Sgarioni Bertão - Integrante / Rubia Andréa Falleiros de Pádua - Integrante / Carla Ferrairo Danieleto - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

Número de produções C, T & A: 1.

2004 - 2005 PIC - Estudo da ocorrência de Mycobacterium bovis e outras micobactérias em leite comercializado na região de Maringá-Paraná.

Descrição: Projeto de Iniciação Científica visando estudar a ocorrência de M. bovis e outras micobactérias em leite comercializado na região de Maringá-Paraná, com carga horária total de 576 horas..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação (2) / Especialização (1) / Mestrado acadêmico (3) / Mestrado profissionalizante (0) / Doutorado (1) .

Integrantes: Rosilene Fressatti Cardoso - Coordenador / Vera Lúcia Dias Siqueira - Integrante / Dirceu Vedovello Filho - Integrante / Sonia Aparecida Sgarioni Bertão - Integrante / Rubia Andréa Falleiros de Pádua - Integrante / Carla Ferrairo Danieleto - Integrante / Letícia Dias de Melo - Integrante.

Número de produções C, T & A: 1.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Bacteriologia.
3. Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Nanobiotecnologia.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Antimicrobial Particles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes. *Langmuir* ^{JCR}, v. 26, p. 12300-12306, 2010.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. ★ MELO, Letícia Dias de ; SPOSITTO, F. L. E. ; BEZAGIO, F. C. ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; DIAS, J. R. C. ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em portadores do HIV.. In: III Congresso Internacional de Saúde e III CISDEM, 2009, Maringá-PR. III Congresso Internacional de Saúde da UEM e III CISDEM, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1. MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Hybrid Nanoparticles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes as Antimicrobial Agents. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu - PR. XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010. p. 68.
2. MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Hybrid Nanoparticles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes as Antimicrobial Agents. In: 3rd International Symposium of Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules, 2010, Cardiff. 3rd International Symposium of Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules. Cardiff, 2010.
3. ★ MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; PEREIRA, E. M. A. ; PETRI, Denise

Freitas Siqueira ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Antimicrobial films from quaternary ammonium compounds and poly(methylmethacrylate). In: International Conference on Antimicrobial Research - ICAR, 2010, Valladolid. Book of abstracts - International Conference on Antimicrobial Research, 2010. p. 199.

4. MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Hybrid nanoparticles from cationic lipids and polyelectrolytes as antimicrobial agents.. In: International Liposome Society 2009 Meeting, Liposome Advances: Progress in Drug and Vaccine Delivery, 2009, Londres. Abstract Book, 2009. p. 65.

5. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SCODRO, Regiane Bertin de Lima ; MELO, Letícia Dias de ; MITSUGUI, C. S. ; TOGNIM, Maria Cristina B . Metallo-beta-lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e sensibilidade aos carbapenêmicos. In: XI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2008, Rio de Janeiro. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Rio de Janeiro : Contexto, 2008. v. 12. p. 30-30.

6. GRIZZO, F. M. F. ; MELO, Letícia Dias de ; KANAMARU, F. ; WINGETER, Márcia Arias ; TOGNIM, Maria Cristina B ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Resistência antimicrobiana e tratamento em infecções de corrente sanguínea causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. In: II Congresso Internacional de Saúde, VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. II Congresso Internacional de Saúde, 2007.

7. GRIZZO, F. M. F. ; WINGETER, Márcia Arias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; MELO, Letícia Dias de ; TOGNIM, Maria Cristina B ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Impacto da terapia antimicrobiana em infecções de corrente sanguínea causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. In: XVI EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica, 2007, Maringá. XVI Encontro Anual de Iniciação Científica do Paraná, 2007.

8. MELO, Letícia Dias de ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CRUZ, J. T. ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; CARVALHO, S. A. ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Enterobactérias produtoras de ESBL em amostras clínicas analisadas no LEPAC.. In: I Congresso de Farmácia de Maringá, II Encontro Científico do LEPAC, XIX Semana de Integração de Farmácia., 2006, Maringá. I Congresso de Farmácia de Maringá, 2006.

9. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; MELO, Letícia Dias de ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; WINGETER, Márcia Arias . Mudanças na resistência aos antibióticos de bactérias comumente isoladas de casos de infecção hospitalar entre 2002 e 2005.. In: VI Congresso Pan-Americano e X Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2006, Porto Alegre. VI Congresso Pan-Americano e X Congresso de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2006.

10. GRIZZO, F. M. F. ; WINGETER, Márcia Arias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; TOGNIM, Maria Cristina B ; MELO, Letícia Dias de ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Resistência de amostras de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hemoculturas associadas a casos de infecção hospitalar no Hospital Universitário de Maringá.. In: I Congresso de Farmácia de Maringá, II Encontro Científico do LEPAC, XIX Semana de Integração de Farmácia, 2006, Maringá. I Congresso de Farmácia de Maringá, 2006.

11. MELO, Letícia Dias de ; TEIXEIRAFILHO, Rubens Bernardino Giublin ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; AOKI, Elisabeth Eiko ; WINGETER, Márcia Arias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Alterações no perfil da resistência aos antibióticos de bactérias comumente isoladas em Hospital Universitário entre 2002 e 2004.. In: I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS, 2005, Maringá. I Congresso Internacional de Saúde de Maringá, V Seminário Científico do CCS., 2005.
12. MELO, Letícia Dias de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; DANIELETTTO, Carla Ferrairo ; BERTÃO, Sonia Aparecida Sgarioni ; VEDOVELLO FILHO, Dirceu ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Isolamento de micobactérias em amostras de leites não pasteurizados e pasteurizados.. In: XIV EAIC - Encontro Anual de Iniciação Científica, 2005, Guarapuava. XIV Encontro Anual de Iniciação Científica do Paraná, 2005.
13. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; MELO, Letícia Dias de ; GARCIA, Lourdes Botelho ; TOGNIM, Maria Cristina B . Correlação entre 3 diferentes metodologias para avaliação da sensibilidade de amostras clínicas de *Acinetobacter* spp.. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos, 2005.

Apresentações de Trabalho

1. MELO, Letícia Dias de ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) . Hybrid Nanoparticles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes as Antimicrobial Agents. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. MELO, Letícia Dias de ; SPOSITTO, F. L. E. ; BEZAGIO, F. C. ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; DIAS, J. R. C. ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Detecção de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em portadores do HIV. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. ★ MELO, Letícia Dias de ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SCODRO, Regiane Bertin de Lima ; CARVALHO, S. A. ; SIQUEIRA, Jacira Francisco ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade à vancomicina no hospital universitário de maringá. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SCODRO, Regiane Bertin de Lima ; MELO, Letícia Dias de ; MITSUGUI, C. S. ; TOGNIM, Maria Cristina B . Metallo-beta-lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e sensibilidade aos carbapenêmicos. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. GRIZZO, F. M. F. ; MELO, Letícia Dias de ; KANAMARU, F. ; WINGETER, Márcia Arias ; TOGNIM, Maria Cristina B ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Resistência antimicrobiana e tratamento em infecções de corrente sanguínea causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6. GRIZZO, F. M. F. ; WINGETER, Márcia Arias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; MELO, Letícia Dias de ; TOGNIM, Maria Cristina B ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Impacto da terapia antimicrobiana em infecções de corrente sanguínea causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.. 2007. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; MELO, Letícia Dias de ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; WINGETER, Márcia Arias . Mudanças na Resistência aos Antibióticos de Bactérias Comumente Isoladas de Casos de Infecção Hospitalar entre 2002 e 2005.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. MELO, Letícia Dias de ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; CRUZ, J. T. ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; CARVALHO, S. A. ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Enterobactérias Produtoras de ESBL em Amostras Clínicas Analisadas no Lepac.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. GRIZZO, F. M. F. ; WINGETER, Márcia Arias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; TOGNIM, Maria Cristina B ; MELO, Letícia Dias de ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Resistência de amostras de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hemoculturas e associadas a casos de infecção hospitalar no Hospital Universitário de Maringá.. 2006. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. MELO, Letícia Dias de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; DANIELETTTO, Carla Ferrairo ; BERTÃO, Sonia Aparecida Sgarioni ; VEDOVELLO FILHO, Dirceu ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Isolamento de Micobactérias em Amostras de Leites Não Pasteurizados e Pasteurizados.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. MELO, Letícia Dias de ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; TEIXEIRAFILHO, Rubens Bernardino Giublin ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; AOKI, Elisabeth Eiko ; WINGETER, Márcia Arias ; SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias . Alterações no Perfil da Resistência aos Antibióticos de Bactérias Comumente Isoladas em Hospital Universitário entre 2002 e 2004.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. SIQUEIRA, Vera Lúcia Dias ; CARDOSO, Rosilene Fressatti ; PÁDUA, Rubia Andreia Falleiros de ; MELO, Letícia Dias de ; GARCIA, Lourdes Botelho ; TOGNIM, Maria Cristina B . Correlação entre 3 Diferentes Metodologias para Avaliação da Sensibilidade de Amostras Clínicas de *Acinetobacter* spp.. 2005. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Produção técnica

Produtos tecnológicos

1. ★ [CARMONA-RIBEIRO, Ana Maria](#) ; MAMIZUKA, Elsa Masae ; MELO, Letícia Dias de . Partículas híbridas antibacterianas, processo de preparação de partículas híbridas antibacterianas, composição farmacêutica, uso e material antibacteriano contendo as mesmas.. 2010.

Eventos

Participação em eventos

1. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Hybrid Nanoparticles from Cationic Lipid and Polyelectrolytes as Antimicrobial Agents. 2010. (Congresso).
2. II Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2010. (Simpósio).
3. III Congresso Internacional de Saúde e III CISDEM. Detecção de Staphylococcus aureus resistentes à meticilina em portadores do HIV.. 2009. (Congresso).
4. I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). 2009. (Simpósio).
5. II Congresso de Farmácia de Maringá. Staphylococcus aureus: Sensibilidade à vancomicina no hospital universitário de Maringá. 2008. (Congresso).
6. I Congresso de Farmácia de Maringá. Enterobactérias produtoras de ESBL em Amostras Clínicas Analisadas no Lepac.. 2006. (Congresso).
7. 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia. 2006. (Congresso).
8. I Congresso Internacional da Saúde. Alterações no Perfil de Resistência aos Antibióticos de Bactérias Comumente Isoladas em Hospital Universitário entre 2002 e 2004.. 2005. (Congresso).
9. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences. 2005. (Congresso).
10. XIV Encontro Anual de Iniciação Científica EAIC. Isolamento de Micobacterias em Amostras de Leites Não Pasteurizados e Pasteurizados.. 2005. (Encontro).
11. I Simpósio Maringaense sobre Tuberculose: Ação Multiprofissional.. 2004. (Simpósio).

Outras informações relevantes

Professora de química em cursinho comunitário, para carentes, durante o período de setembro de 2004 a fevereiro de 2005, em Sarandi-PR.

Anexo 2. Ficha do aluno – USP

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6720387/1 - Leticia Dias de Melo

Email: lemelodias@usp.br
Data de Nascimento: 25/06/1985
Cédula de Identidade: RG - 6.949.373-4 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 16/02/2009
Início da Contagem de Prazo: 16/02/2009
Data Limite: 16/08/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 16/02/2009 a 25/02/2009 E.Mail: borelli@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Maria Carmona Ribeiro - 26/02/2009 até o presente. E.Mail: mcricbeir@iq.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/10/2010
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 16/02/2009
Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2010

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6720387/1 - Leticia Dias de Melo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793 - 9/1	Tópicos em Análises Clínicas I	23/03/2009	05/07/2009	30	2	87	A	N	Concluída
BMM5789 - 4/1	Mecanismos de Ação de Agentes Antimicrobianos	04/05/2009	01/06/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757 - 2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5707 - 5/2	Infecção Hospitalar: Recursos Laboratoriais Tradicionais e Avançados na Investigação, Epidemiologia, Profilaxia e Controle	21/09/2009	11/10/2009	75	5	100	A	N	Concluída
QBQ5716 - 4/1	Biomoléculas e Superfícies (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	19/10/2009	30/11/2009	90	6	100	A	N	Concluída
BMM5778 - 2/2	Biofilmes Microbianos	01/03/2010	26/04/2010	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	27
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.