



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

**AMANDA DOS REIS CORREIA**

---

**Atividade de compostos quitosânico-guanilados contra a  
formação de biofilme de isolados clínicos de *Pseudomonas  
aeruginosa***

---

**Anápolis - GO**

**AMANDA DOS REIS CORREIA**

---

**Atividade de compostos quitosânico-guanilados contra a formação de biofilme de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás como exigência para obtenção do Título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Roberta Signini

**Anápolis - GO**

**2022**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

dC824      dos Reis Correia, Amanda  
a              Atividade de compostos quitosânicos-guanilados contra  
a formação de biofilme de isolados clínicos de  
Pseudomonas aeruginosa / Amanda dos Reis Correia;  
orientador Plínio Lázaro Faleiro Naves; co-orientador  
Roberta Signini. -- Anápolis, 2022.  
86 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos  
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,  
Universidade Estadual de Goiás, 2022.

1. Inibição da formação de biofilme. 2. Pseudomonas  
aeruginosa. 3. Quitosana. 4. Quitosana guanilada. 5.  
Atividade Antimicrobiana. I. Lázaro Faleiro Naves,  
Plínio, orient. II. Signini, Roberta, co-orient. III.  
Título.

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA  
DIGITAL (BDTD)**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a **Lei nº 9610/98**, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**Dados do autor (a)**

Nome Completo: Amanda dos Reis Correia

E-mail: amanda.dosreiscorreia@gmail.com

**Dados do trabalho**

Título: Atividade de compostos quitosânico-guanilados contra a formação de biofilme de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tipo

( ) Tese            (x) Dissertação

Curso/Programa: Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde

Concorda com a liberação documento [x] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>

**Assinalar justificativa para o caso de impedimento e não liberação do documento:**

[ ] Solicitação de registro de patente;

[ ] Submissão de artigo em revista científica;

[ ] Publicação como capítulo de livro;

[ ] Publicação da dissertação/tese em livro.

- ✓ Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa, prorrogável por mais um ano.
- ✓ Em caso de não autorização, o período de embargo será de até um ano a partir da data de defesa, caso haja necessidade de exceder o prazo, deverá ser apresentado formulário de solicitação para extensão de prazo para publicação devidamente justificado, junto à coordenação do curso.

Anápolis, 20 de junho de 2022.



---

Assinatura do autor (a)



---

Assinatura do orientador (a)

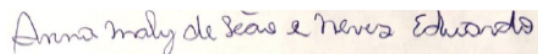
**Amanda dos Reis Correia**

**“Atividade de compostos quitosânico-guanilados contra a formação de biofilme de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*”**

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 09 de junho de 2022, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves  
Presidente da Banca  
UEG



Profa. Dra. Anna Maly de Leão e Neves Eduardo  
Membro externo  
UnB



Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro  
Membro externo  
UFG

**Dedico este trabalho aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional. A minha mãe Neide Maria (*in memoriam*) minha heroína, me incentivou nas horas difíceis de desânimo e cansaço, nunca duvidou da minha capacidade, sempre torceu para que essa conquista se realizasse.**

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus por ter me dado a vida e concedido saúde, por ser tão bom comigo, por ter encontrado amparo em seus braços nos momentos de fraqueza. Por renovar as minhas forças e conceder a oportunidade de viver experiências incríveis ao lado de pessoas maravilhosas, sempre me mostrando que nunca estarei sozinha.

Agradeço aos meus pais Neide e Amadeu meus maiores incentivadores, pelos conselhos, amor incondicional e por não medirem esforços para tornar essa conquista possível. As minhas irmãs Bárbara e Beatriz pela sinceridade e torcida. Mesmo distante, sempre estiveram me segurando à mão. Ao meu noivo Stefano que ao longo dessa jornada foi paciente, compreensivo, sempre acreditou em mim e me incentivou. Sem dúvida vocês são o melhor de mim.

Agradeço meu orientador Professor Plínio Naves e a co-orientadora professora Roberta Signini pelos ensinamentos e paciência que tiveram ao longo dessa etapa. A professora Maísa, uma das colaboradoras do projeto.

A Adamiane e Danielle pela amizade e palavras de incentivo, pelas horas de estudo onde através do conhecimento individual uma pode ajudar a outra. Entramos juntas no mestrado e com as experiências compartilhadas criamos um forte laço de amizade que permanecerá após essa etapa. A Elisa pelos ensinamentos, incentivo, suporte na parte química do trabalho e por sua amizade.

A equipe do laboratório de bioensaios em especial meus queridos colegas Reuber, Stephany, Marcio, Milena, Myrella, Gabrielle, Ádrian e Osvaldo pela disponibilidade em ajudar e companheirismo no laboratório.

Agradeço a CNPQ pelos investimentos financeiros que foram essenciais para a realização deste projeto, a CAPES pela bolsa concedida, à Universidade Estadual de Goiás e ao Programa de Mestrado em Ciências aplicadas a produtos para saúde. Agradeço a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com a concretização desse sonho, que fizeram parte dos bastidores dessa conquista.

## RESUMO

---

A *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um dos principais agentes etiológicos em processos infecciosos no ambiente hospitalar. Se apresenta como uma bactéria oportunista e com considerável nível de resistência aos antimicrobianos. Diante da diminuição da eficácia dos antimicrobianos disponíveis na prática médica, há uma crescente demanda de compostos inovadores para o tratamento antimicrobiano. Neste contexto, a investigação de biomateriais como a quitosana, que é um polissacarídeo obtido pela desacetilação da quitina e que possui propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, representa uma interessante alternativa devido à baixa propensão dos micro-organismos desenvolverem resistência, além do polímero e ser biocompatível, renovável e biodegradável. Um dos fatores limitantes de sua utilização é a baixa solubilidade em condição fisiológica. Entretanto, a quitosana pode adquirir novas propriedades quando modificada estruturalmente, expandindo suas formas de uso de acordo com o grupo ligado a ela. Este trabalho objetivou avaliar as propriedades biológicas da quitosana e de derivados quitosânico-guanilados com a avaliação da toxicidade pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina* e estudo da atividade antimicrobiana com a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB). Posteriormente foram avaliados o perfil de formação de biofilme pelos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e o efeito de concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilme por essas bactérias. Os resultados demonstraram que os compostos testados não apresentaram toxicidade para *A. salina* com  $CL_{50}$  acima de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em relação à atividade antimicrobiana, a quitosana apresentou CMI de 1,25 a  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  e com  $CMB > 2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As quitosanas-guaniladas mais ativas contra *P. aeruginosa* foram os compostos 3b e 3c com CMI de  $0,625 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A quitosana não demonstrou atividade bactericida contra os isolados de *P. aeruginosa* nas concentrações testadas, sendo a  $CMB > 2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O composto mais ativo foi o derivado 3b com  $CMB$  de  $0,625 \text{ mg.mL}^{-1}$  contra a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e variando entre 1,25 e  $> 2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  para os demais isolados. A formação de biofilme foi observada nas 13 *P. aeruginosa*, sendo 6 classificadas como formadoras fortes, 4 como formadoras moderadas e 3 como formadoras débeis. O efeito dos compostos na formação de biofilme foi variável nos 9 isolados testados. A quitosana propiciou discreta diminuição das células viáveis nos biofilmes em 77,78% das *P. aeruginosa* enquanto que as quitosanas-guaniladas 3a e 3b diminuíram o biofilme em 66,66% e 33,33% dos isolados, respectivamente. Os derivados quitosânico-guanilados não apresentaram melhora significativa nas suas características de solubilidade em pH fisiológico em relação à quitosana. A quitosana e as quitosanas-guaniladas apresentaram baixo grau de toxicidade e baixa atividade contra a formação de biofilme pelos isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Estudos posteriores devem ser realizados para corroborar nossos achados.

**Palavras-chave:** Quitosana. Guanidina. Quitosana guanilada. Atividade biológica. Toxicidade. Inibição. Atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

---

*Pseudomonas aeruginosa* is considered one of the main etiological agents in infectious processes in the hospital environment. It is an opportunistic pathogen with a considerable level of antimicrobial resistance. With the decreasing effectiveness of antimicrobials available in medical practice, there is a growing demand for innovative compounds for antimicrobial treatment. In this context, the investigation of biomaterials such as chitosan, which is a polysaccharide obtained by the deacetylation of chitin and which has interesting physicochemical and biological properties, represents an interesting alternative due to the low propensity of microorganisms to develop resistance, in addition to the polymer and be biocompatible, renewable and biodegradable. One of the limiting factors of its use is its low solubility under physiological conditions. However, chitosan can acquire new properties when structurally modified, expanding its uses according to the group attached to it. This work aimed to evaluate the biological properties of chitosan and chitosan-guanylated derivatives with the evaluation of toxicity with *Artemia salina* lethality assay and study of the antimicrobial activity with the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Subsequently, the profile of biofilm formation by clinical isolates of *P. aeruginosa* and the effect of subinhibitory concentrations of compounds on biofilm formation by these bacteria were evaluated. The results showed that the tested compounds did not show toxicity to *A. salina* with LC<sub>50</sub> above 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Regarding the antimicrobial activity, chitosan presented MIC from 1.25 to 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> and with CMB > 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. The most active guanylated chitosans against *P. aeruginosa* were compounds 3b and 3c with MIC of 0.625mg.mL<sup>-1</sup>. Chitosan did not demonstrate bactericidal activity against *P. aeruginosa* isolates at the concentrations tested, with CMB > 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. The most active compound was derivative 3b with CMB of 0.625 mg.mL<sup>-1</sup> against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and ranging from 1.25 to > 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> for the other isolates. Biofilm formation was observed in 13 *P. aeruginosa*, 6 were classified as strong formers, 4 as moderate formers and 3 as weak formers. The effect of the compounds on biofilm formation was variable in the 9 isolates tested. Chitosan provided a slight decrease in viable cells in biofilms in 77.78%, while chitosan-guanylated 3a and 3b decreased biofilm in 66.66% and 33.33% of the isolates, respectively. The chitosan-guanylated derivatives did not show significant improvement in their solubility characteristics at physiological pH in relation to chitosan. Chitosan and guanylated-chitosans showed a low degree of toxicity and low activity against biofilm formation by clinical isolates of *P. aeruginosa*. Further studies should be performed to corroborate our findings.

**Keywords:** Chitosan. Guanidine. Guanylated chitosan. Biological activity. Toxicity. Inhibition. Antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Representação da unidade polimérica da quitina. ....	17
Figura 2 - Representação das diferentes orientações de fibrilas da quitina. ....	18
Figura 3 - Representação da unidade polimérica da quitosana. ....	20
Figura 4 - Representação dos grupos reativos da quitosana. ....	21
Figura 5 - Representação da unidade polimérica guanidina. ....	24
Figura 6 - Representação das reações de guanilação e guanidilação. ....	25
Figura 7 - Aspecto macroscópico do cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em ágar cetrimide. ....	27
Figura 8 - Etapas da formação de biofilme. ....	29
Figura 9 - Foto de náuplio de <i>Artemia salina</i> . ....	31
Figura 10 - Representação estrutural da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados. ....	35
Figura 11 - Representação dos substituintes R1 e R2 dos compostos quito-guani 3a e quito-guani 3d. ....	51
Figura 12 - Representação dos substituintes R1 e R2 dos compostos quito-guani 3d e quito-guani 3e. ....	52
Figura 13 - Representação dos substituintes R1 e R2 dos compostos quito-guani 3b e quito-guani 3c. ....	53
Figura 14 - Representação dos substituintes R1 e R2 dos compostos quito-guani 3a, 3b, 3c e 3e. ....	54
Figura 15 - Representação dos substituintes R1 e R2 dos compostos quito-guani 3a e quito-guani 3d. ....	59
Figura 16 - Representação das estruturas dos compostos 3b, 3d e 3e. ....	60
Figura 17 - Representação dos compostos quito-guani 3b e 3c. ....	61
Figura 18 - Gráfico de dispersão entre contagem ufc Log10 e leituras de DO 492nm. ....	66

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Concentração Letal (CL50) da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados para <i>Artemia salina</i> . .....	49
Tabela 2 - Concentração mínima inibitória da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	55
Tabela 3 - Concentração mínima bactericida da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	56
Tabela 4 - Índice de formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	63
Tabela 5 - Número de células viáveis associadas ao biofilme na presença dos compostos estudados. ....	67

## LISTA DE ESQUEMAS

---

Esquema 1 - Diluição dos compostos quitosânico-guanilados para o teste de letalidade em <i>Artemia salina</i> . .....	37
Esquema 2 - Ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i> . .....	38
Esquema 3 - Diluição dos compostos quitosânico-guanilados em caldo Mueller Hinton.....	39
Esquema 4 - Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).....	41
Esquema 5 - Determinação da biomassa total de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> pelo método cristal violeta.....	42
Esquema 6 - Contagem do número de células associadas ao biofilme de <i>P. aeruginosa</i> . .....	44
Esquema 7 - Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias dos compostos quitosânico-guanilados na formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> . .....	45

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1 - Quitosana e grupos substituintes dos compostos quitosânico-guanilados. .....	47
--------------------------------------------------------------------------------------------	----

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIações

---

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

BA – Bactéria aderida

BHI - *Brain Heart Infusion*

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CH<sub>3</sub>COOH – Ácido acético

CL<sub>50</sub> – Concentração letal média

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CMB – Concentração mínima bactericida

CMI – Concentração mínima inibitória

DO – Densidade óptica

FB – Formação de biofilme

FD – Formadora débil

FF – Formadora forte

FM – Formadora moderada

IFB – Índice de formação de biofilme

IPTSP – Instituto de Patologia e Saúde Tropical

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - Dicromato de Potássio

LaBSIMCO - Laboratório de Síntese, Isolamento e Modificação de Compostos Orgânicos

Log<sub>10</sub> - Logaritmo de base 10

MCF-7 - linhagem celular de câncer de mama

Mg<sup>2+</sup> - Magnésio

MH – Mueller Hinton

NaCl 0,9% - Solução fisiológica estéril

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio

NF – Não formadora

OMS – Organização Mundial da Saúde

*Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*

PC – Poço controle

PDGF-AB - fator de crescimento plaquetário

pH – Potencial hidrogeniônico

Quito-guani – Quitosana guanilada

Quito-guani 3a – (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida

Quito-guani 3b – (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina

Quito-guani 3c – (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamidina

Quito-guani 3d – (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato

Quito-guani 3e – (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato

TGF- $\beta$ 1 - fator de crescimento transformador

UEG – Universidade Estadual de Goiás

UFC – Unidade formadora de colônia

UFG – Universidade Federal de Goiás

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
2.1. QUITINA E QUITOSANA .....	17
2.1.1. Atividades biológicas da quitina, quitosana e derivados.....	23
2.2. GUANIDINA, COMPOSTOS GUANILADOS E GUANIDILADOS .....	24
2.3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA .....	27
2.3.1. <i>Formação de biofilme</i> .....	28
2.4. ENSAIO DE LETALIDADE COM <i>ARTEMIA SALINA</i> PARA DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE PRELIMINAR.....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS QUITOSÂNICO-GUANILADOS.....	34
4.2. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE DE COMPOSTOS QUITOSÂNICO-GUANILADOS PELO ENSAIO DE LETALIDADE DE <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	36
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) .....	38
4.4. QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL E DO NÚMERO DE CÉLULAS ASSOCIADAS AO BIOFILME DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	41
4.5. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DOS COMPOSTOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>P. AERUGINOSA</i> .....	44
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS QUITOSÂNICO-GUANILADOS PELO ENSAIO DE LETALIDADE EM <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	47
5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) .....	55
5.3. QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA TOTAL E DO NÚMERO DE CÉLULAS ASSOCIADAS AO BIOFILME DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	63
5.4. EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DOS COMPOSTOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS ASSOCIADAS AO BIOFILME DE <i>P. AERUGINOSA</i> .....	67
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>



## 1. INTRODUÇÃO

---

Os polímeros naturais têm aplicabilidade em diversos campos de pesquisa, um dos quais a síntese de fármacos devido à sua fácil disponibilidade e propriedades como degradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, flexibilidade, renovabilidade e possibilidade de inclusão de sítios reativos para agregar novas funcionalidades. Uma classe proeminente de polímeros são os polissacarídeos naturais, que são biologicamente ativos, geralmente derivados de produtos agrícolas ou crustáceos. Dentre esses polissacarídeos, pode-se destacar a quitina e a quitosana (BILAL; IQBAL, 2019; AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitina é encontrada principalmente em exoesqueletos de crustáceos, insetos e paredes celulares de fungos (PATRULEA *et al.*, 2015; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Já a quitosana pode ser obtida através da desacetilação de seu polímero base a quitina, que é o polissacarídeo mais abundante na natureza após a celulose (ÁVILA-FILHO *et al.*, 2020; BARROS *et al.*, 2016; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

O emprego de quitosana e derivados, em conjunto com outros polímeros sintéticos ou naturais têm sido amplamente estudados para diversos fins, dentre eles, a produção de agentes antimicrobianos eficazes recebeu maior atenção por parte dos pesquisadores (ZARAYNEH *et al.*, 2018; XU; AOTEGEN; ZHONG, 2017; ZILLE *et al.*, 2014).

Micro-organismos patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) podem exibir fenótipos de multi-resistência e pan-resistência aos fármacos, que limitam a eficácia da maioria dos antimicrobianos disponíveis (ZAMPERINI *et al.*, 2017; BOUCHER *et al.*, 2013) e exigem o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos complementares aos disponíveis (JACKSON; CZAPLEWSKI; PIDDOCK, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2012; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A necessidade de compostos poliméricos inovadores com atividade antimicrobiana incentiva o desenvolvimento de pesquisas para a compreensão dos mecanismos de ação e de resistência de micro-organismos (KAMARUZZAMAN *et al.*, 2019; JACKSON; CZAPLEWSKI; PIDDOCK, 2018; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

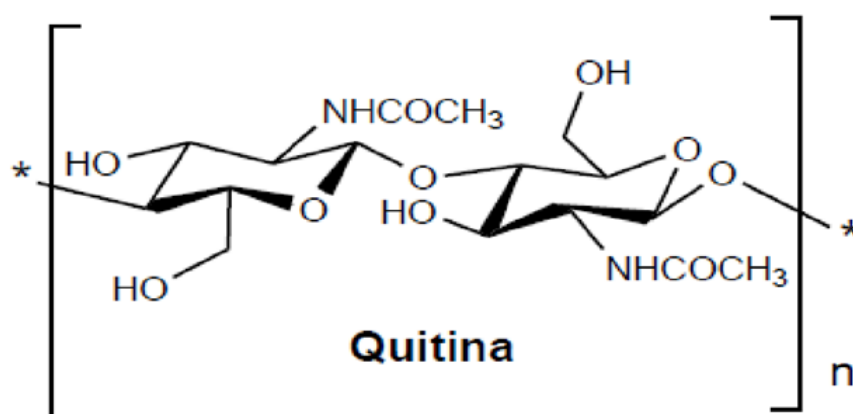
Neste contexto, este trabalho tem por objetivo avaliar as propriedades biológicas da quitosana e de derivados quitosânico-guanilados com a triagem de toxicidade com ensaios de determinação da concentração letal a 50% da população testada (CL<sub>50</sub>) de *Artemia salina* e quanto a atividade antimicrobiana com a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e inibição da formação de biofilme bacteriano por diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Quitina e Quitosana

A quitina (Figura 1), ou poli ( $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4) -N-acetil-D-glucosamina), é um dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza (MONTER-MIRANDA *et al.*, 2016; YOUNES; RINAUDO, 2015) descrito pela primeira vez pelo professor Henri Braconnot em 1811 (CRINI, 2019; DELEZUK, 2009).

Figura 1 - Representação da unidade polimérica da quitina.



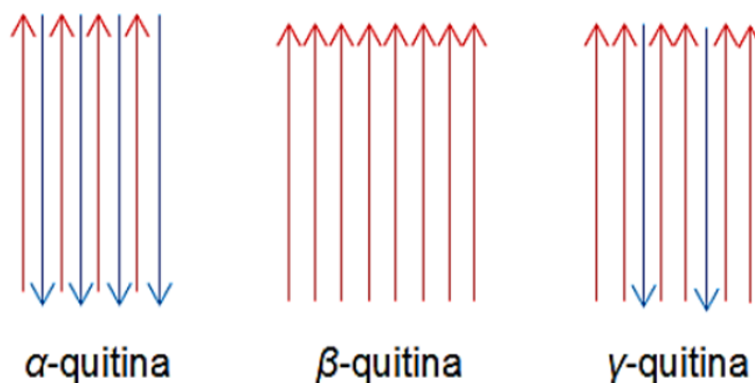
Fonte: Andrade, (2016).

É caracterizada por ser um polissacarídeo, branco, duro, inelástico e nitrogenado, de cadeia linear, considerado um subproduto da indústria pesqueira (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015) com produção anual de  $10^{10}$  a  $10^{11}$  toneladas (RAMESHTHANGAM *et al.*, 2018). É o principal componente estrutural do exoesqueleto de vários animais invertebrados (MORGANTI; COLTELLI, 2019; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010) como camarão, caranguejo e lagosta (crustáceos), moluscos, insetos, pode ser encontrado também em algas, fungos, nematóides e outros organismos relacionados (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Pode ser extraída destas fontes naturais através de um tratamento alcalino

cuja concentração pode ser aumentada para produzir o derivado desacetilado da quitina, quitosana (JONES *et al.*, 2020; SALAMA; SAAD; SABAA, 2016).

Na natureza, a quitina ocorre em três formas cristalinas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - com diferentes orientações de fibrilas (Figura 2) (MONTER-MIRANDA *et al.*, 2016; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). A  $\alpha$  quitina é a forma mais comum encontrada na natureza, possuindo cadeias alinhadas de forma antiparalela, e está presente em exoesqueletos de moluscos, paredes celulares de fungos, no filo *Arthropoda*, *Porifera* e *Bryozoa* (KAYA *et al.*, 2017; AHMED; IKRAM, 2015; BATTISTI; CAMPANA-FILHO, 2008). A forma  $\beta$  é arranjada paralela entre si, e obtida principalmente de moluscos, como as lulas, nas paredes celulares das diatomáceas, e nas estruturas esqueléticas dos cefalópodes, enquanto a forma  $\gamma$  contém duas fitas paralelas e uma antiparalela de quitina, e foi relatada nas fibras do casulo do besouro *Ptinus* e no estômago de *Loligo sp* (BRASSELET *et al.*, 2019; KAYA *et al.*, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

**Figura 2** - Representação das diferentes orientações de fibrilas da quitina.



Fonte: Silva, (2011).

A quitina é um biopolímero biofuncional, sendo biorrenovável, biocompatível, biodegradável, bioabsorvível e não tóxico (KAYA *et al.*, 2017; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015; ; ZENG *et al.*, 2012; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010). Possui propriedades antioxidante, antimicrobiana, anti-oncogênica, cicatrizante, provoca baixa imunogenicidade, é um composto termicamente estável (ISLAM; BHUIYAN; ISLAM, 2017; KAYA, *et al.*, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; KURITA, 2006; RINAUDO, 2006).

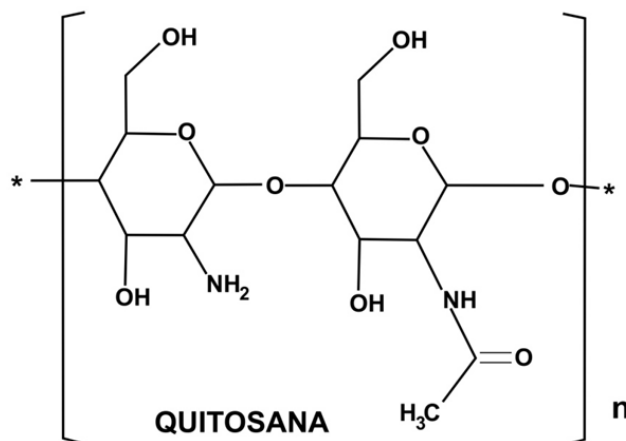
Tais características permitem que a quitina e seus derivados sejam utilizados em inúmeras aplicações economicamente importantes, em uma ampla variedade de campos incluindo: biotecnologia (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), ciência de materiais (STERN, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), microbiologia (RAMESHTHANGAM *et al.*, 2018; STERN, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), sistemas de distribuição de drogas (RAMESHTHANGAM *et al.*, 2018; STERN, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), engenharia de tecidos (RAMESHTHANGAM *et al.*, 2018; STERN, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), agricultura (KAYA *et al.*, 2017; STERN, 2017; ZENG *et al.*, 2012; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), medicina (RAMESHTHANGAM *et al.*, 2018; KAYA *et al.*, 2017), indústria alimentícia (KAYA *et al.*, 2017; STERN, 2017; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), biomédica (STERN, 2017; ZENG *et al.*, 2012), têxteis (KAYA *et al.*, 2017), cosméticos (ARANAZ *et al.*, 2018; KAYA *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2012), tratamento de águas residuais (STERN, 2017; ZENG *et al.*, 2012; KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010), biomimética extrema e biorremediação (KAYA *et al.*, 2017), veterinária, odontologia (ARANAZ *et al.*, 2018), proteção ambiental e produção de papel (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010).

A hidrofobicidade e insolubilidade em solventes orgânicos comuns e solventes aquosos diluídos, afeta a produção de produtos à base de quitina e faz com que ela seja menos empregada em indústrias farmacêuticas (RODRIGUES; SINGH; THAKUR, 2020; ROY *et al.*, 2017; ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015). No entanto, após tratamento químico para a melhora de suas propriedades físico-químicas, biológicas e solubilidade, há interesse científico significativo em seu uso (OUYANG *et al.*, 2017; SALAMA; SAAD; SABAA, 2016; CHEBA, 2011).

A quitosana, antes chamada de quitina modificada, teve sua descoberta atribuída a Rouget em 1859, mas o nome quitosana foi introduzido em 1894 por Felix Hoppe-Seyler (CRINI, 2019; RIEGGER *et al.*, 2018; MUZZARELLI, 1977). Semelhante à quitina, a quitosana (Figura 3) também é um polissacarídeo linear e pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2desoxi-D-glicopiranosose, unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), de composição variável em função do grau residual de acetilação (CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007; DOUSSEAU *et al.*, 2016). É obtida por meio do processo de desacetilação da quitina, mas também

pode ser encontrada em alguns fungos como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (BRASSELET *et al.*, 2019; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

**Figura 3** - Representação da unidade polimérica da quitosana.



Fonte: A autora.

Características como biorrenovabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade, atividade antimicrobiana, dentre outras (ARRUDA; PEREIRA; STEFANI, 2017; CHOI; NAM; NAH, 2016; SALAMA; SAAD; SABAA, 2016; HURT *et al.*, 2015; JIMTAISONG; SAEWAN, 2015) fazem com que a quitosana tenha múltiplas aplicações prospectivas em diversos campos como agricultura (MUJTABA *et al.*, 2020), produtos farmacêuticos (AHMED; ALJAEID, 2016), cosméticos (ARANAZ *et al.*, 2018), indústrias alimentícias (ARNAUD *et al.*, 2017), medicina (VARLAMOV; MYSYAKINA, 2018), medicina veterinária (SENEL; MCCLURE, 2004), biologia (VARLAMOV; MYSYAKINA, 2018), odontologia (ALIASGHARI *et al.*, 2016), indústria biomédica (WU; XU, 2018), indústria têxtil (SHARIATINIA, 2019), dentre outras (PENICHE; ARGUELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008).

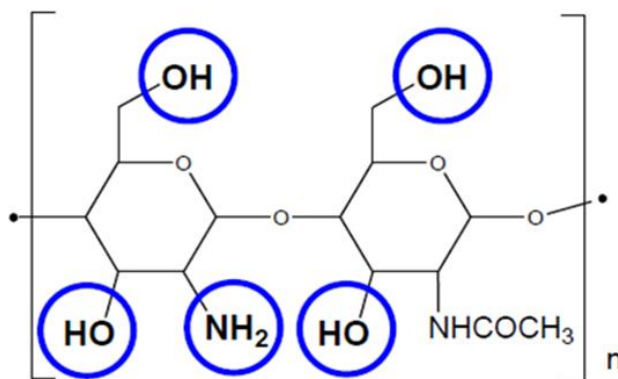
A quitosana não é solúvel em água, mas é solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas (pH < 6,5) o que limita o seu uso em áreas farmacêuticas e médicas (SHARIATINIA, 2018; VIEIRA *et al.*, 2019).

Sua modificação química melhora suas características de solubilidade, físico-químicas e biológicas e pode conferir novas propriedades do grupo apresentado a

eles, o que pode melhorar e ampliar suas formas de uso (DIAS, 2017; OUYANG *et al.*, 2017; SALAMA; SAAD; SABAA, 2016). Essas modificações podem ocorrer nos grupos funcionais hidroxila (O-substituição), aminas (N-substituição), ou em ambos os grupos (N,O-susbstituição) presentes na cadeia polimérica da quitosana (Figura 4) (ÁVILA FILHO *et al.*, 2020).

Dentre essas modificações podemos destacar as reações de quaternização, guanilação *N*-acetilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, *N*-sulfonação dentre outras (BRASSELET *et al.*, 2019; DIAS, 2017; ANDRADE, 2016). A quitosana contém três tipos de grupos reativos (Figura 4), que são os grupos hidroxila primária e secundária e o grupamento amina primária presente em sua estrutura (KIM, 2018; ZHU *et al.*, 2016; ARANAZ; HARRIS; HERAS, 2010). Dentre eles, o grupamento amina é o grupo funcional mais considerável para as atividades biológicas da quitosana (KIM, 2018; HU *et al.*, 2016; SALAMA; SAAD; SABAA, 2016).

**Figura 4** - Representação dos grupos reativos da quitosana.



Fonte: Andrade, (2016).

Certos estudos trazem em sua temática as propriedades, modificações e aplicações da quitina e quitosana (BAKSHI *et al.*, 2020; CHEBA, 2020; HU *et al.*, 2016). Além disso, na literatura encontra-se que os grupos amino protonados da quitosana favorecem sua atividade antimicrobiana, (HU *et al.*, 2016; AHMED; IKRAM, 2015; SARWAR *et al.*, 2015) tornando-a uma alternativa a bactericidas e fungicidas químicos por seu baixo risco para a saúde humana e para o meio ambiente (XU; AOTEGEN; ZHONG, 2017; MONTER-MIRANDA *et al.*, 2016).

Estudos apontam que existem diferentes mecanismos de ação do efeito antibacteriano da quitosana como: (BAKSHI *et al.*, 2020; WANG; XUE; MAO, 2020)

- A interação entre quitosana e as células bacterianas que ocorre por meio da interação eletrostática (LI; ZHUANG, 2020; ROCHA; COIMBRA; NUNES, 2017; HU *et al.*, 2016) entre as cargas positivas da quitosana e as frações negativas da parede celular bacteriana, altera a permeabilidade da membrana externa e provoca lise celular (LI; ZHUANG, 2020; BAKSHI *et al.*, 2018; TACHABOONYAKIAT, 2017; AHMED; IKRAM, 2015).
- A interação da quitosana com o micro-organismo pode afetar a expressão do DNA microbiano inibindo o RNA e a síntese de proteínas, provocando morte celular bacteriana (BAKSHI *et al.*, 2020; MOEINI *et al.*, 2020; BANO *et al.*, 2017; ROCHA; COIMBRA; NUNES, 2017).
- A interação pode ocorrer através da capacidade quelante da quitosana de se ligar seletivamente a íons metálicos como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), dentre outros, que são constituintes essenciais para o crescimento microbiano, inibindo a produção de toxinas, o crescimento microbiano e impedindo o fluxo de nutrientes vitais, levando à morte celular (BAKSHI *et al.*, 2020; HAMED *et al.*, 2020; TAMER *et al.*, 2016).

No entanto, fatores como peso molecular e grau de desacetilação, podem afetar a solubilidade em meio aquoso e a atividade antimicrobiana da quitosana e derivados (VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; CHOI; NAM; NAH, 2016; GONSALVES *et al.*, 2011). Outros fatores intrínsecos e extrínsecos que também podem desempenhar papel significativo na atividade antibacteriana da quitosana e derivados são: pH, a temperatura, solubilidade, tipo de micro-organismo, origem da quitosana, concentração do polímero, produto químico modificado da quitosana (compostos derivados), idade celular, capacidade quelante, dentre outros (LI; ZHUANG, 2020; MOEINI *et al.*, 2020; MATICA; MENGHIU; OSTAFE, 2017; ASSAINAR; NAIR, 2014; KONG *et al.*, 2010).



### 2.1.1. Atividades biológicas da quitina, quitosana e derivados

Beck *et al.* (2019) avaliaram a atividade antimicrobiana da quitosana e a cinética de proliferação celular após a exposição a várias concentrações de quitosana contra a bactéria *Streptococcus iniae* (ARS-98-60). Foi observado que houve atividade antibacteriana em concentrações de 0,1% e superiores com CMI observada em 0,2%, e foi letal em concentrações maiores ou iguais a 0,4%. O modo de ação da quitosana no nível inibitório do crescimento microbiano aparenta depender da interação eletrostática entre a quitosana e a superfície bacteriana com carga oposta.

Essa interação provoca aglutinação e foi observada grosseiramente e macroscopicamente na concentração 0,1%. Após a interação com a superfície celular por meio de adsorção, foi documentado um efluxo de (adenosina trifosfato) ATP intracelular, que sugere que a quitosana provoca lise celular e por fim, morte celular. Esses resultados sugerem que a quitosana pode ser avaliada como uma alternativa natural ao antibiótico contra a infecção de peixes por *S. iniae* (BECK *et al.*, 2019).

Okamoto *et al.* (2003), avaliaram os efeitos da quitina e quitosana na coagulação sanguínea e agregação plaquetária. Como resultado observaram que a quitina e quitosana, diminuíram o tempo de coagulação de maneira dose-dependente e a quitina teve resultado mais forte na agregação plaquetária, além de que foi observado que a quitina e a quitosana promoveram um aumento na liberação do fator de crescimento plaquetário AB (PDGF-AB) e a quitosana provocou aumento no fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), que desempenham papel importante no processo de cicatrização. A combinação desses polímeros pode resultar em boas aplicações na área da saúde para o tratamento de feridas.

Badawi (2008) avaliou a atividade fungicida e inseticida da quitosana e derivados heterocíclicos contra os fungos patogênicos do solo *Fusarium oxysporum*, *Pythium debaryanum* e *Pyricularia grisea* que foram fornecidos pelo laboratório de microbiologia do departamento de Fitopatologia da Faculdade de Agricultura da

Universidade de Alexandria (Egito), e a larva de algodão *Spodoptera littoralis*, que são considerados pragas agrícolas, foram cedidas pelo departamento de Entomologia da Faculdade de Agricultura da Universidade de Alexandria (Egito). Os autores observaram melhor ação dos derivados do que a quitosana contra os organismos estudados, sugerindo que tais compostos poderão ser úteis não só no campo agrícola, mas também em outras áreas como a biomédica.

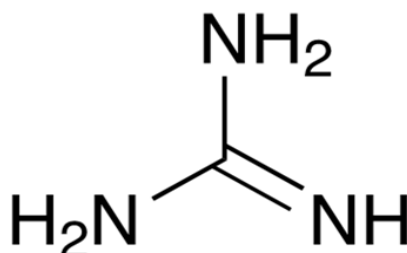
Vasyukova *et al.* (2010), avaliaram a atividade imunomoduladora da quitosana e de derivados oligômeros de quitina-quitosana modificados com ácido salicílico, contra o oomiceto *Phytophthora infestans*((Mont). de Bary) e observaram melhores resultados de proteção e estímulo de reparação do tecido da batata contra a *P. infestans* dos derivados do que a quitosana, tornando promissora a busca de novos eliciadores entre os derivados da quitosana.

Quando se observa os resultados de pesquisas anteriores, nota-se o quão significativos são esses resultados, tanto para a compreensão do mecanismo antimicrobiano da quitosana quanto no desenvolvimento de uma nova geração de agentes antimicrobianos (LI; ZHUANG, 2020).

## 2.2. Guanidina, compostos guanilados e guanidilados

As guanidinas (Figura 5) são uma classe importante de compostos orgânicos nitrogenados, frequentemente encontrados na natureza, adequados para o desenvolvimento de fármacos e amplamente utilizados como bases fortes (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2019; FRINDY *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2010).

Figura 5 - Representação da unidade polimérica guanidina.



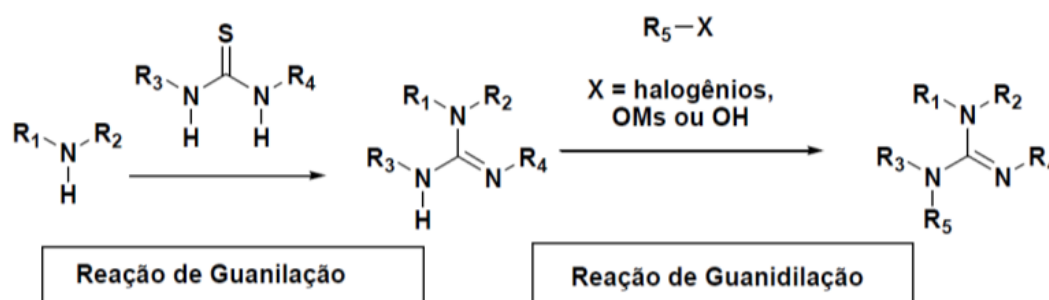
Fonte: Adaptado de Ishikawa, (2009).

Essa característica básica permite que a guanidina forme uma interação não covalente com alguns componentes carregados negativamente, como fosfatos na

superfície de células microbianas, metais e carboxilatos, além de serem muito empregados na química orgânica, sintética e medicinal devido ao seu envolvimento na interação entre complexos enzima/substrato, por sua natureza hidrofílica, alta atividade antimicrobiana, eficiência biocida e atoxicidade (QIN; LI; GUO, 2020; GUPTA, 2020; BERLINCK *et al.*, 2017; MA; DE; CHEN, 2015; TAN; COLES, 2014; QIAN *et al.*, 2008).

A reação de guanilação ocorre quando o átomo de nitrogênio da amina é incorporado à tioureia fornecendo a guanidina. Já a reação de guanidilação ocorre quando o esqueleto estrutural da guanidina é alterado pela substituição de um ou mais grupos presente em sua estrutura (Figura 6) (GOMES, 2014).

**Figura 6** - Representação das reações de guanilação e guanidilação.



Fonte: Gomes (2014).

Muitos compostos naturais e sintéticos contendo esse grupo funcional têm demonstrado uma variedade de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antiprotozoária, dentre outras (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2019; PATTARAWARAPAN *et al.*, 2016; SACZEWSKI; BALEWSKI, 2013; HU *et al.*, 2007). O cátion guanidínio pode interagir com espécies aniônicas através da combinação de ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Além disso, a guanidina possui características doadoras e aceitadoras para nucleófilos e eletrófilos (HOSOYA; ODAGI; NAGASAWA, 2018).

Quando fixada na quitosana, o grupo guanidina pode introduzir carga positiva na estrutura polimérica, o que resultaria em melhor atividade antimicrobiana e melhora da solubilidade aquosa em pH neutro (SALAMA; SAAD; SABAA, 2016; SAHRIAH *et al.*, 2015).

Polímeros contendo o grupo guanidina com atividade antimicrobiana e antifúngica têm sido estudados nos últimos anos como potenciais agentes médicos, fitossanitários e antissépticos (ESCAMILLA-GARCÍA *et al.*, 2017; QIAN *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2007).

Salama, Saad e Sabaa (2016), sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de quitosana reticulada biguanidina, carregada com nanopartículas de prata e cloridrato de quitosana biguanidina, contra os patógenos *Streptococcus pneumoniae* (RCMB 010010), *Bacillus subtilis* (RCMB 010067), *Escherichia coli* (RCMB 010052), *Aspergillus fumigatus* (RCMB 02568), *Geotricum candidum* (RCMB 05097) e *Syncephalastrum recemosum* (RCMB 05922) e a citotoxicidade foi avaliada contra a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).

Observaram que os compostos obtiveram excelente atividade antimicrobiana contra os patógenos testados, sendo intensificada a atividade nos compostos que continham as nanopartículas de prata. O ensaio de citotoxicidade revelou que os compostos apresentaram baixa toxicidade para as células do câncer de mama (MCF-7) (SALAMA, SAAD E SABAA, 2016).

Sahariah *et al.* (2015), sintetizaram e avaliaram a atividade antimicrobiana de derivados quitosânico guanidilados e derivados com trimetilamônio contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Observaram uma melhora na atividade antibacteriana dos compostos ativos à medida que o grau de substituição na estrutura polimérica era maior e a distância do substituinte na cadeia polimérica era menor.

Outro fator observado foi com relação a natureza catiônica dos substituintes, que também influenciou a resposta antimicrobiana dos compostos. O desenvolvimento de compostos potencialmente biocompatíveis com propriedades antimicrobianas, pode resultar não somente em aplicações *in vivo*, mas também em aplicações externas industriais (SAHARIAH *et al.*, 2015).

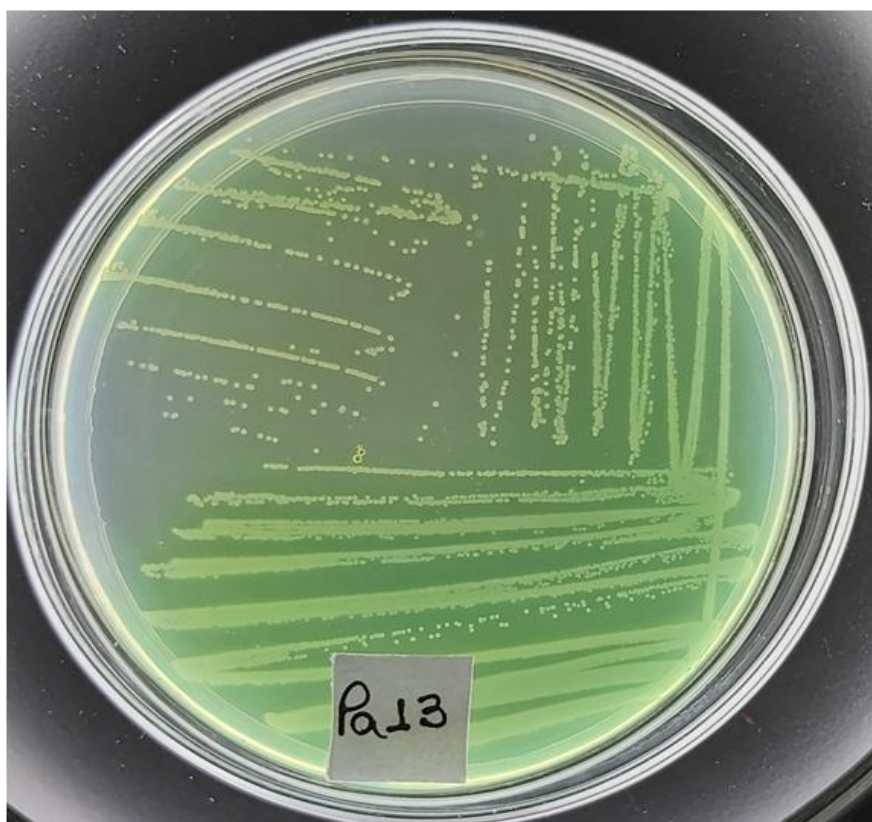
Salama, Hasanin e Hesemann (2020), sintetizaram e avaliaram as propriedades antimicrobianas de quitosanas, contendo grupo guanidínio contra as cepas *Escherichia coli* (NCTC-10416), *Pseudomonas aeruginosa* (NCID- 9016), *Staphylococcus aureus* (NCTC-7447), *Bacillus subtilis* (NCID-3610) e *Candida*

*albicans* (NCCLS 11) e observaram que todos os derivados exibiram alta atividade antimicrobiana em comparação com a quitosana, abrindo novas perspectivas de uso em biomateriais, para os compostos derivados de quitosana guanilada.

### 2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (Figura 7) é um patógeno Gram-negativo, não fermentador, aeróbio (ROSHANI-ASL *et al.*, 2018; BAHMANI *et al.*, 2016), pertencente à família *Pseudomonadaceae* (BERNAL-ROSAS; OSORIO-MUÑOZ; TORRES-GARCÍA, 2015). Embora seja comumente encontrada como isolado ambiental, é também um patógeno oportunista capaz de colonizar plantas e hospedeiros mamíferos (HA; O'TOOLE, 2015).

**Figura 7** - Aspecto macroscópico do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* em ágar cetrímide.



Fonte: A autora.

Dentre as espécies de *Pseudomonas* SSP. a *P. aeruginosa* é considerada a de maior relevância clínica e epidemiológica, estando frequentemente associada a infecções nosocomiais principalmente em pacientes imunocomprometidos (JUAN; PEÑA; OLIVER, 2017; STREETER; KATOULI, 2016; RIVAS *et al.*, 2015). A versatilidade nutricional, necessidades nutricionais mínimas para o crescimento,

tolerância de vida a ambientes hostis e resistência relativa a agentes antimicrobianos contribuem para que a *P. aeruginosa* obtenha sucesso com seu papel como agente oportunista (GONÇALVES, 2015; GALES *et al.*, 2001).

É responsável por 10 a 15% deste tipo de patologias em todo o mundo (GUEVARA; SAHAI; TEDESCO-MAIULLARI, 2015). As infecções podem ocorrer agudamente devido à produção de toxinas, cronicamente devido à formação de um biofilme espesso, ou podem ocorrer com ambas as formas, que combinadas podem causar septicemia (SILVA *et al.*, 2016). Em pacientes gravemente doentes, a *P. aeruginosa* contribui com 3% a 15% das infecções da corrente sanguínea, com taxa de mortalidade de 27% a 48%. Apesar dos recentes avanços na terapia, a bacteremia por *P. aeruginosa* é fatal em mais de 20% dos casos e mais de 50% das mortes acontecem em poucos dias após a infecção (PRAGASAM *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a prevalência de infecções causadas por *P. aeruginosa* mostrou um aumento significativo, uma vez que essa bactéria tem a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos (HORCAJADA *et al.*, 2019; GUEVARA; SAHAI; TEDESCO-MAIULLARI, 2015).

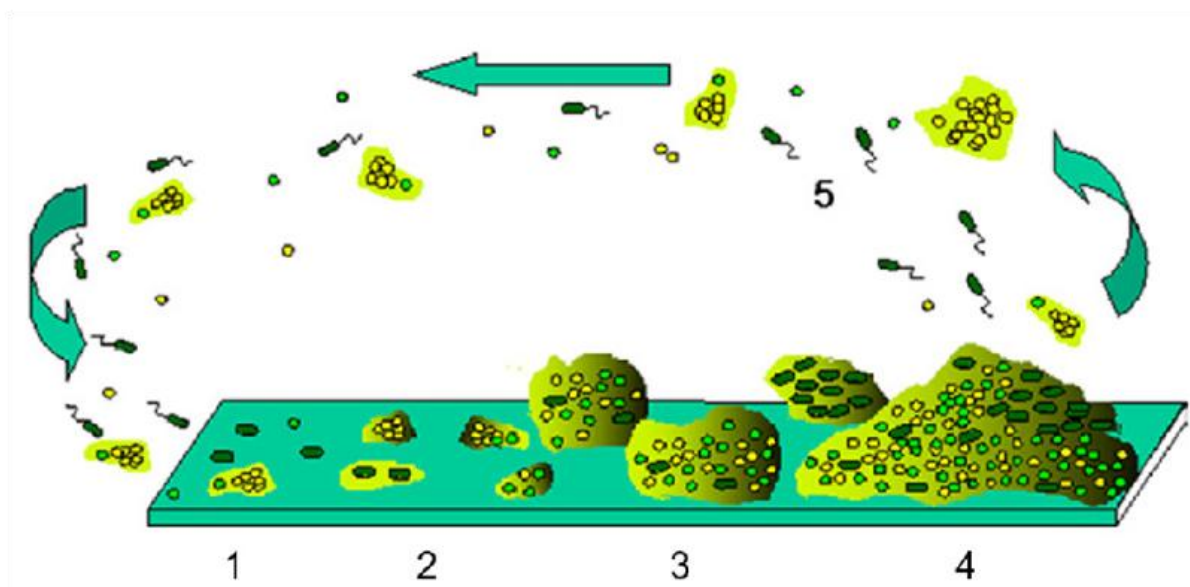
Do ponto de vista evolutivo, as bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência por meio de mutações em genes cromossômicos, frequentemente associadas ao mecanismo de ação do composto e por aquisição de DNA codificando a resistência através da transferência horizontal de genes (MUNITA; ARIAS, 2016; BLAIR *et al.*, 2015). Entre os seus mecanismos de resistência, estão a baixa permeabilidade da membrana externa da parede celular, a presença de bombas de efluxo, modificação do sítio de ligação do antibiótico, a modificação de vias metabólicas internas e produção de enzimas, tais como beta-lactamases, carbapenemases e metalobetalactamases (NGUYEN *et al.*, 2018; RIVAS *et al.*, 2015).

### **2.3.1. Formação de biofilme**

A capacidade de formar um biofilme é uma característica comum a uma variedade de micro-organismos (HA; O'TOOLE, 2015). A *P. aeruginosa* é um importante patógeno oportunista humano e organismo modelo representativo para

estudo de biofilme (KIM; LEE, 2016). O biofilme (Figura 8) é um agrupamento de bactérias que vivem em superfícies distintas e seu processo pressupõe cinco fases diferentes: (1) Adesão inicial de células individuais ou aglomerados de bactérias do biofilme que foram destacadas; (2) Adesão microbiana mediada pela produção de exopolissacarídeos (substâncias poliméricas extracelulares); (3) Desenvolvimento e expansão da arquitetura do biofilme; (4) Biofilme maduro quando o biofilme está em (pseudo) estado estacionário; (5) Dispersão de células sésseis que poderão ocasionar infecções ou formar biofilmes em outros locais (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; STOODLEY *et al.*, 2013; STOODLEY *et al.*, 2002).

**Figura 8** - Etapas da formação de biofilme.



Fonte: Stoodley *et al.* (2013).

A matriz de exopolissacarídeo fornece ao biofilme, proteção mecânica e bioquímica que viabiliza as condições necessárias para atenuar a atividade dos fármacos, tornando esta estrutura microbiana altamente resistente à antibioticoterapia e permite que as bactérias sobrevivam em condições adversas (SOUSA *et al.*, 2017; VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

Usando um processo de comunicação conhecido como *quorum sensing*, as bactérias segregam e detectam pequenas moléculas sinalizadoras orgânicas, para monitorar sua densidade populacional, virulência e para coordenar a conexão da superfície e a subsequente formação de biofilme (ABOUELHASSAN *et al.*, 2019).

Diante das limitações dos antibióticos, existe uma necessidade crescente de descoberta e desenvolvimento de agentes antimicrobianos com propriedades inovadoras no controle e tratamento eficiente de doenças infecciosas bacterianas (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015).

Os polímeros antimicrobianos à base de quitosana são interessantes devido à baixa propensão dos micro-organismos desenvolverem resistência a esses compostos e têm se mostrado como agentes promissores no tratamento e prevenção de diversas doenças. Para facilitar seu desenvolvimento, é necessário ter uma maior compreensão das propriedades biológicas dos patógenos e das células dos hospedeiros (REN *et al.*, 2017; SETTE-DE-SOUZA *et al.*, 2015).

Derivados de quitosana, carboximetilquitosana, guanidina / sal biguanida possuem atividades antibacterianas contra vários micro-organismos e têm sido associados a diferentes polímeros antimicrobianos (SHARIATINIA, 2018; REN *et al.*, 2017).

#### **2.4. Ensaio de letalidade com *Artemia salina* para determinação da toxicidade preliminar**

*Artemia salina* (Figura 9) é um microcrustáceo da ordem *Anostraca* (sem carapaça) de água salgada utilizada como alimento vivo para peixes, e seus ovos são facilmente encontrados em lojas de aquários (SIQUEIRA *et al.*, 1998).



**Figura 9** - Foto de náuplio de *Artemia salina*.



Fonte: Munteanu; Dumitrascu, (2011).

O ciclo da *Artemia sp.* têm início quando em ambiente natural e em determinadas épocas do ano, as artêmias produzem cistos que flutuam na superfície da água e que são transportados pela ação do vento e das ondas. Estes cistos são metabolicamente inativos (estado de diapausa) e não se desenvolvem enquanto forem mantidos secos. No entanto, após a imersão em água salgada, os cistos se hidratam, e retomam o metabolismo interrompido. Depois de aproximadamente 20 h, a membrana externa do cisto estoura e o embrião aparece e, enquanto o embrião é mantido debaixo da capa vazia (estágio de sombrinha), ocorre o desenvolvimento do náuplio. Em um curto espaço de tempo, a membrana de eclosão se rompe e o náuplio (primeiro estágio larval) nasce. O desenvolvimento de náuplio até a fase adulta é de aproximadamente oito dias (CORRÊA; PENAFORT, 2011).

A *Artemia salina* consegue tolerar grandes quantidades de sal (até 300 gramas de sal por litro de água) e consegue sobreviver em água com alta deficiência de oxigênio. Além disso, possuem a capacidade de reduzir a pressão osmótica da hemolinfa pela excreção de NaCl contra o gradiente de concentração e também foi demonstrado que desenvolveu um mecanismo para manter a hemolinfa hipotônica extrema em meios salinos extremos (MUNTEANU; DUMITRASCU, 2011).

A casca dos cistos é formada por 3 estruturas: o córion que atua protegendo os cistos contra rupturas mecânicas e radiação UV, a membrana cuticular externa

protege o embrião da penetração de moléculas maiores que as de CO<sub>2</sub> e atua como um filtro, atuando na permeabilidade, e a membrana cuticular embrionária que consiste em uma capa altamente elástica que se transforma em membrana de eclosão durante o processo de incubação (CORRÊA; PENAFORT, 2011).

A sua fácil manutenção em condições de laboratório faz com que seja utilizada em bioensaios de toxicidade (SIQUEIRA *et al.*, 1998). O teste consiste na exposição dos náuplios durante 24 a 48 horas, a concentrações crescentes do composto que se pretende avaliar, com a posterior análise do número de organismos mortos ao final do período de exposição e o cálculo da concentração letal a metade da população exposta (PIMENTEL *et al.*, 2011).

O grau de toxicidade de compostos bioativos para as larvas de *Artemia salina* podem ser usados como triagem preliminar rápida e de baixo custo no estudo de compostos naturais e de síntese (RAHMAN; CHOUDHARY; THOMSON, 2005).

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade preliminar e atividade antimicrobiana de compostos quitosânico-guanilados contra diversas cepas de *P. aeruginosa*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Verificar a toxicidade de compostos quitosânico-guanilados pelo ensaio de letalidade em *Artemia salina*;
- Determinar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida dos compostos;
- Avaliar a atividade inibitória dos compostos quitosânico-guanilados em concentrações subinibitórias na formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

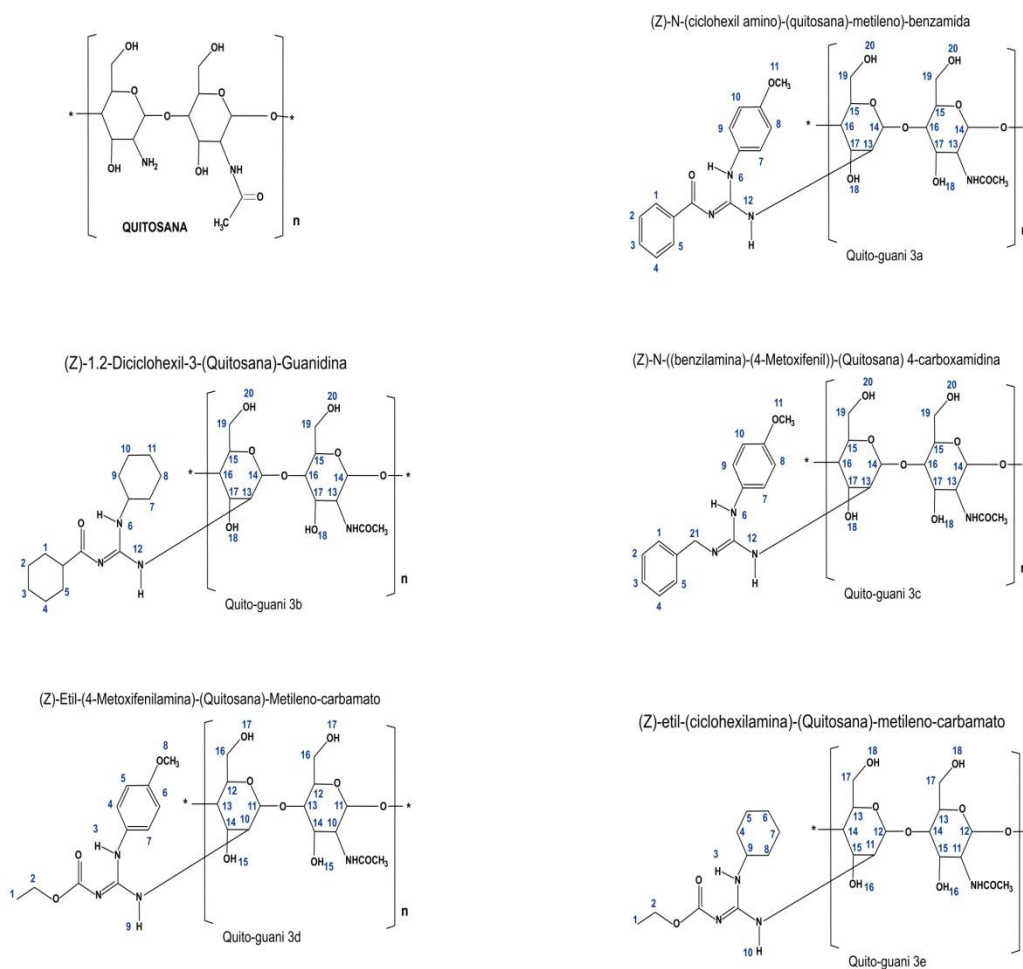
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. Obtenção dos compostos quitosânico-guanilados

A quitosana foi adquirida da empresa *Sigma Aldrich* (Lote: #SLBF5331V - % GA de 25% e massa molar viscosimétrica de  $155000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), e os derivados quitosânico-guanilados foram sintetizados no Laboratório de Síntese, Isolamento e Modificação de Compostos Orgânicos - LaBSIMCO / UEG campus central Anápolis, por Andrade (2016) (Figura 10).

**Figura 10** - Representação estrutural da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados.



Fonte: A autora.

As soluções estoque da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados foram preparadas assepticamente com a dissolução de 50mg de cada composto em 10 mL de ácido acético a 1% (Sigma) sob agitação magnética durante 16 a 24h. Após a dissolução completa dos compostos, o pH foi ajustado com uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  para a realização dos bioensaios com as concentrações 2,5; 1,25; 0,625 e  $0,3125 \text{ mg.mL}^{-1}$  de cada composto. Ao final, o pH foi aferido com auxílio de pHmetro digital (Kasvi, Brasil) e a solução permaneceu sob agitação por 15 minutos até sua utilização.

Andrade (2016) relata em seu trabalho que os compostos poliméricos foram solubilizados em ácido acético 1% e neutralizados com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  até o pH entre 7 e

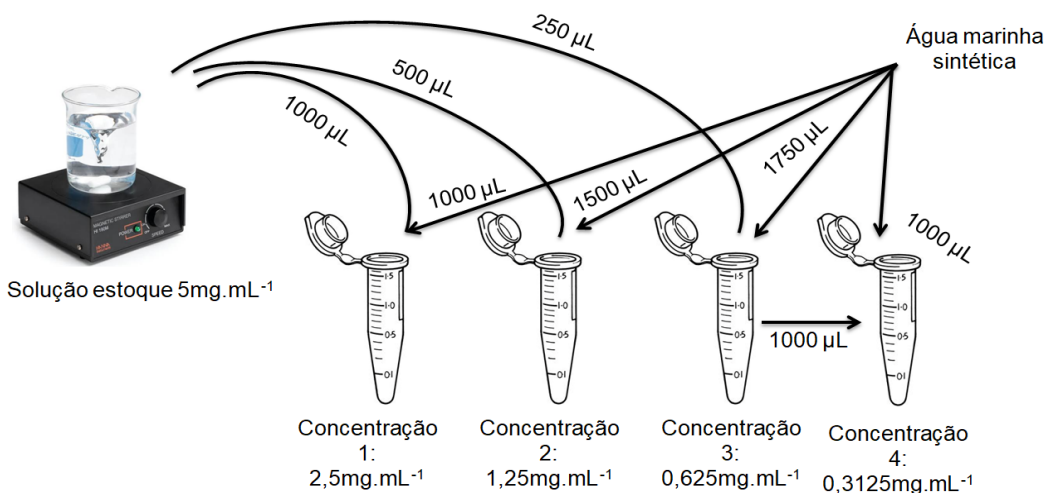
8. Entretanto, foi constatado que nessa faixa de pH, os compostos poliméricos precipitaram ou não se dissolveram completamente. Portanto, os autores optaram por trabalhar numa faixa de pH mais baixa, sendo 5,5 para os compostos 3b e 3C, uma vez que estes compostos são de difícil solubilização, e pH 6 para os demais compostos testados. Além disso, foi verificado que a neutralização do pH dos compostos não induziu a morte dos micro-organismos testados.

#### **4.2. Avaliação preliminar da toxicidade de compostos quitosânico-guanilados pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina***

Foi utilizado o método descrito por Molina-Salinas e Said-Fernandez, (2006) com pequenas modificações, para determinar a toxicidade dos compostos pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*. Neste teste foi utilizado meio de água marinha sintética preparado pela dissolução de sal marinho ( $36 \text{ g.L}^{-1}$ ) em água destilada, suplementado com extrato de levedura ( $6 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e esterilizado em vidro boeco próprio para autoclave. Foram pesados 0,3 g de cistos de *Artemia salina* e incubados por 36 horas em 500 mL do meio com iluminação artificial, com temperatura ambiente e oxigenação constante. Após a eclosão, os náuplios foram atraídos por fonte de luz, pipetados e transferidos para uma placa de Petri com 5 mL de meio fresco.

O teste foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 10 indivíduos com 100  $\mu\text{L}$  de água marinha sintética e 100  $\mu\text{L}$  de compostos dissolvidos em água marinha sintética nas concentrações de 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125  $\text{mg.mL}^{-1}$ . A placa permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas em iluminação constante. O Esquema 1 ilustra como foi realizada a diluição nas concentrações testadas.

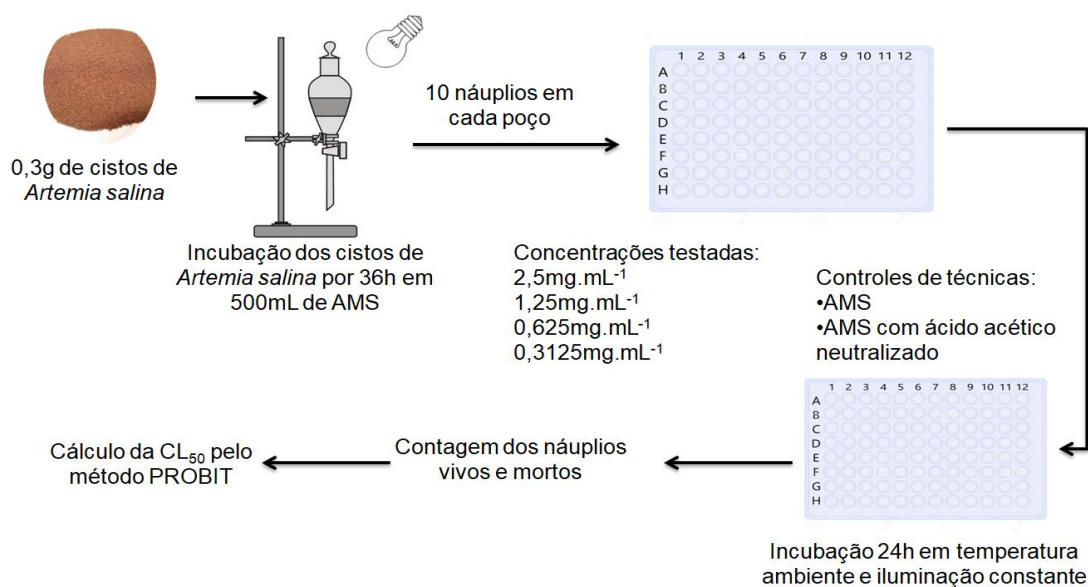
**Esquema 1** - Diluição dos compostos quitosânico-guanilados para o teste de letalidade em *Artemia salina*.



Fonte: A autora.

Foram incluídos nos ensaios controles de viabilidade com poços sem compostos, de letalidade utilizando diluições de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg.mL<sup>-1</sup> de dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) e controle de técnica utilizando ácido acético 1% (CH<sub>3</sub>COOH) neutralizado com carbonato de sódio a 1 Mol.L<sup>-1</sup> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) em pH 6,0 - 5,5 nas concentrações 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% para excluir possíveis interferências na acidificação necessária para a dissolução dos compostos testados.

Os resultados permitiram o cálculo da CL<sub>50</sub> pelo método gráfico para dose resposta – Próbito, no programa *Statistica*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e de maneira independente. O Esquema 2 ilustra como foi realizado o teste de toxicidade dos compostos pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*.

**Esquema 2 - Ensaio de letalidade em *Artemia salina*.**

Fonte: A autora.

Legenda:

**AMS** = água marinha sintética

**K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>** = Dicromato de potássio

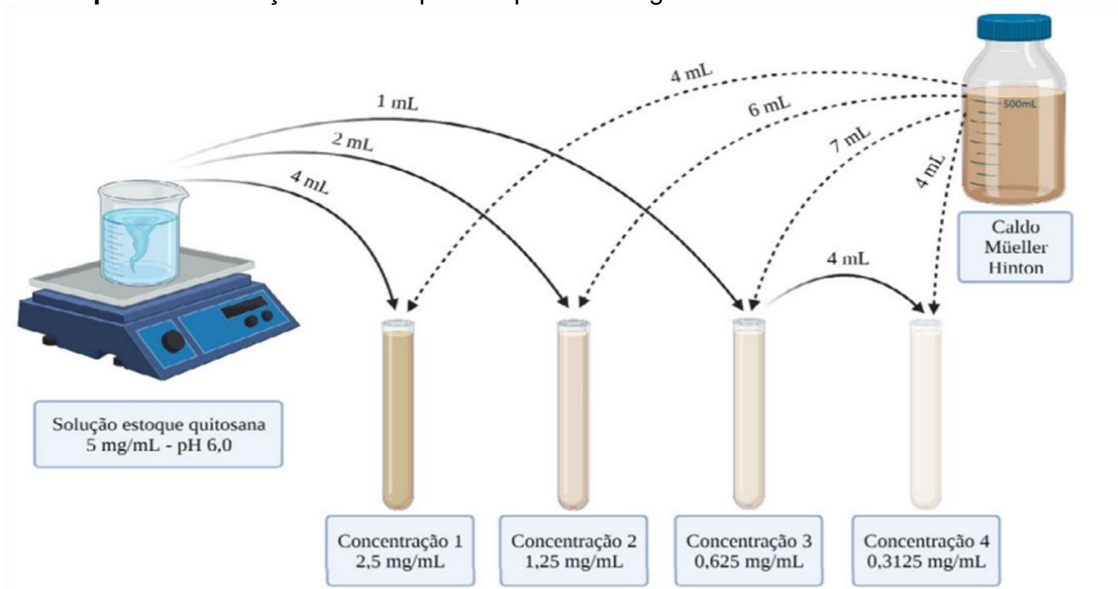
### 4.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB)

Os compostos foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Este ensaio foi realizado conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testes de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias (CLSI, 2016).

A diluição da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados em caldo Mueller Hinton (MH) foi realizada em capela de fluxo laminar devidamente limpa e desinfetada. Os compostos testes foram diluídos para a obtenção das concentrações 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 e 0,15625  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Esquema 3). Os tubos foram agitados até a completa homogeneização da solução e foram incluídos controles com ácido acético neutralizado com pH na faixa de 6,0 – 5,5 para excluir possíveis interferências na acidificação necessária para a dissolução dos compostos testados. Os controles com ácido acético neutralizado seguiram a mesma sequência de diluição.



**Esquema 3** - Diluição dos compostos quitosânico-guanilados em caldo Mueller Hinton.



Fonte: A autora.

Os micro-organismos foram mantidos conforme descrito por Silva, Costa e Reche (2008) com pequenas modificações. Inicialmente, as cepas foram repicadas em ágar cetrimide pela técnica de esgotamento por estrias e incubadas a 35,5 °C por 24 horas a fim de obter colônias isoladas. Em seguida, 3 a 5 colônias isoladas típicas foram transferidas para um tubo com 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com 20 % de glicerol, seguidas de homogeneização em agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos, após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35,5 °C. Em seguida, foram transferidas frações de 1 mL para microtubos tipo Eppendorf esterilizados e devidamente rotulados. Posteriormente as frações foram armazenadas a 8 °C por sete dias e congeladas em *freezer* a - 20 °C.

Um total de 13 *Pseudomonas aeruginosa* foram testadas, sendo 11 isolados clínicos gentilmente cedidos pela prof<sup>a</sup>. Lilian Carneiro do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, IPTSP/UFG e as cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 mantidas nos Laboratórios de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás (UEG) foram reativadas em ágar Mueller Hinton (MH), pela técnica de esgotamento por estrias. As placas foram semeadas com auxílio de alça bacteriológica e em seguida incubadas a 35,5 °C por 24 horas. Os inóculos bacterianos foram preparados, com a suspensão de colônias em tubo com 4,5mL de

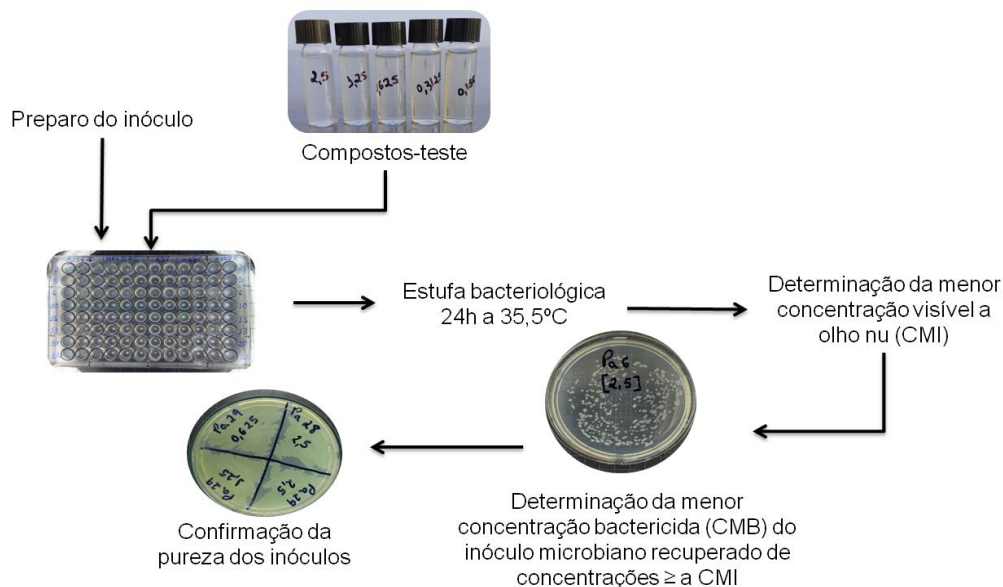
solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala nefelométrica de McFarland.

Em seguida, foram transferidos 100µL do inóculo para tubo com 9,9mL de caldo Mueller Hinton, obtendo-se assim a concentração de células de  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (ufc) por mL<sup>-1</sup>. Logo após 50µL desse caldo inoculado foi adicionado nos poços da microplaca de poliestireno seguido da adição de 50µL dos compostos nas concentrações previamente descritas, obtendo-se assim a concentração final de  $1,5 \times 10^5$  ufc por poço. Após as inoculações as microplacas foram incubadas por 24 horas a 35,5°C. Ao final do período de incubação, foram realizadas leituras visuais do crescimento e a confirmação de ausência de crescimento nos poços controle de esterilidade não inoculados. Após incubação das microplacas a 35,5 °C durante 24 horas, a CMI foi determinada de forma visível como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano da amostra em mg.mL<sup>-1</sup>. Os testes foram acompanhados de controle de viabilidade dos micro-organismos na ausência dos compostos testados, controle de esterilidade e controle de técnica com gentamicina (*Sigma Aldrich*) (CLSI, 2016). Adicionalmente foram testadas concentrações de 0,5, 0,25 e 0,125 % de ácido acético neutralizado com pH na faixa de 6,0 – 5,5 para excluir possíveis interferências na acidificação necessária para a dissolução dos compostos testados.

Após a determinação da CMI, foi realizado o teste de concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos. As CMB foram avaliadas com a transferência de 100 µL do caldo MH dos poços sem turvação visível a partir da CMI de cada composto para cada cepa em placas de Petri contendo ágar MH para a verificação da ação bactericida dos compostos. As bactérias com crescimento na placa de ágar MH na CMB foram transferidas através da alça de platina para placas contendo ágar cetrimide para exclusão do crescimento de micro-organismos contaminantes no ensaio.

Todos os testes foram realizados em triplicata. O experimento do ensaio de determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida está esquematizado no Esquema 4 abaixo.

**Esquema 4** - Ensaio da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).



Fonte: A autora.

**Legenda:**

**CMI** = Concentração mínima inibitória

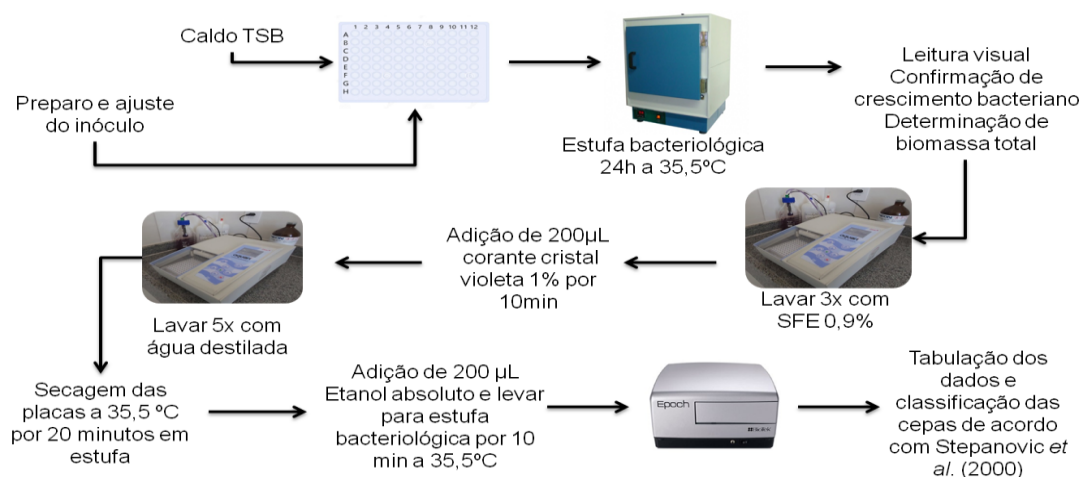
**CMB** = Concentração mínima bactericida

#### 4.4. Quantificação da biomassa total e do número de células associadas ao biofilme de *P. aeruginosa*

A biomassa total dos biofilmes foi avaliada pelo método do cristal violeta descrito por Stepanović *et al.* (2000) com algumas modificações. Cada uma das 13 *P. aeruginosa* foi ressuspensa em tubo com 4,5mL de solução fisiológica estéril (SFE 0,9%) até a obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, 0,1mL da suspensão bacteriana foi transferida para outro tubo com 9,9mL de caldo *trypticase soy broth* (TSB) e após, 50 $\mu$ L do inóculo ajustado foram colocados em poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo chato contendo 50 $\mu$ L de caldo TSB fresco por poço. O inóculo inicial foi ajustado para aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (ufc) por poço. Após as inoculações as microplacas foram incubadas por 24 horas a 35,5°C.

Ao final do período de incubação, foram realizadas leituras visuais do crescimento e a confirmação de ausência de crescimento nos poços controle de esterilidade não inoculados. O processamento das placas foi realizado segundo metodologia descrita por Naves *et al.* (2008) com modificações. O caldo TSB foi retirado e os poços foram lavados três vezes com 150  $\mu\text{L}$  com SFE 0,9% em lavadora automática de microplacas Aquari® (MA 615, Brasil) para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do corante cristal violeta 1% nas placas por 10 minutos. Após este período, o corante foi desprezado e os poços lavados cinco vezes com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, com o descarte do volume total e secagem das placas a 35,5 °C por 20 minutos em estufa. Posteriormente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (Neon) em cada poço para a coloração das bactérias aderidas e a placa incubada durante 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) dos poços a 492 nm no espectrofotômetro de microplacas BioTech Epoch™. O experimento está esquematizado abaixo:

**Esquema 5** - Determinação da biomassa total de biofilme de *P. aeruginosa* pelo método cristal violeta.



Fonte: A autora.

As leituras de DO obtidas permitiram a classificação das cepas quanto à formação de biofilme em quatro categorias: não formadora (NF), formadora débil (FD), formadora moderada (FM) e formadora forte (FF) de acordo com as seguintes fórmulas (Stepanović *et al.* 2000):

$$NF = DO_{BA} \leq DO_{PC}$$

$$FD = DO_{BA} > DO_{PC} \leq 2x DO_{PC}$$

$$FM = DO_{BA} > 2x DO_{PC} \leq 4x DO_{PC}$$

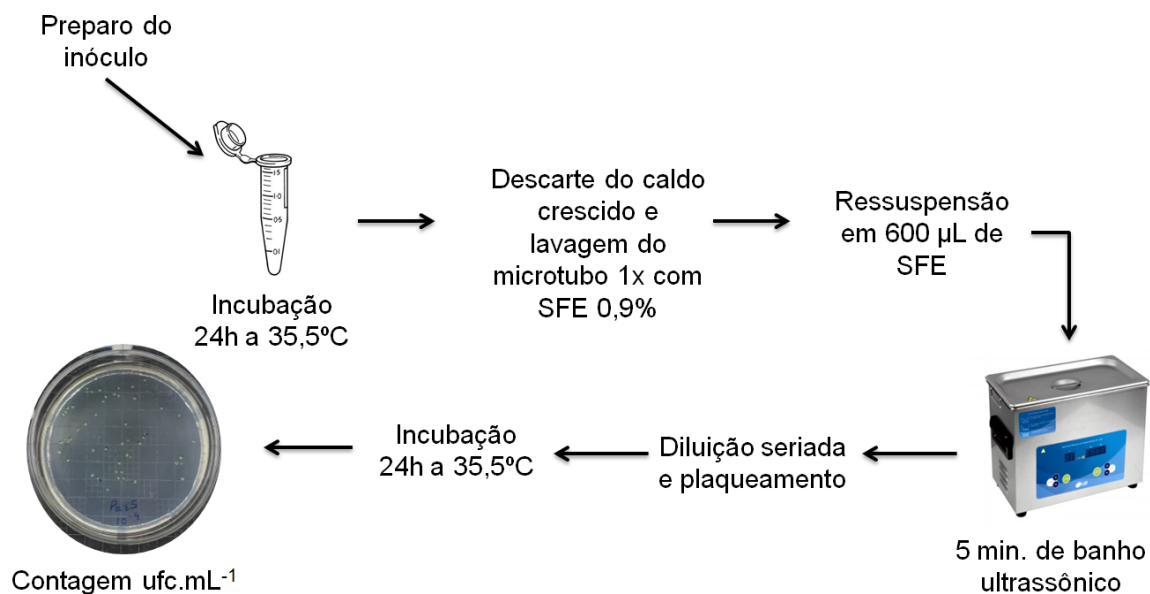
$$FF = DO_{BA} > 4x DO_{PC}$$

Sendo que  $DO_{PC}$  = densidade óptica do poço controle e  $DO_{BA}$  = densidade óptica da bactéria aderida.

Para realização da contagem de células associadas ao biofilme os 13 inóculos bacterianos foram ajustados conforme a metodologia descrita para o estudo da determinação da biomassa total pelo método cristal violeta. Posteriormente, 600  $\mu$ L dos inóculos ajustados foram transferidos para microtubos Eppendorf que foram incubados a 35,5°C durante 24 horas. Após a incubação, os caldos crescidos foram retirados e os microtubos lavados, assepticamente, com 600  $\mu$ L de SFE 0,9%. Em seguida, foram adicionados 600  $\mu$ L de SFE 0,9% nos microtubos e estes foram submetidos à sonicação em banho de ultrassom a 40KHz (Ultronique Q 5.9/40A, Indaiatuba, São Paulo) por 5 minutos em temperatura ambiente, para o desprendimento dos micro-organismos associados ao biofilme aderido à parede.

A suspensão bacteriana foi diluída e plaqueada em ágar cetrímide para contagem das células bacterianas associadas ao biofilme. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 35,5°C e após esse período foi realizada a contagem das colônias com o contador de colônias Marconi MA-6000. Foram incluídos controles de esterilidades para descartar contaminação do caldo TSB. O esquema a seguir mostra o esquema da contagem de células na formação de biofilme.

**Esquema 6** - Contagem do número de células associadas ao biofilme de *P. aeruginosa*.



Fonte: a autora.

Legenda:

**SFE 0,9%** = Solução fisiológica estéril a 0,9%

**ufc** = unidade formadora de colônia

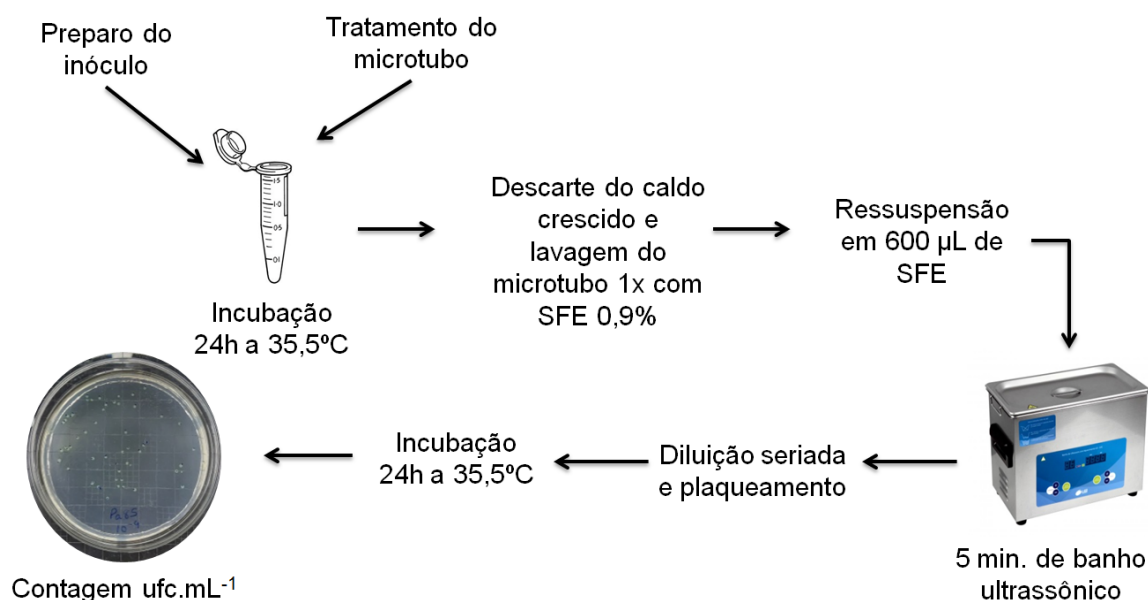
#### 4.5. Efeito de concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilme por *P. aeruginosa*

Um total de 9 *P. aeruginosa*, sendo 3 isolados de cada grupo, foi selecionado para avaliar o impacto das concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilme.

Os compostos foram dissolvidos conforme descrito previamente na etapa de dissolução da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados. Posteriormente, 600 µL dos compostos foram transferidos para microtubos Eppendorf que foram incubados em estufa por 24 horas a 35,5°C. Em seguida, os compostos foram descartados e 600 µL dos inóculos bacterianos, obtidos conforme descrito nos ensaios de formação de biofilme, foram transferidos para os microtubos que foram novamente incubados por 24 horas a 35,5°C.

Logo após esse período, o caldo com crescimento bacteriano foi retirado e os microtubos, lavados assepticamente uma vez com 600  $\mu\text{L}$  de SFE 0,9%. Em seguida, os microtubos foram preenchidos com 600  $\mu\text{L}$  de SFE 0,9% e submetidos à sonicação em banho de ultrassom a 40KHz (Ultronique Q 5.9/40A) por 5 minutos em temperatura ambiente. A suspensão bacteriana obtida foi diluída e plaqueada em ágar cetrimide para contagem das *P. aeruginosa* associadas ao biofilme.

**Esquema 7** - Avaliação do efeito de concentrações subinibitórias dos compostos quitosânico-guanilados na formação de biofilme de *P. aeruginosa*.



Fonte: A autora.

Legenda:

**SFE 0,9%** = Solução fisiológica estéril a 0,9%

**ufc** = unidade formadora de colônia

#### 4.6. Análises estatísticas

Nos ensaios de determinação da CMI, CMB e da contagem do número de células associadas ao biofilme, foram incluídos controles de esterilidade para descartar contaminação dos compostos teste. Os dados foram organizados em tabela facilitando a comparação entre o controle sem tratamento com a quitosana e os derivados. Todos os testes foram realizados em triplicata e em três séries de

repetições independentes. A  $CL_{50}$  foi calculada através do *software* STATISTICA criado pela *Statsoft*.

As variáveis quantitativas geradas:  $CL_{50}$ , determinação da biomassa total, do número de células associadas ao biofilme e o efeito de concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilme foram analisadas descritivamente com o cálculo das médias e desvios padrão. Foi realizado o teste de normalidade para verificar a distribuição dos dados tanto no método cristal violeta quanto no método contagem.

O teste ANOVA de uma via foi utilizado para comparar os resultados do método de contagem viável na presença de ausência dos compostos. A ANOVA de uma via e o teste de normalidade foram realizados usando GraphPad Prism versão 5.04. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

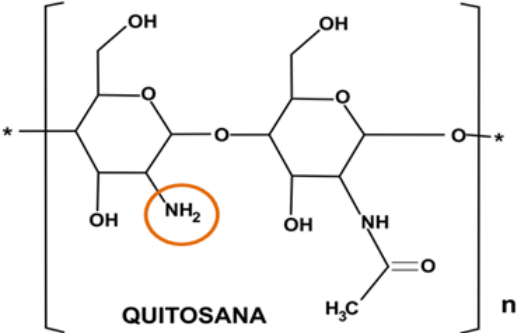

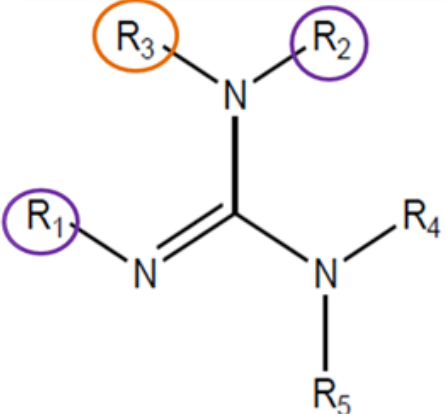




## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação da toxicidade dos compostos quitosânico-guanilados pelo ensaio de letalidade em *Artemia salina*

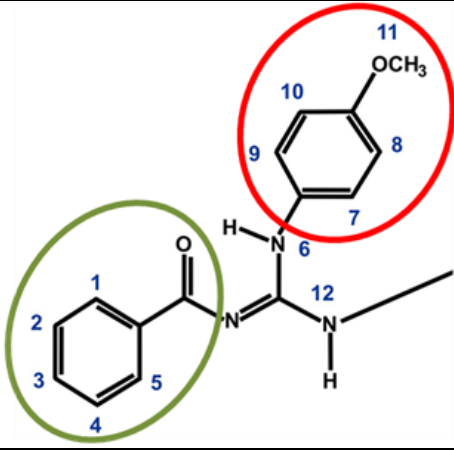


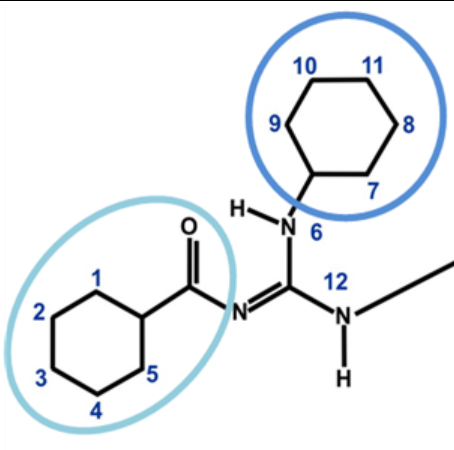


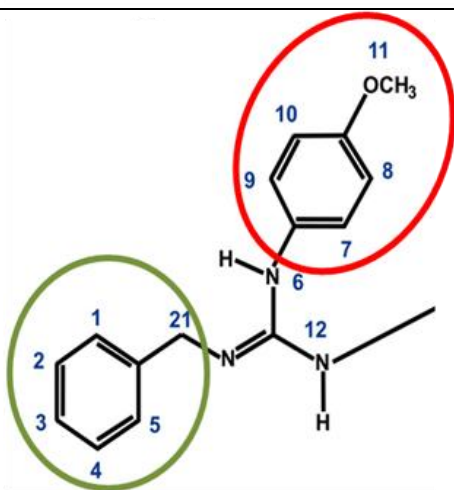


Em sua estrutura, a quitosana apresenta três tipos de grupos reativos que são os grupos hidroxila primária e secundária e o grupamento amina primária presente em sua estrutura (KIM, 2018; ZHU *et al.*, 2016; ARANAZ; HARRIS; HERAS, 2010). A entrada dos substituintes guanilados ocorreu através da transformação do grupamento amino primário em amino secundário para receber os substituintes guanilados. Estes derivados quitosânico-guanilados têm substituintes doadores e retiradores de elétrons ligados ao grupo guanidina em diferentes posições que podem ou não estar em ressonância eletrônica.

**Quadro 1** - Quitosana e grupos substituintes dos compostos quitosânico-guanilados.

Estruturas	Descrição dos grupos substituintes
 <p style="text-align: center;">QUITOSANA</p>	<p> Grupo amina da quitosana que foi modificado para dar origem aos compostos quitosânico-guanilados.</p>
	<p> Porções modificadas na guanidina para dar origem aos compostos quitosânico-guanilados.</p> <p> Grupo amina da quitosana que foi modificado para dar origem aos compostos quitosânico-guanilados</p>





(Continua)

## Cont. Quadro 1.

	<p>Quito-guani 3<sup>a</sup></p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenila. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Benzamida. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p>
	<p>Quito-guani 3b</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Cicloexil. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.</p>
	<p>Quito-guani 3c</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenila. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Benzil. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p>

(Continua)

Cont. Quadro 1.

	<p>Quito-guani 3d</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenila. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p>
	<p>Quito-guani 3e</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Cicloexil. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.</p> <p> Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.</p>

Fonte: A autora.

Os resultados do teste de letalidade da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados sobre *Artemia salina* são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Concentração Letal (CL<sub>50</sub>) da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados para *Artemia salina*.

Compostos testados	CL <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	95% CL
Quitosana	1,26	1,12 - 1,41
Quito-Guani 3a	1,47	1,25 - 1,69
Quito-Guani3b	1,33	1,24 - 1,41
Quito-Guani 3c	1,33	1,24 - 1,42

(Continua)

(Conclusão)

**Tabela 1** - Concentração Letal (CL<sub>50</sub>) da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados para *Artemia salina*.

Compostos testados	CL <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	95% CL
Quito-Guani 3d	1,05	0,74 - 1,35
Quito-Guani 3e	1,31	1,25 - 1,36

Fonte: A autora

Legenda:

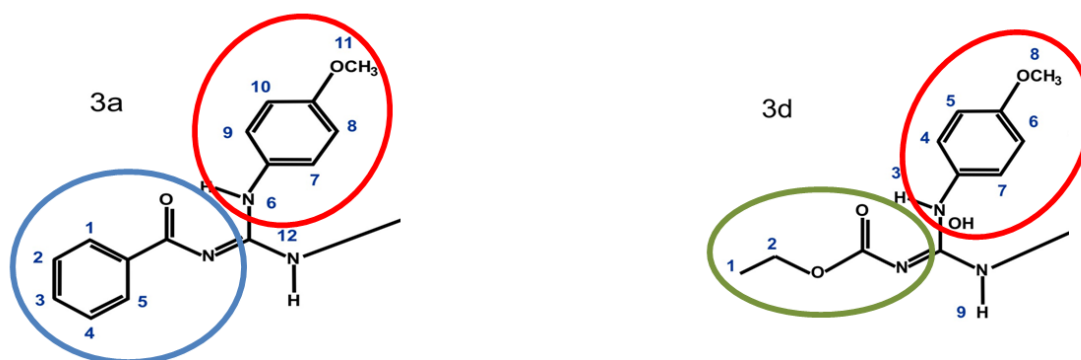
**Quito-Guani** = quitosana guanilada;**Quito-Guani 3a** = (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida;**Quito-Guani 3b** = (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina;**Quito-Guani 3c** = (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamidina;**Quito-Guani 3d** = (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;**Quito-Guani 3e** = (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato.

Os controles de viabilidade e de técnica apresentaram resultados esperados (ausência de mortalidade espontânea) e o controle com dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) obteve valores referentes ao controle interno do laboratório com CL<sub>50</sub> de 0,03456 mg.mL<sup>-1</sup> para *A. salina*.

A quitosana apresentou CL<sub>50</sub> de 1,26 mg.mL<sup>-1</sup> para *A. salina*. Em um trabalho prévio foi observado que a quitosana foi atóxica para *A. salina* com percentual de mortalidade menor que 10% em concentrações ≤ 1mg.mL<sup>-1</sup> e que os derivados apresentaram boa compatibilidade confirmada pela baixa taxa hemolítica (<5%) e pelo índice significativo de atividade antioxidante (PEREIRA *et al.*, 2019).

O derivado da quitosana mais tóxico foi a quito-guani 3d que apresentou CL<sub>50</sub> 1,05 mg.mL<sup>-1</sup>. Esse composto possui em sua estrutura dois substituintes retiradores de elétrons. Essa toxicidade elevada pode ser devido a reação de hidrólise que possivelmente ocorreu no substituinte R<sub>1</sub> do composto 3d. Já o composto que apresentou menor toxicidade foi a quito-guani 3a que também possui em sua estrutura, dois substituintes retiradores de elétrons (Figura 11). Em um trabalho prévio, Andrade (2016) afirma que grupos doadores de elétrons apresentam maior nível de toxicidade nas guanidinas, no entanto em nosso trabalho não foi constatado o aumento da toxicidade dos compostos com substituintes doadores de elétrons.

**Figura 11** - Representação dos substituintes  $R_1$  e  $R_2$  dos compostos quito-guani 3a e quito-guani 3d.



Fonte: A autora.

Legenda:

- Grupo substituinte da porção  $R_2$ : Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Benzamida. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

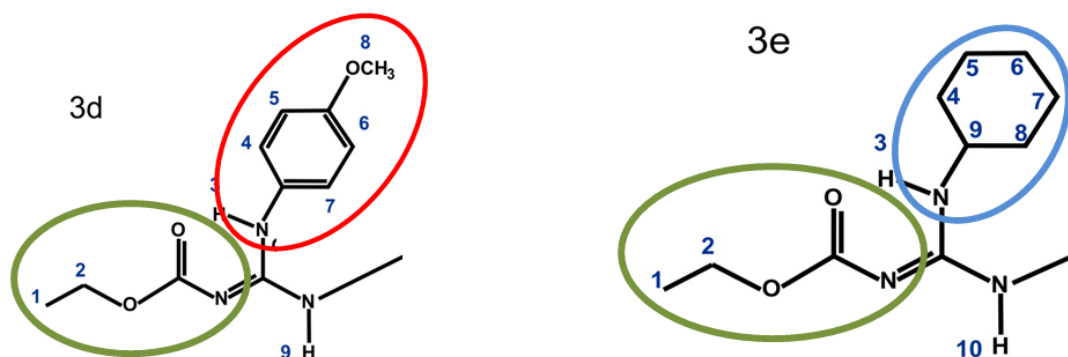
Em trabalho prévio Rustici, Caramori e Galembeck (2006), observou que substituintes doadores ou retiradores de elétrons em  $R_1$  do composto 3-Hidroxipropenal levam a um aumento na ressonância e na força da ligação de hidrogênio, e substituintes em  $R_2$  apresentam um efeito muito menor do que os localizados em  $R_1$  e não apresentam qualquer padrão de comportamento.

Os substituintes das quitosanas-guaniladas 3a e 3d estão em ressonância eletrônica em  $R_1$  e  $R_2$ , porém, o substituinte  $R_2$  da quito-guani 3a apresenta uma estrutura de cadeia fechada indicando que os elétrons estão mais envolvidos com a ressonância eletrônica e dessa forma acaba tendo menor possibilidade de interação com outros meios e com os núcleos sendo outra justificativa para a sua baixa toxicidade. Já a quito-guani 3d possui uma cadeia aberta no substituinte  $R_1$  indicando uma menor ressonância e maior disponibilidade de interação dos elétrons com os núcleos, sendo esta outra possibilidade para justificar a toxicidade da quitosana-guanilada 3d.

As quitosanas-guaniladas 3d e 3e possuem substituintes retiradores de elétrons iguais em  $R_1$ . Estes substituintes possuem cadeia aberta, menor ressonância e maior disponibilidade de interação com o meio quando comparado

aos outros compostos quitosânico-guanilados e também podem estar sofrendo a reação de hidrólise. Além disso, foram os compostos que obtiveram menores valores de  $CL_{50}$ , sendo o composto quito-guani 3d  $CL_{50}$  de  $1,05 \text{ mg.mL}^{-1}$  e o composto quito-guani 3e  $CL_{50}$  de  $1,31 \text{ mg.mL}^{-1}$  (figura 12).

**Figura 12** - Representação dos substituintes  $R_1$  e  $R_2$  dos compostos quito-guani 3d e quito-guani 3e.



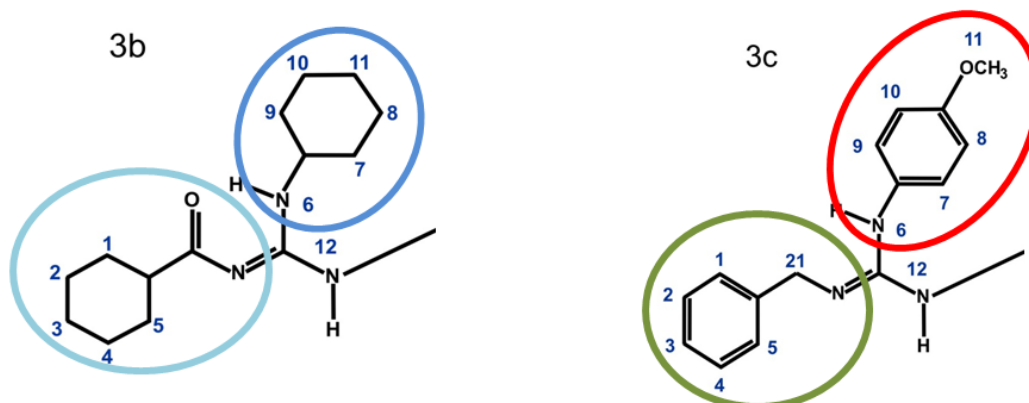
Fonte: A autora.

Legenda:

- Grupo substituinte da porção  $R_2$ : Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_2$ : Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

As quito-guanis 3b e 3c (figura13) possuem substituintes distintos, tendo o composto 3b substituintes doadores de elétrons em  $R_1$  e  $R_2$  e o composto 3c substituintes retiradores de elétrons em  $R_1$  e  $R_2$ , no entanto ambos apresentaram o mesmo valor de  $CL_{50}$   $1,33 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A partir dos resultados obtidos podemos inferir que os grupos retiradores e doadores de elétrons não explicam as diferenças de resultados obtidos neste ensaio.

**Figura 13** - Representação dos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> dos compostos quito-guani 3b e quito-guani 3c.



Fonte: A autora.

Legenda:

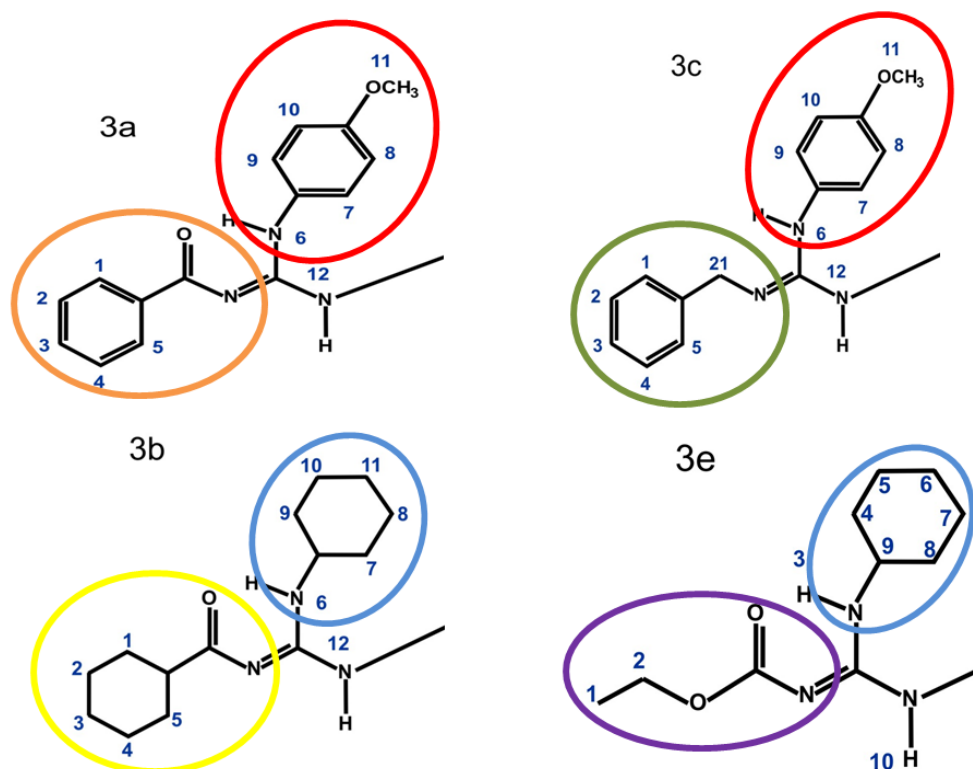
- Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Benzilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Cicloexilamida. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

Tavares (2004) relata que o efeito terapêutico dos fármacos se deve à interação com os sistemas biológicos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e suas propriedades físico-químicas. Sejam estes fatores de caráter eletrônico, hidrofóbico ou estérico afetarão a interação do fármaco com a fase biológica. Portanto, dois fármacos estruturalmente semelhantes, diferenciando-se apenas por um átomo ou posição que este ocupa na molécula, podem apresentar diferenças em suas propriedades físico-químicas e na atividade biológica.

As quito-guanis 3a e 3c possuem substituintes parecidos, diferindo-se apenas pela ausência da dupla ligação do carbono na posição 21 ao elemento oxigênio na estrutura do composto quito-guani 3c. Esse último apresentou maior toxicidade do que o derivado quitosânico-guanilado 3a. Tal resultado pode estar sendo influenciado pelo elemento oxigênio (O<sub>2</sub>) na estrutura do composto quito-guani 3a, uma vez que o átomo de oxigênio é eletronegativo e promove um aumento na força da ressonância deixando o composto 3a menos disponível para interagir com o

meio do que o substituinte  $R_1$  do composto quito-guani 3c. O mesmo fundamento de Tavares (2004) pode ser levado em consideração para as quito-guanis 3b e 3e, uma vez que possuem substituintes iguais em  $R_2$  e distintos em  $R_1$  (Figura 14).

**Figura 14** - Representação dos substituintes  $R_1$  e  $R_2$  dos compostos quito-guani 3a, 3b, 3c e 3e.



Fonte: A autora.

Legenda:

- Grupo substituinte da porção  $R_2$ : Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Benzamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Benzilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_2$ : Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Cicloexilamida. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.
- Grupo substituinte da porção  $R_1$ : Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.



## 5.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB)

Os resultados da CMI e CMB da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados estão dispostos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2** - Concentração mínima inibitória da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados contra *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Quitosana	Compostos quitosânicos-guanilados mg.mL <sup>-1</sup>				
		3a	3b	3c	3d	3e
<b>Pa3</b>	1,25	>2,5	0,625	ND	>2,5	2,5
<b>Pa5</b>	1,25	>2,5	0,625	ND	>2,5	2,5
<b>Pa6</b>	2,5	>2,5	ND	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa10</b>	2,5	>2,5	ND	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa11</b>	2,5	>2,5	ND	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa13</b>	2,5	>2,5	ND	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa20</b>	2,5	>2,5	0,625	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa22</b>	2,5	>2,5	0,625	ND	>2,5	2,5
<b>Pa23</b>	1,25	>2,5	0,625	0,625	>2,5	2,5
<b>Pa28</b>	2,5	>2,5	0,625	0,625	>2,5	2,5
<b>Pa29</b>	2,5	>2,5	0,625	0,625	>2,5	2,5
<b>Pa ATCC 27853</b>	2,5	>2,5	0,625	ND	>2,5	>2,5
<b>Pa ATCC 9027</b>	2,5	>2,5	0,625	ND	>2,5	>2,5

Fonte: A autora.

Legenda:

**Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*;

**Quito-Guani 3a** = (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida;

**Quito-Guani 3b** = (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina;

**Quito-Guani 3c** = (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamida;  
**Quito-Guani 3d** = (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;  
**Quito-Guani 3e** = (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;  
**ATCC** = *American Type Culture Collection*.  
**ND** = Não determinado

As CMI da quitosana variaram entre 1,25 a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Já as CMI dos compostos quito-guani 3b e 3c foram menores que a da quitosana, apesar de algumas cepas não apresentarem valor determinado. As CMI das quito-guanis 3a, 3d e 3e foram maiores que a da quitosana, sendo que a maioria das leituras foram superiores à maior concentração testada.

**Tabela 3** - Concentração mínima bactericida da quitosana e dos compostos quitosânicos-guanilados contra *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Quitosana	Compostos quitosânicos-guanilados mg.mL <sup>-1</sup>				
		3a	3b	3c	3d	3e
<b>Pa3</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa5</b>	>2,5	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	>2,5
<b>Pa6</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa10</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa11</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa13</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa20</b>	>2,5	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	>2,5
<b>Pa22</b>	>2,5	>2,5	1,25	1,25	>2,5	>2,5
<b>Pa23</b>	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa28</b>	>2,5	>2,5	1,25	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa29</b>	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
<b>Pa ATCC 27853</b>	>2,5	>2,5	0,625	1,25	>2,5	>2,5

(Continua)

(Conclusão)

**Tabela 3** - Concentração mínima bactericida da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados contra *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Quitosana	Compostos quitosânicos-guanilados mg.mL <sup>-1</sup>				
		3a	3b	3c	3d	3e
<b>Pa ATCC 9027</b>	>2,5	>2,5	1,25	1,25	>2,5	>2,5

Fonte: A autora.

Legenda:

**Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*;**Quito-Guani 3a** = (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida;**Quito-Guani 3b** = (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina;**Quito-Guani 3c** = (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamidina;**Quito-Guani 3d** = (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;**Quito-Guani 3e** = (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;**ATCC** = *American Type Culture Collection*.

A CMB da quitosana foi superior ao máximo testado. As quito-guanis apresentaram o mesmo padrão, exceto: 3b com CMB de 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> para Pa ATCC 27853 e de 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> para Pa22, Pa23, Pa28 e Pa ATCC 9027; a quito-guani 3c apresentou CMB de 1,25 mg.mL<sup>-1</sup> para Pa5, Pa20, Pa22, Pa ATCC 27853 e Pa ATCC 9027. Os controles de viabilidade, de técnica e com o fármaco antimicrobiano gentamicina (µg.mL<sup>-1</sup>) para as cepas padrão ATCC 9027 e ATCC 27853 mostraram resultados preconizados pelo CLSI.

Helander *et al.* (2001) relatam que por ser uma macromolécula polimérica, a quitosana se torna incapaz de passar pela membrana externa das bactérias Gram-negativas, uma vez que esta atua como barreira de permeabilidade externa eficiente contra macromoléculas tornando inviável o acesso direto da quitosana às partes intracelulares da bactéria. Portanto, sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas deve ser analisada em termos de suas propriedades químicas e estruturais. A carga positiva do grupo amino da quitosana no pH 6,3 faz com que a sua estrutura seja policatiônica, levando a interagir com os componentes predominantemente aniônicos, lipopolissacarídeos com grupos fosfato e pirofosfato, que compõem a membrana externa das bactérias Gram-negativas e produzem uma densidade maior de cargas negativas na superfície bacteriana. A ligação de moléculas policatiônicas pode interromper a integridade da membrana externa,

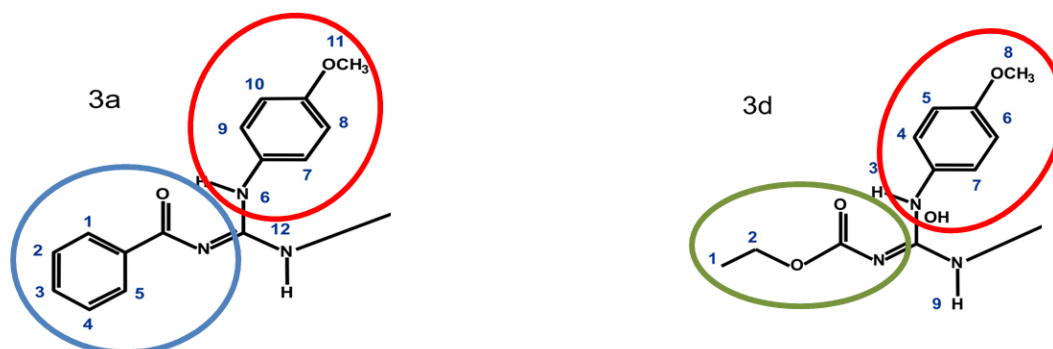
resultando na perda da função de barreira, mas sem atividade bactericida direta (MATICA; MENGHIU; OSTAFE, 2017; HELANDER *et al.*, 2001).

Outros estudos sugerem que em concentrações mais baixas ( $<0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), a quitosana policatiónica pode levar a aglutinação no momento em que se liga à superfície bacteriana carregada negativamente, e quando em concentrações mais altas, aquela pode manter as bactérias em suspensão devido ao maior número de cargas positivas o que confere uma carga positiva líquida à superfície das bactérias (BAKSHI *et al.*, 2020; WANG; XUE; MAO, 2020; DAI *et al.*, 2011; RABEA *et al.*, 2003), justificando os resultados da CMI e CMB da quitosana nas concentrações testadas neste estudo.

Andrade (2016) relatou em seu trabalho que os compostos quitosânico-guanilados não se adequaram a técnica de microdiluição em caldo, uma vez que ao fazer a diluição dos compostos com o caldo MH havia a precipitação dos mesmos, o que inviabilizou o uso desta técnica para determinar a concentração mínima inibitória dos compostos. No entanto, apesar das limitações dos compostos quanto a solubilidade e pH, foi possível realizar a determinação da CMI e da CMB de forma que não houvesse a precipitação dos compostos e que o pH não inviabilizasse o crescimento das bactérias, uma vez que estas tendem a ser neutrofílicas.

À vista disso, foi possível observar que os compostos que possuem grupos substituintes retiradores de elétrons não obtiveram bons resultados na inibição contra as cepas testadas. Ambos os compostos quito-guani 3a e 3d obtiveram tanto a CMI como a CMB determinadas em  $> 2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A similaridade entre os compostos quito-guani 3a e 3d (Figura 15) é que ambos possuem substituintes retiradores de elétrons ligados ao nitrogênio do grupo guanidina na posição  $R_2$ , além disso, ambos os substituintes em  $R_1$  e  $R_2$  entram em ressonância eletrônica no entanto o substituinte  $R_1$  do composto 3d possui cadeia aberta.

**Figura 15** - Representação dos substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> dos compostos quito-guani 3a e quito-guani 3d.



Fonte: A autora.

Legenda:

■ Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

■ Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Benzilamida. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

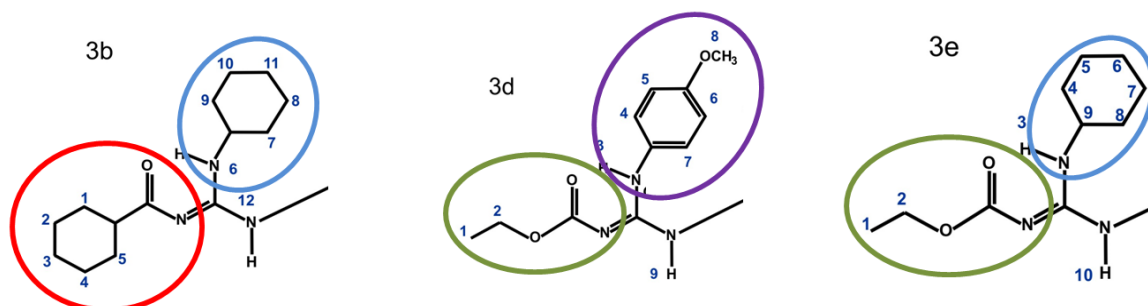
■ Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

Em estudo realizado por Cele *et al.* (2020), os pesquisadores sintetizaram, caracterizaram e avaliaram o potencial antibacteriano (CMI e CMB) da quitosana e de polímeros fluorados e fluorados quaternizados contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Salmonella enterica* ATCC 10708, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6051 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 43300. Os pesquisadores observaram que a quitosana apresentou atividade discreta contra todas as cepas testadas, ao passo que os derivados poliméricos fluorados sintetizados exibiram atividade significativamente maior, mas contra apenas as bactérias Gram-positivas testadas, enquanto que para as Gram-negativas não, sendo essa baixa atividade atribuída à baixa hidrofobicidade dos compostos além da seletividade da quitosana fluorada a bactérias Gram-positivas. Já os compostos fluorados quaternizados foram, em geral, mais ativos contra as Gram-positivas do que contra as Gram-negativas e quando comparados aos derivados fluorados, ainda permanecem com melhores resultados contra as Gram-positivas e Gram-negativas, sendo essa melhora da atividade antibacteriana atribuída a uma variação nos grupos de flúor nos derivados fluorados quaternizados.

O flúor é o elemento mais eletronegativo do grupo dos halogênios (NARVAI, 2000), e seu efeito retirador de elétrons contribui com diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade antimicrobiana (CELE *et al.*, 2020). Quando comparamos os resultados desses compostos que possuem grupos retiradores de elétrons, podemos observar que ambos os compostos fluorados quanto dos compostos quitosânico-guanilados 3a e 3d não obtiveram resultados de inibição contra a cepa Gram-negativa *Pa*. A ausência de atividade microbiana pode estar relacionada com o efeito retirador de elétrons dos grupos substituintes, promovendo uma estabilização entre o efeito retirador e a membrana extracelular da bactéria fazendo com que o composto perca a atividade.

O composto quito-guani 3e teve a CMI determinada entre 2,5 e > 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> e CMB > 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Este possui dois grupos substituintes distintos, sendo o grupo metilenocarbamato - retirador de elétrons - ligado ao nitrogênio da guanidina na posição R<sub>1</sub> e um substituinte ciclohexil - doador de elétrons - ligado ao nitrogênio do grupo guanidina na posição R<sub>2</sub>; Aquele possui similaridade com os compostos quito-guani 3d (Figura 16), onde o substituinte ligado ao nitrogênio da guanidina na posição R<sub>1</sub> trata-se de um grupamento metilenocarbamato - retirador de elétrons - e com o composto 3b onde ambos possuem um substituinte ciclohexil – doador de elétrons - ligado ao nitrogênio do grupo guanidina na posição R<sub>2</sub>. O resultado positivo daquele derivado (3e) pode estar relacionado com o substituinte ciclohexil ligado ao grupo guanidina na posição R<sub>2</sub>, uma vez que tanto o composto quito-guani 3e quanto o composto quito-guani 3b são os únicos que possuem tal estrutura.


**Figura 16** - Representação das estruturas dos compostos 3b, 3d e 3e.





Fonte: A autora.

Legenda:

  Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

 Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Cicloexilamida. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

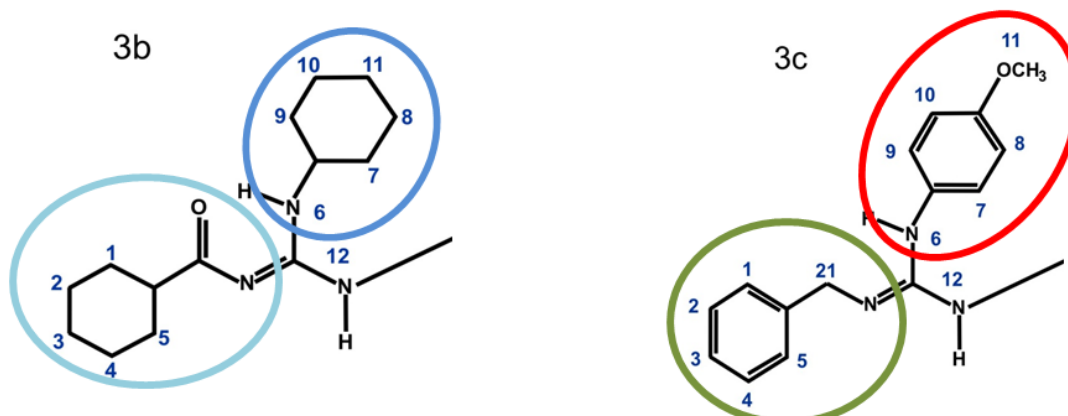
 Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

 Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Metilenocarbamato. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

O derivado quitosânico-guanilado que obteve o melhor resultado de CMI foi o composto quito-guani 3b. Mesmo após agitação e apesar de ter apresentado corpo de fundo no poço da microplaca de microtitulação o que impossibilitou a determinação da CMI em quatro bactérias, nas demais a CMI foi determinada em 0,625 mg.mL<sup>-1</sup>. A CMB variou entre 0,625 a >2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Esse derivado apresenta substituintes doadores de elétrons na posição R<sub>2</sub> e R<sub>1</sub> ligadas aos nitrogênios do grupo guanidina.

O derivado quito-guani 3c também apresentou dificuldades na determinação da CMI devido ao seu aspecto turvo nas concentrações mais elevadas, no entanto três bactérias tiveram a CMI determinada em 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> e a CMB variou entre 1,25 e >2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Esse composto derivado possui em sua estrutura dois substituintes retiradores de elétrons, um na posição R<sub>2</sub> ligada ao nitrogênio do grupo guanidina e outro ligado ao grupo guanidina na posição R<sub>1</sub> (Figura 17).


**Figura 17** - Representação dos compostos quito-guani 3b e 3c.





Fonte: A autora.

Legenda:

 Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Metoxifenilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

 Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Benzilamina. Grupo substituinte retirador de elétrons que entra em ressonância eletrônica.

 Grupo substituinte da porção R<sub>2</sub>: Cicloexilamina. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

 Grupo substituinte da porção R<sub>1</sub>: Cicloexilamida. Grupo substituinte doador de elétrons que não entra em ressonância eletrônica.

Os dois compostos com melhores resultados tanto de CMI quanto de CMB não possuem similaridade estrutural que explique sua boa atividade antimicrobiana, o que poderia levar a postulação de que seu desempenho tenha relação direta com o pH, haja vista que os compostos quito-guani 3b e 3c foram os mais ácidos (pH 5,5) devido a sua precipitação em pH mais elevado. No entanto, os controles de viabilidade na presença de ácido acético 1% neutralizado em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 Mol.L<sup>-1</sup> foram incluídos e foi possível constatar o crescimento microbiano.

Como não há similaridade entre as estruturas desses compostos, há a possibilidade de que o resultado da menor concentração visível capaz de inibir o crescimento microbiano venha dos diferentes substituintes ligados à estrutura da quitosana. No composto quito-guani 3b a boa atividade antimicrobiana pode estar relacionada à presença dos grupos ciclohexil em ambos os substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> que são doadores de elétrons, e no composto quito-guani 3c a boa atividade pode estar relacionada ao substituinte benzamina ligado ao grupo guanidina na posição R<sub>1</sub> onde há ausência da dupla ligação do carbono 21 ao elemento oxigênio.

Hu *et al.* (2007) sintetizou através da reação de guanidilação, derivados de quitosana guanidilada com diferentes pesos moleculares, realizou a caracterização das moléculas e avaliou a atividade antimicrobiana (CMI e CMB) dos derivados contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus subtilis*, e Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A quitosana e a quitosana guanidilada obtiveram melhores resultados antimicrobianos com a diminuição do pH, mas mesmo assim, a quitosana guanidilada inibiu o crescimento de *S. aureus* e *B. subtilis* em (pH 6,6). Em solução de ácido clorídrico (pH 5,4) a quitosana e a quitosana guanidilada apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas, mas quando comparados, os derivados guanidinilados apresentaram valores de CMI quatro vezes menor do que o valor da quitosana.



Apesar da limitação apresentada pelos compostos, foi possível observar um resultado satisfatório de alguns dos compostos sintetizados contra as bactérias testadas, haja vista que a *Pa* é um patógeno oportunista que faz parte da lista de “patógenos prioritários” resistentes a antibióticos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e que é frequentemente isolado de pacientes imunocomprometidos hospitalizados há mais de 1 semana, sendo causas frequentes de infecções nosocomiais (PANG *et al.*, 2019; SAFEYAH; MAQBUL; SAFEYAH, 2018; SUBHASWARAJ *et al.*, 2018; OMS, 2017).

### 5.3. Quantificação da biomassa total e do número de células associadas ao biofilme de *P. aeruginosa*

A Tabela 4 apresenta os resultados das leituras das densidades ópticas da biomassa total, classificação conforme capacidade de formar biofilme e contagem das bactérias associadas ao biofilme.

**Tabela 4** - Índice de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	DO <sub>492 nm</sub> (MED±DP)	Formação de biofilme	Log <sub>10</sub> ufc.mL <sup>-1</sup> (MED±DP)
<b>Pa03</b>	0,278±0,075	Forte	6,47±0,09
<b>Pa05</b>	0,175±0,081	Moderada	6,76±0,55
<b>Pa06</b>	0,184±0,067	Forte	7,11±0,58
<b>Pa10</b>	0,079±0,049	Débil	6,73±0,30
<b>Pa11</b>	0,278±0,092	Forte	6,36±0,34
<b>Pa13</b>	0,063±0,013	Débil	6,91±0,19
<b>Pa20</b>	0,178±0,046	Forte	6,36±0,57
<b>Pa22</b>	0,190±0,073	Forte	6,79±0,62

(Continua)

(Conclusão)

**Tabela 4** - Índice de formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	DO <sub>492 nm</sub> (MED±DP)	Formação de biofilme	Log <sub>10</sub> ufc.mL <sup>-1</sup> (MED±DP)
<b>Pa23</b>	0,168±0,084	Moderada	6,46±0,92
<b>Pa28</b>	0,197±0,141	Forte	6,16±0,09
<b>Pa29</b>	0,148±0,052	Moderada	6,12±0,62
<b>Pa ATCC 27853</b>	0,079±0,027	Débil	5,94±0,56
<b>Pa ATCC 9027</b>	0,149±0,052	Moderada	5,22±0,67
<b>PC</b>	0,044±0,004	-	-

Fonte: A autora.

Legenda:

**Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*;**ATCC** = American type culture collection;**DO<sub>492nm</sub>** = Densidade óptica a 492 nanômetros;**MED** = Média**DP** = desvio padrão;**PC** = Poço controle não inoculado.

As bactérias Pa03, Pa06, Pa11, Pa20, Pa22 e Pa28 foram classificadas como formadoras fortes de biofilme; Pa05, Pa23, Pa29 e Pa ATCC 9027 formadoras moderadas; e Pa10, Pa13 e Pa ATCC 27853 formadoras débeis. Em outro trabalho do grupo, Caixeta *et al.* (2019) identificaram que a *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresentou melhor desempenho na produção de biofilme quando comparada a *P. aeruginosa* ATCC 27853, corroborando nossos resultados.

Por outro lado, quanto ao número de células viáveis associadas ao biofilme observamos que a Pa ATCC 9027 foi a que obteve menor contagem com 5,22±0,67 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> seguido da Pa ATCC 27853 com 5,94±0,56 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>. A cepa que obteve maior número de células viáveis foi a Pa06 7,11±0,58 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup> seguida da Pa13 com 6,91±0,19 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>. As contagens de células viáveis das demais pseudomonas variaram de 6,79 a 6,12 Log<sub>10</sub> ufc.mL<sup>-1</sup>.

O processo de formação de biofilme é lento e dependendo das condições da cultura, pode levar horas, dias ou meses para atingir o equilíbrio. No entanto, geralmente um biofilme maduro pode ser estabelecido de 24 a 48 horas e pode conter até  $10^{10}$  células  $\text{cm}^3$  e 20 a 30 camadas de bactérias (MENDONÇA *et al.*, 2012). A quantidade de micro-organismos presentes em uma superfície é um parâmetro determinante para comprovação da formação de biofilme maduro ou apenas adesão bacteriana (DALLA COSTA *et al.*, 2017). Para Ronner e Wong (1993) são necessárias  $10^3$  células aderentes  $\text{cm}^2$  para que ocorra a formação de biofilme. Já Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996) e Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) acreditam que são necessárias aproximadamente  $10^5$  e  $10^7$  células aderentes  $\text{cm}^2$ , respectivamente, para a formação de biofilme.

O método cristal violeta consiste na utilização de um corante protéico básico que cora moléculas de superfície carregadas negativamente e matriz extracelular de polissacarídeos. Diferentes espécies de células são coradas de forma diferente pelo cristal violeta, isto é, células coradas com intensidade mais alta são estimadas com maior formação de biofilme, ou seja, a matriz extracelular, células viáveis ou não viáveis podem ser tingidas pelo cristal violeta, demonstrando que este ensaio mede a quantidade de biofilme, mas não o biofilme funcional (XU *et al.*, 2016; NARISAWA *et al.*, 2005).

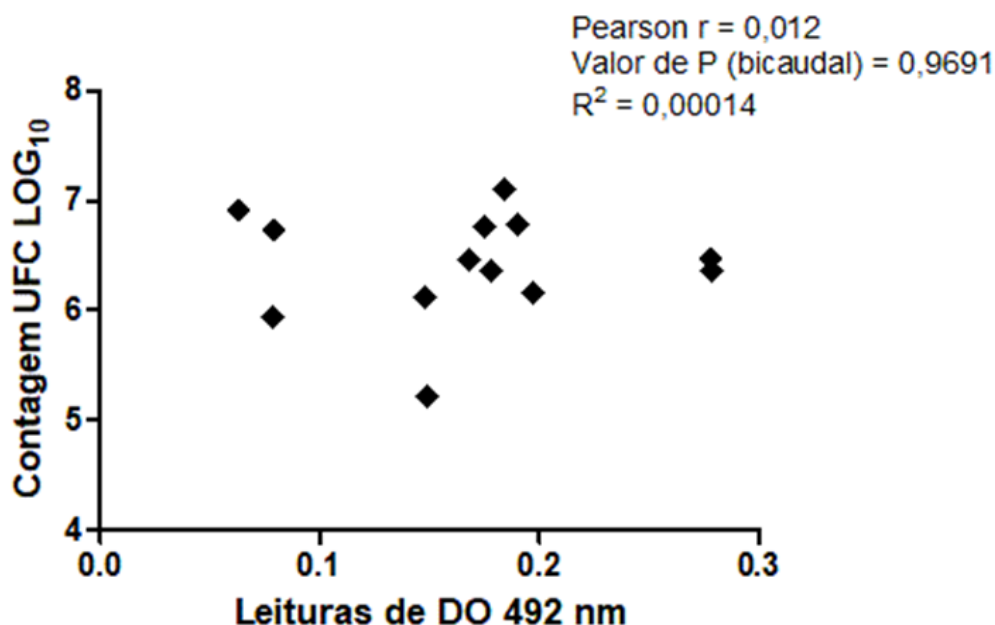
Apesar do método contagem de ufc apresentar algumas desvantagens como a dificuldade de dissociação dos aglomerados de biofilme em suspensões unicelulares para contagem em placas e a lise de algumas células (ABBAS, SERRY E EL-MARSY 2012), pode ser considerado como uma alternativa estratégica complementar a determinação da biomassa total de biofilme pelo método cristal violeta para enfrentamento de infecções nosocomiais, uma vez que este visa quantificar as células viáveis do biofilme.

O perfil de resistência dos mesmos isolados clínicos avaliados em nosso trabalho, foi verificado por Santos (2018) que encontrou que as *P. aeruginosa* foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados, exceto para gentamicina com resistência dos isolados Pa5, Pa22 e Pa23, para aztreonam com resistência da Pa23 e sensibilidade intermediária da Pa20 e Pa22 e resistência da ceftazidima da

Pa20. Não observamos relação entre as categorias de formação do biofilme e o perfil de resistência das *P. aeruginosa*.

O teste de correlação de Pearson demonstrou que não foi encontrada correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. (Figura 18).

**Figura 18** - Gráfico de dispersão entre contagem ufc Log<sub>10</sub> e leituras de DO 492nm.



Fonte: A autora

Abbas, Serry e El-Marsy (2012) compararam três métodos de formação de biofilme de 23 isolados clínicos de *P. aeruginosa* sendo eles: método cristal violeta, método contagem e método tubo. Os autores observaram que houve forte correlação entre os resultados do método tubo e do método espectrofotométrico, ao contrário do método contagem viável. A baixa correlação entre os resultados de biomassa total de biofilme e da contagem de ufc.mL<sup>-1</sup> também foi encontrada.

De acordo com Luo *et al.* (2017) os biofilmes compreendem mais de 80% de todas as infecções microbianas associadas a cateteres, implantes, infecções no trato urinário dentre outras, sendo a *P. aeruginosa* comumente associada a infecções nosocomiais. A taxa de mortalidade de *P. aeruginosa* varia de 27% a 48% principalmente em pacientes imunocomprometidos com fibrose cística, feridas de queimaduras, implantes, e apesar dos avanços na terapia, a bacteremia por *P. aeruginosa* permanece fatal em mais de 20% dos casos, sendo que 50% das

mortes acontecem em poucos dias após a infecção (PRAGASAM *et al.*, 2018). Diante disso, se faz necessário o controle de infecções por *P. aeruginosa* e impedir a formação de biofilme é uma estratégia interessante no controle das infecções causadas por esses micro-organismos.

#### 5.4. Efeito de concentrações subinibitórias dos compostos na contagem de células viáveis associadas ao biofilme de *P. aeruginosa*

Os resultados da contagem de células viáveis na ausência e na presença da quitosana e dos compostos quitosânico-guanilados estão dispostos na tabela 5.

**Tabela 5** - Número de células viáveis associadas ao biofilme na presença dos compostos estudados.

	Log <sub>10</sub> ufc.mL <sup>-1</sup> (MED±DP)						
Pa	NT	Quitosana	QG 3A	QG 3B	QG 3C	QG 3D	QG 3E
<b>Pa3</b>	6,47±0,09	6,60±0,19	6,07±0,33	6,76±0,04	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa10</b>	6,73±0,30	6,37±0,16	6,09±0,26	6,85±0,36	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa11</b>	6,36±0,34	6,05±0,11	6,40±0,52	5,84±0,45	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa13</b>	6,91±0,19	6,16±0,32	5,86±0,33	6,40±0,39	> 9,00*	6,83±0,64	> 9,00*
<b>Pa23</b>	6,46±0,92	6,41±0,44	6,02±0,19	6,88±0,39	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa28</b>	6,16±0,09	5,65±0,15	5,88±0,41	6,22±0,08	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa29</b>	6,12±0,62	5,75±0,35	5,91±0,44	6,02±0,40	> 9,00*	> 9,00*	> 9,00*
<b>Pa ATCC 27853</b>	5,94±0,56	5,45±0,48	6,08±0,03	6,09±0,33	> 9,00*	6,82±0,77	> 9,00*
<b>Pa ATCC 9027</b>	5,22±0,67	5,80±0,70	5,85±0,82	5,97±0,10	> 9,00*	6,34±1,22	> 9,00*

Fonte: A autora.

Legenda:

**NT** = Controle não tratado;

**Pa** = *Pseudomonas aeruginosa*;

**MED** = Média;

**DP** = Desvio Padrão;

**Quito-Guani** = composto quitosânico-guanilado;  
**Quito-Guani 3a** = (Z)-N-((Ciclohexil amina)-(quitosana)-metileno)-benzamida;  
**Quito-Guani 3b** = (Z)-1,2-Diciclohexil-3-(quitosana)-guanidina;  
**Quito-Guani 3c** = (Z)-N((benzilamina)-(4-metoxifenil))-(quitosana) 4-carboxamidina;  
**Quito-Guani 3d** = (Z)-Etil-(4-metoxifenilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;  
**Quito-Guani 3e** = (Z)-Etil-(ciclohexilamina)-(quitosana)-metileno-carbamato;  
**ATCC** = *American type culture collection*.  
\* = Diferença significativa ( $p > 0,05$ )

A análise de variância não demonstrou diferenças significativas nas contagens de unidades formadoras de colônias das quito-guanis 3a e 3b quando comparadas à quitosana e ao controle não tratado. Apesar disso, foi possível observar uma diminuição no número de células viáveis nas bactérias Pa10, Pa11, Pa13, Pa23, Pa28, Pa29 e Pa ATCC27853 quando expostas à quitosana. O mesmo ocorreu para Pa03, Pa10, Pa13, Pa23, Pa28 e Pa29 na presença da quito-guani 3a, para Pa11, Pa13 e Pa29 com a quito-guani 3b e para Pa13 com a quito-guani 3d.

A formação de biofilme é uma estratégia de vital importância para a sustentabilidade microbiana (XU *et al.*, 2016; MELLIANI, BENSOLTANE, 2015; SHARMA *et al.*, 2015; BRANDENBURG *et al.*, 2013) uma vez que dentro do biofilme, as bactérias podem exibir 1000 vezes mais resistência ao tratamento com antibióticos do que em sua forma planctônica (BRANDENBURG *et al.*, 2013). A atenuação na formação de biofilme pode ser considerada como uma forma potencial de tornar a população microbiana mais suscetível aos antibióticos para que possam ser removidas do local alvo sem causar grandes complicações para o paciente (SHARMA *et al.*, 2015).

O aumento do número de células associadas aos biofilmes tratados com a quitosana (Pa03 e Pa ATCC9027), quito-guani 3a (Pa11, Pa ATCC27853 e Pa ATCC9027), quito-guani 3b (Pa03, Pa10, Pa23, Pa28, Pa ATCC27853 e Pa ATCC9027) e as quito-guanis 3c, 3d (exceto a Pa13) e 3e pode estar relacionado com a resistência adaptativa da *P. aeruginosa*, uma vez que esta bactéria é altamente adaptável e consegue alterar sua resposta de acordo com o ambiente em que está inserida (AZAM; KHAN, 2019).

A resistência adaptativa é uma resistência induzível que pode ocorrer em resposta à presença de agentes antimicrobianos ou outros estresses ambientais (químicos ou físicos), como uma mudança no meio, pH, temperatura, oxigênio e

outras condições de crescimento. Além dos antibióticos, vários fatores ambientais, como choque térmico, estresse do DNA, poliaminas, deficiências de nutrientes, biocidas, anaerobiose, níveis de cátions, mudanças nas fontes de carbono e comportamentos sociais, como formação de biofilme e motilidade em enxame, pode desencadear resistência adaptativa (AZAM; KHAN, 2019). Os mecanismos de resistência adaptativa atuam impedindo o acesso de antibióticos aos alvos intracelulares. Nas bactérias Gram-negativas a parede celular consiste em membranas internas e externas, que após mutação podem atuar como uma barreira de permeabilidade aos antibióticos, levando à redução da penetração nas células microbianas (ABOUELHASSAN *et al.*, 2019).

Em sua composição o biofilme além de conter células bacterianas também consiste em uma matriz de exopolissacarídeos constituída por polímeros como os polissacarídeos e substâncias protéicas que formam uma estrutura tridimensional envolvendo as membranas da célula protegendo-as do dessecação e outros estresses ambientais, além de possuírem cápsulas de natureza iônica para ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos a célula bacteriana (SHARMA *et al.*, 2015; BRANDENBURG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2019; OTOBONI, 2007).

As quitinases são enzimas secretadas com diferentes especificidades para despolimerizar a quitina e utilizar os produtos de degradação como fonte de nutrientes. Diversos micro-organismos podem secretar quitinases, inclusive a *P. aeruginosa*. Os microrganismos podem sintetizar quitinases como enzimas extracelulares induzíveis como endoquitinases e exoquitinases. Nas bactérias, as quitinases também são produzidas como defesa contra fungos ou para colonizar outros organismos contendo quitina, incluindo insetos e nematóides (SALEH *et al.*, 2020; KARTHIK, BINOD, PANDEY, 2017).

As possíveis justificativas para o aumento do número de células viáveis associadas ao biofilme de algumas *P. aeruginosa* por alguns compostos testados, podem estar relacionadas ao fato dos compostos serem polissacarídeos produzidos a partir da desacetilação da quitina e/ou que nas concentrações testadas, essas moléculas possam ter sido usados como substrato para as bactérias.

## 6. CONCLUSÕES

---

- A quitosana e os derivados quitosânico-guanilados não apresentaram toxicidade considerável contra *A. salina*. A quitosana-guanilada 3d foi considerada o derivado com maior toxicidade pois apresentou a menor CL<sub>50</sub> (1,05mg.mL<sup>-1</sup>), por outro lado, a quitosana-guanilada 3a apresentou a maior CL<sub>50</sub> (1,47mg.mL<sup>-1</sup>).
- Os compostos quitosânico-guanilados não apresentaram melhora significativa nas suas características de solubilidade em pH fisiológico em relação à quitosana.
- A quitosana apresentou CMI entre 1,25 e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>. As quitosanas-guaniladas mais ativas contra *P. aeruginosa* foram os compostos 3b e 3c com CMI de 0,625mg.mL<sup>-1</sup>. Os derivados menos ativos foram as quitosanas-guaniladas 3a e 3d com CMI >2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.
- A quitosana não demonstrou atividade bactericida contra os isolados de *P. aeruginosa* nas concentrações testadas, sendo a CMB > 2,5mg.mL<sup>-1</sup>. O composto mais ativo foi a quitosana-guanilada 3b, com CMB de 0,625mg.mL<sup>-1</sup> contra a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e variando entre 1,25mg.mL<sup>-1</sup> e > 2,5mg.mL<sup>-1</sup> para os demais isolados. As quitosanas-guaniladas 3a e 3d não mostraram atividade antimicrobiana contra a *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações testadas.
- Todas as 13 *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilme nas condições testadas, sendo 6 classificadas como formadoras fortes, 4 como formadoras moderadas e 3 como formadoras débeis.
- As bactérias Pa3 e Pa11 foram as maiores formadoras de biofilme com resultados de 0,278±0,075 e 0,278±0,092, respectivamente. As bactérias Pa13 e Pa ATCC27853 foram as menores formadoras com resultados de 0,063±0,013 e 0,079±0,027, respectivamente.



- As bactérias Pa06 e Pa13 foram as que apresentaram os maiores números de células viáveis associadas ao biofilme com contagens de  $7,11 \pm 0,58$  e  $6,91 \pm 0,19 \text{ Log}_{10} \text{ ufc.mL}^{-1}$ , respectivamente. As bactérias Pa ATCC9027 e Pa ATCC27853 foram as que obtiveram as menores contagens com  $5,22 \pm 0,67$  e  $5,94 \pm 0,56 \text{ Log}_{10} \text{ ufc.mL}^{-1}$ , respectivamente .
- Não foi encontrada correlação entre os resultados obtidos na formação de biofilme pelo método cristal violeta que determina a biomassa e a contagem do número células viáveis associadas ao biofilme de *P. aeruginosa*.
- A quitosana não diminuiu de forma significativa o número de células viáveis associadas ao biofilme para Pa10, Pa11, Pa13, Pa23, Pa28, Pa29 e Pa ATCC27853. Nas bactérias Pa03 e Pa ATCC9027 a quitosana propiciou aumento na contagem de células viáveis.
- O efeito dos derivados da quitosana no número de bactérias associadas ao biofilme foi variável. A quitosana-guanilada 3a diminuiu o número de células viáveis nos biofilmes da Pa03, Pa10, Pa13, Pa23, Pa28 e Pa29. A quitosana-guanilada 3b inibiu o número de bactérias nos biofilmes da Pa11, Pa13 e Pa29. A quitosana-guanilada 3d diminui o número de células viáveis para Pa13, mas para as demais bactérias houve aumento significativo. As quitosanas-guaniladas 3c e 3e propiciaram um aumento significativo no número de bactérias associadas ao biofilme de todas as *P. aeruginosa* testadas.
- Não foi observada relação entre as categorias de formação do biofilme e o perfil de resistência das *P. aeruginosa*.
- Os resultados encontrados demonstraram que em concentrações subinibitórias as quitosanas-guaniladas apresentaram baixa atividade contra a formação de biofilme de isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

## 7. REFERÊNCIAS

---

ABBAS, H. A.; SERRY, F. M.; EL-MASRY, E. M. Comparative assessment of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by crystal violet assay and viable count assay. **Res J Sci Tech**, v. 4, p. 181-4, 2012.

ABOUEHASSAN, Y.; GARRISON, A. T.; YANG, H.; CHÁVEZ-RIVEROS, A.; BURCH, G. M.; HUIGENS III, R. W. Recent progress in natural-product-inspired programs aimed to addressing antibiotic resistance and tolerance. **Journal of medicinal chemistry**, v.62, n.17, p.7618-7642, 2019.

AHMED, S.; IKRAM, S. Chitosan & its derivatives: a review in recent innovations. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.6, n.1, p.14-30, 2015.

AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 483-507, 2016.

ALIASGHARI, A.; KHORASGANI, M. R.; VAEZIFAR, S.; RAHIMI, F.; YOUNESI, H.; KHOROUSHI, M. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic *streptococci*: an in vitro study. **Iranian journal of microbiology**, v.8, n.2, p.93-100, 2016.

ANDRADE, C. C. **Síntese e avaliação Biológica de Quitosanas Nguaniladas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares), Universidade Estadual de Goiás - UEG, 2016.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of food protection**, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 5–16, 2001.

ARANAZ, I.; ACOSTA, N.; CIVERA, C.; ELORZA, B.; MINGO, J.; CASTRO, C.; GANDÍA, M. L.; HERAS CABALLERO, A. Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. **Polymers**, v.10, n.2, p.213, 2018.

ARANAZ, I; HARRIS, R; HERAS, A. Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 308-330, 2010.

ARNAUD, T. M. S.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P. Produção, propriedades e aplicações da quitosana na agricultura e em alimentos. *In*: RESENDE, R. R.(org.). **Biotecnologia Aplicada à Agor&Indústria: Fundamentos e aplicações** – Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. p. 503-528.

ARRUDA, I. N. Q. DE; PEREIRA, V. A.; STEFANI, R. Application of chitosan matrix for delivery of rutin. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 561–566, 2017.

ASSAINAR, S. K.; NAIR, S. P. Action of Chitosan and its derivatives on clinical pathogens. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 10, p. 748–759, 2014.

ÁVILA FILHO, S. H.; FERREIRA, P. G. C.; FARES, N. B.; SILVA, L. A. F. Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.12, p.95250-95270, 2020.

AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug discovery today**, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n.3, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M. E. Chemical modification of chitosan: synthesis and biological activity of new heterocyclic chitosan derivatives. **Polymer International**, v. 57, n. 2, p. 254-261, 2008.

BAHMANI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; HASSANZADAZAR, H.; TAHERIKALANI, M. *Pseudomoniasis* phytotherapy: a review on most important Iranian medicinal plants effective on *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian journal of microbiology**, v.8, n.5, 347-350, 2016.

BAKSHI, P. S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELU, K.; KUMAR, N. S. Comparative study on antimicrobial activity and biocompatibility of N-selective chitosan derivatives. **Reactive and Functional Polymers**, v.124, p.149-155, 2018.

BAKSHI, P. S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELU, K.; KUMAR, N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial—a review on recent modifications and applications. **International journal of biological macromolecules**, v.150, p.1072-1083, 2020.

BANO, I.; ARSHAD, M.; YASIN, T.; GHOURI, M. A.; YOUNUS, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. **International journal of biological macromolecules**, v.102, p.380-383, 2017.

BARROS, A. P. H.; MORANTES, M. T. A.; HOYOS, M. I. C.; OSPINO, L. J. M. Preparación de nanopartículas de quitosano modificadas con alginato de sodio con potencial para la liberación controlada de medicamentos. **Revista EIA**, v.3, n.12, p.75-83, 2016.

BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014–2019, 2008.

BECK, B. H.; YILDIRIM-AKSOY, M.; SHOEMAKER, C. A.; FULLER, S. A.; PEATMAN, E. Antimicrobial activity of the biopolymer chitosan against *Streptococcus iniae*. **Journal of Fish Diseases**, v. 42, n. 3, p. 371–377, 2019.

BERLINCK, R. G. S.; BERTONHA, A. F.; TAKAKI, M.; RODRIGUEZ, J. P. The chemistry and biology of guanidine natural products. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 11, p. 1264–1301, 2017.

BERNAL-ROSAS, Y.; OSORIO-MUÑOZ, K.; TORRES-GARCÍA, O. *Pseudomonas aeruginosa*: an emerging nosocomial trouble in veterinary. **Rev.MVZ Córdoba**, v. 20, p. 4937–4946, 2015.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 462–482, 2019.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v.13, n.1, p.42-51, 2015.

BOUCHER, H. W., TALBOT, G. H., BENJAMIN JR, D. K., BRADLEY, J., GUIDOS, R. J., JONES, R. N., MURRAY, B. E.; BONOMO, R. A.; GILBERT, D. 10x'20 progress—development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v.56, n.12, p.1685-1694, 2013.

BRANDENBURG, K. S., RODRIGUEZ, K. J., MCANULTY, J. F., MURPHY, C. J., ABBOTT, N. L., SCHURR, M. J., CZUPRYNSKI, C. J. Tryptophan inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1921-1925, 2013.

BRASSELET, C., PIERRE, G., DUBESSAY, P., DOLS-LAFARGUE, M., COULON, J., MAUPEU, J., VALLET-COURBIN, A.; BAYNAST, H.; DOCO, T.; MICHAUD, P.; DELATTRE, C. Modification of chitosan for the generation of functional derivatives. **Applied Sciences**, v.9, n.7, p.1321, 2019.

CAIXETA, M. A. .; BRAGA, A. .; ALMEIDA, D. .; PINTO, O. .; SANTANA, E. .; NAVES, P. . Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. **Enciclopédia biosfera, [S. l.]**, v. 16, n. 29, 2019.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, 2007.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Revista Processos Químicos**, v. 1, n. 2, p. 9–20, 2007.

CELE, Z. E.; SOMBORO, A. M.; AMOAKO, D. G.; NDLANDLA, L. F.; BALOGUN, M. O. Fluorinated quaternary chitosan derivatives: Synthesis, characterization,

antibacterial activity, and killing kinetics. **ACS Omega**, v. 5, n. 46, p. 29657–29666, 2020.

CHEBA, B. A. Chitin and Chitosan: Marine Biopolymers with Unique Properties and Versatile Applications. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 149–153, 2011.

CHEBA, B. A. Chitosan: Properties, modifications and food nanobiotechnology. **Procedia Manufacturing**, v. 46, n. 2019, p. 652–658, 2020.

CHEN, C. Y.; LIN, H. C.; HUANG, Y. Y.; CHEN, K. L.; HUANG, J. J.; YEH, M. Y.; WONG, F. F. “One-flask” transformation of isocyanates and isothiocyanates to guanidines hydrochloride by using sodium bis(trimethylsilyl)amide. **Tetrahedron**, v. 66, n. 10, p. 1892–1897, 2010.

CHOI, C.; NAM, J. P.; NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1–10, 2016.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.

CORRÊA, J. M.; PENAFORT, J. M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia sp.*(CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 12, p. 1-11, 2011.

CRINI, G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 4, p. 1623–1643, 2019.

DAI, T.; TANAKA, M.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 7, p. 857–879, 10 jul. 2011.

DALLA COSTA, K. A.; FERENZ, M.; DA SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 2, p. 75-82, 2016.

DELEZUK, J. A. M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultra-som de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo - USP, 2009.

DIAS, A. M. **Derivados anfifílicos de quitosana como agentes antimicrobianos : estudo da atividade e mecanismo de ação**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual Paulista - Unesp, 2017.

DO ESPIRITO SANTO, R. D.; VELÁSQUEZ, Á. M. A.; PASSIANOTO, L. V. G.; SEPULVEDA, A. A. L.; DA COSTA CLEMENTINO, L.; ASSIS, R. P.; BAVIERA, A. M.; KALABA, P.; SANTOS, F. N. D.; ÉBERLIN, M. N.; SILVA, G. V. J.; ZEHL, M.;

LUBEC, G.; GRAMINHA, M. A. S.; GONZÁLEZ, E. R. P. N, N' N"-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 116–128, 2019.

DOUSSEAU, S.; RODRIGUES, A. C.; LIRA, J. M. S.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PACHECO, F. V.; ALVARENGA, A. A. D.; RESENDE, M. L. V.; PAULA, A. C. C. F. F. D. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. Exogenous chitosan application on antioxidant systems of jaborandi. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 191–197, 2016.

ESCAMILLA-GARCÍA, E.; ALCÁZAR-PIZAÑA, A. G.; SEGOVIANO-RAMÍREZ, J. C.; ANGEL-MOSQUEDA, D.; LÓPEZ-LOZANO, A. P.; CÁRDENAS-ESTRADA, E.; DE LA GARZA-RAMOS, M. A.; MEDINA-DE LA GARZA, C. E.; MÁRQUEZ, M. Antimicrobial Activity of a Cationic Guanidine Compound against Two Pathogenic Oral Bacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2017, p. 1-9, 2017.

FRINDY, S.; EL KADIB, A.; LAHCINI, M.; PRIMO, A.; GARCÍA, H. Isotropic and Oriented Copper Nanoparticles Supported on Graphene as Aniline Guanylation Catalysts. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 6, p. 3863–3869, 2016.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: Occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 10 SUPPL. 2, 2001.

GOMES, Amenson Trindade. **Guanilação de tiouréias empregando micro-ondas na síntese de guanidinas e 5-aminotetrazóis catalisada por sais de bismuto**. Tese de doutorado (doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, 2014.

GONÇALVES, R. C. **Toxicidade e atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos na formação de biofilmes por bactérias Gram-negativas**. Dissertação (mestrado em Ciências Moleculares) Universidade Estadual de Goiás - UEG, 2015.

GONSALVES, A. D. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. D. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GUEVARA, A.; SAHAI, J. M.; TEDESCO-MAIULLARI, R. Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo- $\beta$ -lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, n. 35, p. 77–82, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUPTA, J. Biological activities of marine guanidine alkaloids. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

HA, D.-G.; O'TOOLE, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, p. 1–12, 2020.

HALDORAI, Y.; SHIM, J. Novel chitosan-TiO<sub>2</sub> nanohybrid: Preparation, characterization, antibacterial, and photocatalytic properties. **Polymer Composites**, v. 35, n. 2, p. 327-333, 2014.

HAMED, A. A.; ABDELHAMID, I. A.; SAAD, G. R.; ELKADY, N. A.; ELSABEE, M. Z. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of a novel chitosan Schiff bases based on heterocyclic moieties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 492–501, 2020.

HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2–3, p. 235–244, 2001.

HORCAJADA, J. P., MONTERO, M., OLIVER, A., SORLÍ, L., LUQUE, S., GÓMEZ-ZORRILLA, S.; BENITO, N.; GRAU, S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. 1–52, 2019.

HOSOYA, K.; ODAGI, M.; NAGASAWA, K. Guanidine organocatalysis for enantioselective carbon-heteroatom bond-forming reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 8, p. 687–696, 2018.

HU, L.; MENG, X.; XING, R.; LIU, S.; CHEN, X.; QIN, Y.; YU, H.; LI, P. Design, synthesis and antimicrobial activity of 6-N-substituted chitosan derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 18, p. 4548–4551, 2016.

HU, Y.; DU, Y.; YANG, J.; KENNEDY, J. F.; WANG, X.; WANG, L. Synthesis, characterization and antibacterial activity of guanidinylated chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 1, p. 66–72, 2007.

HURT, A. P.; KOTHA, A. K.; TRIVEDI, V.; COLEMAN, N. J. Bioactivity, biocompatibility and antimicrobial properties of a chitosan-mineral composite for periodontal tissue regeneration. **Polimeros**, v. 25, n. 3, p. 311–316, 2015.

ISHIKAWA, T. **Superbases for organic synthesis: Guanidines, Amidines, Phosphazenes and Related Organocatalysts**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 2009. 326 p.

ISLAM, S.; BHUIYAN, M. A. R.; ISLAM, M. N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, n. 3, p. 854–866, 2017.

JACKSON, N.; CZAPLEWSKI, L.; PIDDOCK, L. J. V. Discovery and development of new antibacterial drugs: Learning from experience? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1452–1459, 2018.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Use of chitosan and its derivatives in cosmetics. **H&PC Today**, v. 9, n. 6, p. 20–24, 2015.

JONES, M.; KUJUNDZIC, M.; JOHN, S.; BISMARCK, A. Crab vs. Mushroom: A review of crustacean and fungal chitin in wound treatment. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 64, 2020.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 1, p. S44–S51, 2017.

KAMARUZZAMAN, N. F.; TAN, L. P.; HAMDAN, R. H.; CHOONG, S. S.; WONG, W. K.; GIBSON, A. J.; CHIVU, A.; PINA, M. D. F. Antimicrobial polymers: The potential replacement of existing antibiotics? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, 2019.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Chitinases. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2017. p. 335-368.

KAYA, M.; MUJTABA, M.; EHRlich, H.; SALABERRIA, A. M.; BARAN, T.; AMEMIYA, C. T.; GALLI, R.; AKYUZ, L.; SARGIN, I.; LABIDI, J. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, p. 177–186, 2017.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988–2012, 2010.

KIM, S. Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities. **International Journal of Polymer Science**, v. 2018, 2018.

KIM, S. K.; LEE, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 71–85, 2016.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203–226, 2006.

LI, J.; ZHUANG, S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. **European Polymer Journal**, v. 138, n. July, p. 109984, 2020.

LI, RUILIAN.; YUAN, X.; WEI, J.; ZHANG, X.; CHENG, G.; WANG, Z. A.; DU, Y. Synthesis and evaluation of a chitosan oligosaccharide-streptomycin conjugate against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Marine drugs**, v. 17, n. 1, p. 43, 2019.

LUO, J.; DONG, B.; WANG, K.; CAI, S.; LIU, T.; CHENG, X.; LEI, D.; CHEN, Y.; LI, Y.; KONG, J.; CHEN, Y. Baicalin inhibits biofilm formation, attenuates the quorum sensing-controlled virulence and enhances *Pseudomonas aeruginosa* clearance in a mouse peritoneal implant infection model. **PLoS one**, v. 12, n. 4, p. e0176883, 2017.



MA, Y.; DE, S.; CHEN, C. Syntheses of cyclic guanidine-containing natural products. **Tetrahedron**, v. 71, n. 8, p. 1145–1173, 2015.

MATICA, A.; MENGHIU, G.; OSTAFE, V. Antibacterial properties of chitin and chitosans. **New Frontiers in Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 39–54, 2017.

MELIANI, A.; BENSOLTANE, A. Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. **Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences**, v. 3, n. 1, p. 2-7, 2015.

MENDONÇA, R. C. S.; MORELLI, A. M. F.; PEREIRA, J. A. M.; DE CARVALHO, M. M.; DE SOUZA, N. L. Prediction of *Escherichia coli* O157: H7 adhesion and potential to form biofilm under experimental conditions. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 389-396, 2012.

MOEINI, A.; PEDRAM, P.; MAKVANDI, P.; MALINCONICO, M.; D'AYALA, G. G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 233, n. 1, p. 1–16, 2020.

MOLINA-SALINAS, G. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 633–638, 2006.

MONTER-MIRANDA, J.; TIRADO-GALLEGOS, J.; ZAMUDIO-FLORES, P.; RIOS-VELASCO, C.; ORNELAS-PAZ, J. DE J.; SALGADO-DELGADO, R.; ESPINOSA-SOLIS, V.; HERNÁNDEZ-CENTENO, F. Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 15, n. 3, p. 749–761, 2016.

MORGANTI, P.; COLTELLI, M.-B. A new carrier for advanced cosmeceuticals. **Cosmetics**, v. 6, n. 10, p. 1–18, 2019.

MUJTABA, M.; KHAWAR, K. M.; CAMARA, M. C.; CARVALHO, L. B.; FRACETO, L. F.; MORSI, R. E.; ELSABEE, M. Z.; KAYA, M.; LABIDI, J.; ULLAH, H.; WANG, D. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 154, p. 683–697, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1–24, 2016.

MUNTEANU, C.; DUMITRAȘCU, M.; SC, Biosafety SRL-D. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, v. 2, n.4, p. 119-122, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A. Introduction.. *In: Chitin*. 1. Ed. England: Pregamon Press Ltd., 1977. p. 326.

NARISAWA, N.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. Estimation of the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12 by the cell number. **Journal**

of **bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 78-80, 2005.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 5, n. 2, p. 381–392, 2000.

NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M., RUIZ, V.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. D. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, n. 2, p. 86–91, 2008.

NGUYEN, L.; GARCIA, J.; GRUENBERG, K.; MACDOUGALL, C. Multidrug-Resistant *Pseudomonas* Infections: Hard to Treat, But Hope on the Horizon? **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 8, 2018.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 337–342, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Who publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 27 set. 2020.

OTOBONI, A. M. M. B. Estudo de exopolissacarídeos de bactérias fitopatogênicas. **Revista científica eletrônica de agronomia – ISSN: 1677-0293 Ano VI – Número 11 – Junho de 2007**.

OUYANG, Q.; ZHAO, S.; LI, S. D.; SONG, C. Application of chitosan, chitooligosaccharide, and their derivatives in the treatment of Alzheimer’s disease. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, p. 1–15, 2017.

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T. J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177–192, 2019.

PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 417–426, 2015.

PATTARAWARAPAN, M.; JAITA, S.; WANGNGAE, S.; PHAKHODEE, W. Ultrasound-assisted synthesis of substituted guanidines from thioureas. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 12, p. 1354–1358, 2016.

PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M. Chitin and chitosan: Major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2008. v. 1p. 517–542.

PEREIRA, L. A.; DA SILVA REIS, L.; BATISTA, F. A.; MENDES, A. N.; OSAJIMA, J. A.; SILVA-FILHO, E. C. Biological properties of chitosan derivatives associated with the ceftazidime drug. **Carbohydrate polymers**, v. 222, p. 115002, 2019.

PIMENTEL, M. P.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O Uso de *Artemia sp.* como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15–22, 2011.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRAGASAM, A. K.; VEERARAGHAVAN, B.; NALINI, E.; ANANDAN, S.; KAYE, K. An Update on Antimicrobial Resistance and the Role of Newer Antimicrobial Agents for *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 303–316, 2018.

QIAN, L.; GUAN, Y.; HE, B.; XIAO, H. Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. **Polymer**, v. 49, n. 10, p. 2471–2475, 2008.

QIN, Y.; LI, P.; GUO, Z. Cationic chitosan derivatives as potential antifungals: A review of structural optimization and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, n. November 2019, p. 116002, 2020.

QUEIROZ, G. M. DE.; DA SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132–138, 2012.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457–1465, 2003.

RAHMAN, A.-; CHOUDHARY, M. I.; THOMSON, W. J. **Bioassay Techniques for Drug Development**. Singapore: Taylor & Francis e-Library, 2005. p. 240.

RAMESHTHANGAM, P.; SOLAIRAJ, D.; ARUNACHALAM, G.; RAMASAMY, P. Chitin and Chitinases: Biomedical And Environmental Applications of Chitin and its Derivatives. **Journal of Enzymes**, v. 1, n. 1, p. 20–43, 2018.

RASAMIRAVAKA, T.; LABTANI, Q.; DUEZ, P.; EL JAZIRI, M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1, 2015.

REN, W.; CHENG, W.; WANG, G.; LIU, Y. Developments in antimicrobial polymers. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 632–639, 2017.

RIEGGER, B. R.; BÄURER, B.; MIRZAYEVA, A.; TOVAR, G. E.; BACH, M. A systematic approach of chitosan nanoparticle preparation via emulsion crosslinking as potential adsorbent in wastewater treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 46–54, 2018.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.

RIVAS, K. A. C.; TORREALBA, M. V. B.; ALVARADO, R. A. S.; MONTIEL, M. Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 35, n. 2, p. 83–88, 2015.

ROCHA, M. A. M.; COIMBRA, M. A.; NUNES, C. Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. **Current Opinion in Food Science**, v. 15, p. 61–69, 2017.

RODRIGUES, F. C.; SINGH, K.; THAKUR, G. Pharmaceutical Application of Chitosan Derivatives. In: NAYAK, A. K.; HASNAIN, M. S.; PAL, D. (Ed.). **Natural Polymers for Pharmaceutical Applications. Volume 2: Marine and Microbiologically Derived Polymers**.[s.l.]. Taylor & Francis. 2020. p.141–163.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. **Journal of food Protection**, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

ROSHANI-ASL, P.; RASHIDI, N.; SHOKOOHIZADEH, L.; ZAREI, J. Relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and *lasB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Clinical Laboratory**, v. 64, n. 9, p. 1477–1484, 2018.

ROY, J. C.; SALAUN, F.; GIRAUD, S.; FERRI, A.; CHEN, G.; GUAN, J. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In: Xu, Z. (Ed.). **Solubility of Polysaccharides**. Croatia:Intech. 2017. p.109-127.

RUSTICI, V. C. F.; CARAMORI, G. F.; GALEMBECK, S. E. Efeitos de substituintes na ligação de hidrogênio do 3-hidroxipropenal. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1187–1192, dez. 2006.

SACZEWSKI, F.; BALEWSKI, Ł. Biological activities of guanidine compounds, 2008-2012 update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 23, n. 8, p. 965–995, 2013.

SAFEYAH, A.; MAQBUL, M. S.; SAFEYAH, M. Role of *Pseudomonas aeruginosa* in Nosocomial Infection. **International Journal of Healthcare Sciences**, v. 6, n. 1, p. 211–217, 2018.

SAHARIAH, P.; ÓSKARSSON, B. M.; HJÁLMARSDÓTTIR, M. Á.; MÁSSON, M. Synthesis of guanidinylated chitosan with the aid of multiple protecting groups and investigation of antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 407–417, 2015.

SALAMA, H. E.; SAAD, G. R.; SABAA, M. W. Synthesis, characterization, and biological activity of cross-linked chitosan biguanidine loaded with silver nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 18, p. 1880–1898, 2016.

SALEH, T. H.; HASHIM, S.; AL-OBAIDI, R. A. A.; AL-RUBAILI, B. A. L. A biological study of chitinase produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of ChiA responsible gene. **International Journal Of Research In Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p.1318-1330, 2020.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 5, p. 1–8, jun. 2016.

SANTOS, A. P. **Perfil de rastreamento de resistência das *Pseudomonas aeruginosa* e acompanhamento da rotina educacional**. Dissertação (mestrado em ciências da saúde) Universidade Federal de Goiás, 2018.

SHARMA, B. K., SAHA, A., RAHAMAN, L., BHATTACHARJEE, S., TRIBEDI, P. Silver inhibits the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Advances in**

**Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 677, 2015.

SARWAR, A.; KATAS, H.; SAMSUDIN, S. N.; ZIN, N. M. Regioselective sequential modification of chitosan via azide-alkyne click reaction: Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of chitosan derivatives and nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 2015.

ŞENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467–1480, 2004.

SETTE-DE-SOUZA, P. H.; MEDEIROS, F. D. D.; PINTO, M. G. D. O.; QUEIROZ, J. C.; SOUSA, R. I. M. D.; BENTO, P. M.; MELO, D. P. D.; ALVES, P. M.; MEDEIROS, A. C. D. D. Antimicrobial potential of chitosan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 09, n. 3, p. 147–154, 2015.

SHARIATINIA, Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1406–1419, 2018.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, 2019.

SILVA, D. D. S. E. **Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo- USP, 2011.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 73-74, 2008.

SILVA, L. C. A.D; DO NASCIMENTO PESSOA, D. A.; MAIA, L. Â.; MATOS, R. A. T.; DA SILVA MACÊDO, M. M. Systemic Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–5, 2016.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

SIQUEIRA, J. M. DE.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii* - Annonaceae, Biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia Salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557–559, 1998.

SOUSA, Á. F. L. D.; MARQUES, D. M.; MONTEIRO, R. M.; QUEIROZ, A. A. F. L.; ANDRADE, D.; WATANABE, E. Prevenção da formação de biofilmes em marcapassos artificiais: é viável? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, n. 6, p. 644–650, 2017.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

STERN, R. Go fly a chitin: The mystery of chitin and chitinases in vertebrate tissues. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 22, n. 4, p. 580–595, 2017.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, B.; DEMEO, P.; SHIRTLIFF, M.; GAWALT, E.; KATHJU, S. Biofilms, biomaterials, and device-related infections. *In*: MODJARRAD, K.; EBNESAJJAD, S (Ed.). **Handbook of polymer applications in medicine and medical devices**. [s.l.]. William Andrew Publishing, 2013. p. 77-101.

STREETER, K.; KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 25–32, 2016.

SUBHASWARAJ, P.; BARIK, S.; MACHA, C.; CHIRANJEEVI, P. V.; SIDDHARDHA, B. Anti quorum sensing and anti biofilm efficacy of cinnamaldehyde encapsulated chitosan nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, n. August, p. 752–759, 2018.

TACHABOONYAKIAT, W. Antimicrobial applications of chitosan. *In* JENNINGS, J. A.; BUMGARDNER, J. D. (Ed.). : **Chitosan Based Biomaterials Volume 2**. [s.l.]: Elsevier, 2017. v. 2p. 245–274.

TAMER, T. M.; HASSAN, M. A.; OMER, A. M.; BASET, W. M. A.; HASSAN, M. E.; EL-SHAFFEEY, M. E. A.; ELDIN, M. S. M. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of two aromatic chitosan Schiff base derivatives. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1721–1730, 2016.

TAN, C. H.; COLES, M. The Chemistry of Guanidine, Guanidinium, and Guanidinate Compounds. **Australian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 963–964, 2014.

TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.

TAYLOR, P. C.; SCHOENKNECHT, F. D.; SHERRIS, J. C.; LINNER, E. C. Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for *Staphylococcus aureus*: Influence and significance of technical factors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 23, n. 1, p. 142–150, 1983.

VASYUKOVA, N. I.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; CHALENKO, G. I.; GERASIMOVA, N. G.; L'VOVA, A. A.; IL'INA, A. V.; LEVOV, A. N.; VARLAMOV, V. P.; TARCHEVSKY, I. A. Immunomodulating activity of chitosan derivatives with salicylic acid and its fragments. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 46, n. 3, p. 346-351, 2010.

VARLAMOV, V. P.; MYSYAKINA, I. S. Chitosan in Biology, Microbiology, Medicine, and Agriculture. **Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 712–715, 2018.

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743–1750, 2015.

VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VIEIRA, C. L.; NETO, F. O. S.; CARVALHO-SILVA, V. H.; SIGNINI, R. Design of apolar chitosan-type adsorbent for removal of Cu(II) and Pb(II): An experimental and DFT viewpoint of the complexation process. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 3, p. 103070, 2019.

WANG, W.; XUE, C.; MAO, X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4532–4546, 2020.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

WU, D.; XU, X. Exploring cutting-edge hydrogel technologies and their biomedical applications. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 4, p. 446–447, 2018.

XU, R.; AOTEGEN, B.; ZHONG, Z. Synthesis, characterization and biological activity of C<sub>6</sub>-Schiff bases derivatives of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1563–1571, 2017.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; CHEN, D.; LI, B.; LI, L.; DENG, Y. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Current microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016.

YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133–1174, 2015.

ZAMPERINI, C.; MACCARI, G.; DEODATO, D.; PASERO, C.; D'AGOSTINO, I.; OROFINO, F.; DE LUCA, F.; DREASSI, E.; DOCQUIER, J. D.; BOTTA, M.

Identification, synthesis and biological activity of alkyl-guanidine oligomers as potent antibacterial agents. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

ZARAYNEH, S.; SEPAHI, A. A.; JONOABI, M.; RASOULI, H. Comparative antibacterial effects of cellulose nanofiber, chitosan nanofiber, chitosan/cellulose combination and chitosan alone against bacterial contamination of Iranian banknotes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1045–1054, 2018.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.

ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: An overview. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012.

ZHU, D.; CHENG, H.; LI, J.; ZHANG, W.; SHEN, Y.; CHEN, S.; GE, Z.; CHEN, S. Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 79–84, 2016.

ZILLE, A.; ALMEIDA, L.; AMORIM, T.; CARNEIRO, N.; ESTEVES, M. F.; SILVA, C. J.; SOUTO, A. P. Application of nanotechnology in antimicrobial finishing of biomedical textiles. **Materials Research Express**, v. 1, n. 3, 2014.