



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS
EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS MOLECULARES**



**TOXICIDADE E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA
CARBOXIMETILQUITOSANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM
SAIS METÁLICOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS**

Anápolis-GO

2015

RANDYS CALDEIRA GONÇALVES

**TOXICIDADE E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA
CARBOXIMETILQUITOSANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM
SAIS METÁLICOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Dr. Plínio Lázaro Faleiro Nunes

Co-orientadora: Dra. Roberta Signini

Anápolis-GO

2015

TOXICIDADE E ATIVIDADE INIBITÓRIA DA CARBOXIMETILQUITOSANA
ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM SAIS METÁLICOS NA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

RANDYS CALDEIRA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada em 20/02/2015 por:



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves (UEG)



Profa. Dra. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet (UEG)



Profa. Dra. Cleide Sandra Tavares Araújo (UEG)

ANÁPOLIS – GO
FEVEREIRO 2015

RESUMO

A busca de alternativas no controle de micro-organismos patogênicos constitui-se em um interessante campo de estudo. Dentre as novas abordagens, encontra-se a investigação da ação antimicrobiana por compostos naturais combinados com sais metálicos. Neste contexto, objetivou-se avaliar a atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada ou em combinação com nitrato de prata, sulfato de cobre e sulfato de zinco sobre a formação de biofilme por cepas-padrão de bactérias Gram-negativas. Neste estudo foram realizadas a síntese e caracterização da carboximetilquitosana, a determinação da toxicidade dos compostos isolados e em combinação pelo teste de letalidade de *Artemia salina*, a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e o impacto dos compostos isolados e em combinação na formação de biofilme por meio da detecção da biomassa total e do metabolismo de células associadas ao biofilme na presença de concentrações subinibitórias dos compostos. O grau de substituição médio da carboximetilquitosana, determinado pela titulação potenciométrica, foi de 1,87 e a espectroscopia de infravermelho permitiu a confirmação da ocorrência da reação de síntese. A carboximetilquitosana não apresentou toxicidade para *Artemia salina*, os sais apresentaram grau variável de toxicidade, sendo observadas reduções significativas da toxicidade dos sais quando combinados com a carboximetilquitosana. A carboximetilquitosana apresentou CMI $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, o nitrato de prata isolado e em combinação com a carboximetilquitosana apresentou CMI $= 7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, o sulfato de cobre isolado e em combinação exibiu CMI $= 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o sulfato de zinco isolado e em combinação CMI $= 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto este composto não apresentou CMI contra *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações testadas. Identificou-se inibição significativa da formação do biofilme na presença de concentrações subinibitórias dos sais e da carboximetilquitosana isolada e em combinação com os sais, sendo detectado que os sais foram mais ativos na inibição quando comparada com a carboximetilquitosana isolada. Contudo, a carboximetilquitosana combinada com os sais apresentou melhor ação inibitória quando comparada ao polímero isolado, indicando uma possível potencialização do efeito. Os resultados encontrados sugerem que as concentrações subinibitórias dos compostos estudados foram eficazes contra a formação de biofilme tanto da biomassa total quanto no metabolismo das células associadas a esta estrutura.

Palavras chaves: carboximetilquitosana, sais metálicos, toxicidade, biofilme, atividade antimicrobiana.

Abstract

The investigation for alternatives in the control of pathogenic micro-organisms is an interesting field of study. Among the new approaches is the investigation of the antimicrobial action of natural compounds combined with metallic ions. In this context, the objective was to evaluate the inhibitory activity of isolated carboxymethylchitosan or in combination with silver nitrate, copper sulfate and zinc sulfate on biofilm formation by standard strains of Gram-negative bacteria. In this study included the synthesis and characterization of carboxymethylchitosan, determination of the toxicity of the compounds alone and in combination by brine shrimp lethality test, determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the impact of the isolated compounds and in combination on biofilm formation by detecting the total biomass and cell metabolism associated with the presence of subinhibitory concentrations of the compounds. The average degree of substitution of carboxymethylchitosan, as determined by potentiometric titration, was 1.87 and infrared spectroscopy allowed confirmation of the presence of the synthesis reaction. The carboxymethyl-chitosan did not show toxicity to brine shrimp, and salts showed varying degrees of toxicity being observed a reduction of the toxic effects of salts when combined with carboxymethylchitosan. The carboxymethylchitosan had MIC > 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, the silver nitrate alone and in combination with carboxymethylchitosan CMI = 7.8 $\mu\text{g L}^{-1}$, in isolated and copper sulphate in combination MIC = 500 mg L^{-1} and zinc sulfate alone and in combination CMI = 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, except for *Pseudomonas aeruginosa* which zinc sulfate showed no CMI at the tested concentrations. We identified a significant inhibition of biofilm formation in the presence of carboxymethylchitosan alone and in combination with salts, isolated and detected that the carboxymethylchitosan was the most active in the inhibition by the combination compared with the salts. However, the carboxymethylchitosan combined with the salts showed better inhibitory action when compared to the isolated salts, indicating a possible increase of effect. The results suggest that sub-inhibitory concentrations of these compounds were effective against both the total biomass and the metabolism of the cells associated with biofilm.

Keywords: carboxymethylchitosan, metal salts, toxicity, biofilm, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
3.1 QUITINA E QUITOSANA.....	5
3.2 CARBOXIMETILQUITOSANA.....	9
3.3 BIOENSAIO COM <i>Artemia salina</i>	12
3.4 BIOFILMES MICROBIANOS.....	14
3.4.1 Conceito e aspectos gerais.....	14
3.4.2 Composição dos biofilmes.....	15
3.4.3 Formação do biofilme.....	17
3.5 CARACTERIZAÇÕES DAS BACTÉRIAS ESTUDADAS.....	19
3.5.1 Características gerais de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
3.5.2 Características gerais de <i>Escherichia coli</i>	22
3.5.3 Características gerais de <i>Burkholderia cepacia</i>	23
3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÍONS METÁLICOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA.....	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA.....	27
4.2.1 Grau de substituição.....	27
4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho.....	29
4.3 TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i>	29
4.4. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	31
4.4.1 Micro-organismos utilizados no estudo.....	31
4.4.2 Manutenção e reativação das cepas estudadas.....	31
4.4.3 Formação de biofilme: determinação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias) e atividade metabólica de bactérias associadas.....	32
4.4.4 Determinação da concentração mínima inibitória.....	34
4.4.5 Avaliação da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes.....	36
4.4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40

5.1 SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA E RENDIMENTO DA REAÇÃO.....	40
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA	42
5.2.1 Grau de substituição	42
5.2.2 Espectroscopia do infravermelho	44
5.3 ENSAIO DE TOXIDADE COM <i>Artemia salina</i>	45
5.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA	47
5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME	53
5.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	55
5.6 REDUÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO BIOFILME NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DOS COMPOSTOS	58
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Esquema das estruturas dos polímeros quitina e quitosana.	6
Figura 2. Derivados carboximetilados da quitosana.....	10
Figura 3. Etapas dos estágios de formação do biofilme bacteriano.....	17
Figura 4. Principais etapas da síntese carboximetilquitosana.....	27
Figura 5. Representação esquemática da titulação potenciométrica da carboximetilquitosana.....	28
Figura 6. Esquema do ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	30
Figura 7. Esquema do ensaio para a determinação de biomassa total pelo método do cristal violeta.	33
Figura 8. Esquema do ensaio para a determinação da atividade metabólica pelo método da resazurina.....	34
Figura 9. Esquema do ensaio de determinação da atividade metabólica pelo método de resazurina.....	36
Figura 10. Esquema do ensaio da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes pelo método cristal violeta.....	37
Figura 11. Esquema do ensaio da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes pelo método resazurina.....	38
Figura 12. Representação esquemática da síntese da carboximetilquitosana: quitosana (I), quitosana alcalina (II), ácido monocloroacético (III), carboximetilquitosana (IV)	41
Figura 13. (a) Curva potenciométrica da carboximetilquitosana e (b) derivada de primeira ordem dessa curva.	42
Figura 14. Reações da desprotonação dos grupos funcionais aminos e ácido carboxílico da Carboximetilquitosana.....	43
Figura 15. Espectros das análises de infravermelho para carboximetilquitosana e quitosana.	45
Figura 16. Placas dos ensaios antimicrobianos revelado com resazurina 0,01%.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de cada composto testado nos ensaios de determinação da CMI.....	35
Tabela 2. Concentrações subinibitórias dos compostos testados na determinação da atividade inibitória da formação de biofilme.	39
Tabela 3. Toxicidade dos compostos expressada como concentração letal para 50% (CL ₅₀) das larvas de <i>Artemia salina</i>	46
Tabela 4. Concentração mínima inibitória da carboximetilquitosana e dos sais isolados e em combinação.	48
Tabela 5. Classificação da Formação de biofilme pelas bactérias estudadas.	53
Tabela 6. Porcentagem de inibição da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias dos compostos isolados, comparada aos controles sem os compostos pelo método de determinação da biomassa total com cristal violeta.	56
Tabela 7. Porcentagem de inibição da formação de biofilme na presença de carboximetilquitosana 500 µg mL ⁻¹ combinada com os sais, comparada aos controles sem os compostos pelo método de determinação da biomassa total com cristal violeta.	57
Tabela 8. Porcentagem de redução da atividade metabólica das bactérias associadas ao biofilme na presença de concentrações subinibitórias da carboximetilquitosana e dos sais isolados, comparada aos controles sem os compostos pelo método da resazurina.	59
Tabela 9. Porcentagem de redução da atividade metabólica das bactérias associadas ao biofilme na presença de carboximetilquitosana 500 µg mL ⁻¹ combinada com os sais, comparada aos controles sem os compostos pelo método da resazurina.	60

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AgNO₃ – Nitrato de prata

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Caldo *Brain Heart Infusion*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ – Concentração letal de 50%

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMQ – Carboximetilquitosana

CuSO₄ – Sulfato de cobre

DMSO - Dimetilsulfóxido

SFE – Solução fisiológica estéril

UFC – Unidades formadoras de colônia

ZnSO₄ – Sulfato de zinco

1 INTRODUÇÃO

No decorrer dos anos, o notável avanço do setor farmacêutico levou ao desenvolvimento de diversas drogas com potencial antimicrobiano. Contudo, a ansiedade de vencer os agentes causadores das infecções levou ao uso abusivo e incorreto desses fármacos (JACOBY, 2008), ocasionando o aumento da frequência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais, implicando na ocorrência de infecções graves e de difícil tratamento (SANCHEZ, 2006; GURGEL e CARVALHO, 2008).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais é um importante problema de saúde pública mundial, ameaçando a eficácia da terapêutica empregada para as doenças de etiologia bacteriana, com graves consequências de morbidade e mortalidade em hospitais, aumento no tempo de internação e perdas econômicas para as instituições de saúde (SANCHEZ, 2006; GURGEL e CARVALHO, 2008, NEIDELL et al., 2012).

Além desses aspectos, a capacidade da maioria dos patógenos de crescer como biofilme, aumenta a resistência aos agentes antimicrobianos (MAH e O' TOOLE, 2001; STEWART e COSTERTON, 2001; JEFFERSON, 2004) em decorrência de taxas de crescimento lento dos micro-organismos em seu interior (DOLAN, 2001), dificuldade de penetração dos antimicrobianos no interior dessas comunidades (STEWART e COSTERTON, 2001) e mecanismos de inativação exercida pela matriz extracelular que envolve o biofilme (HOYLE e COSTERTON, 1991). Além disso, tem sido demonstrado que o crescimento microbiano associado a biofilmes é capaz de reduzir significativamente a ação de mecanismos inatos do sistema imunológico do hospedeiro, como a ação de células fagocitárias, imunoglobulinas e bloqueio da ativação do sistema complemento (HOYLE e COSTERTON, 1991). Dentro deste contexto, as populações bacterianas em colônias que formam biofilmes são mais virulentas (MAH e O'TOOLE, 2001) o que torna as infecções difíceis de serem tratadas.

É importante ainda mencionar que infecções associadas a biofilmes geralmente são crônicas, lentas, resistentes aos tratamentos e de natureza recorrente. Notoriamente, a terapia antimicrobiana convencional elimina predominantemente as células planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento (BARCAT, 2005).

Especula-se que diferentes dispositivos médicos implantados (permanentes e temporários) e manuseáveis como válvulas cardíacas, dispositivos intrauterinos, catéteres, próteses articulares e lentes de contato, apresentam susceptibilidade para formação de biofilmes (COSTERTON et al., 1994; HALL-STOODLEY et al., 2004; CERNOHORSKA e VOTAVA, 2008; OLIVEIRA, 2011). Além disso, estudos relatam a associação entre biofilmes microbianos e várias infecções crônicas e persistentes, como infecções oculares (SILVA, 2012) infecções dentárias e periodontais (ETO, RASLAN e CORTELLI, 2003), infecções pulmonares (COSTERTON et al., 1994) e fibrose cística (DONLAN, COSTERTON, 2002). Estima-se que mais de 60% dos casos relacionados a infecções microbianas estão relacionados à formação de biofilmes sobre dispositivos médicos (MULCAHY et al., 2008; KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009; AMINI et al., 2011).

Quitosana e seu derivado de natureza hidrofílico, a carboximetilquitosana, estão entre os produtos naturais de origem animal não agressivos ao meio ambiente e de baixo custo, de grande interesse devido à possibilidade de empregá-las como agentes antimicrobianos (ZHU et al., 2007; MILIOLI, 2011).

A propriedade antimicrobiana da quitosana é amplamente relatada sobre inúmeros micro-organismos, sendo destacada sua ação sobre *Listeria ivanovii* (HÉQUET et al., 2011), *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ et al., 2010), *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* (TANG et al., 2010). Apesar da existência da descrição da atividade antimicrobiana da quitosana sobre uma variada gama de micro-organismos potencialmente patogênicos ao ser humano, atualmente, existem poucas investigações sobre esta atividade para a carboximetilquitosana, destacando-se os trabalhos de Zhu et al. (2007), Anitha et al. (2009) e Martins (2010). Entretanto, quanto ao efeito da carboximetilquitosana na formação de biofilmes bacterianos, os estudos são ainda mais escassos e poucos podem ser citados como exemplos, destacando-se o trabalho de TANA et al. (2011).

Do mesmo modo, tem sido relatado na literatura, o efeito antimicrobiano de diferentes íons metálicos, com destaque para nanopartículas, ligas metálicas e sais (MICHELS et al., 2005 e 2008 e WILKS, MICHELS e KEEVIL, 2005; DURAN et al., 2005 e 2010; ZHU et al., 2012; STEINDL et al., 2012; SANTO et al., 2012; WARNES e KEEVIL, 2011).

Diversos estudos têm reportado o emprego de diferentes íons metálicos, em produtos farmacêuticos destinados ao tratamento de doenças infecciosas por possuir atividade antimicrobiana (LI et al., 2003; EFTHIMIADOU, KARALIOT e PSOMAS, 2008; RAI et al. 2009). Nos últimos anos, várias pesquisas têm demonstrado que metais adicionados a

antibióticos são frequentemente mais ativos que a droga livre e, em alguns casos, os complexos possuem propriedades terapêuticas potencializadas quando comparados aos antibióticos isolados (ROCHA et al., 2011).

Estudos, como o realizado por Milioli (2011), têm destacado a combinação de produtos naturais com substâncias inorgânicas (Ag, Cu, Zn e etc) na obtenção de compostos com atividade antimicrobiana potencializada. Contudo, a combinação de produtos naturais com diferentes íons metálicos com o objetivo de potencializar a ação antimicrobiana sobre linhagens bacterianas, ainda é pouco informada na literatura.

A possibilidade de interação sinérgica de produtos naturais com substâncias inorgânicas, como sais metálicos, sobre linhagens bactérias pode ser uma nova estratégia no controle microbiológico. Desta forma, justificam-se os estudos com objetivo de obter novas drogas antibacterianas contendo sais metálicos em composição.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade e a atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada ou em combinação com sais metálicos sobre a formação de biofilme por cepas-padrão de bactérias Gram-negativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar a carboximetilquitosana;
- Avaliar a toxicidade da carboximetilquitosana isolada e em combinação com nitrato de prata, sulfato de cobre e sulfato de zinco pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*;
- Determinar a habilidade das cepas padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25312 e *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 em formar biofilme;
- Avaliar a atividade inibitória da carboximetilquitosana isolada e em combinação com nitrato de prata, sulfato de cobre e sulfato de zinco sobre o crescimento e a formação de biofilme pelas cepas padrão.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 QUITINA E QUITOSANA

A quitina (poli (N-acetil-D-glucosamina)), depois da celulose, é o polissacarídeo natural mais abundante na natureza (MOURA, 2008; SANTOS; CIRILO; NUNES, 2011). Esse polímero, isolado pela primeira vez em 1811, pelo professor francês Henri Braconnot (RAVI KUMAR, 2000), é o principal componente estrutural do exoesqueleto de insetos, moluscos crustáceos e parede celular de alguns fungos e leveduras, atuando como reforço, resistência e defesa nos organismos em que ocorrem (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

As principais matérias-primas para produção industrial de quitina são carapaças de caranguejo e cascas de camarão, que são fornecidos em abundância como resíduos da indústria pesqueira voltada para exploração industrial de frutos do mar (JAYAKUMAR et al., 2010), como lagostas, camarões, siri e caranguejos localizadas principalmente nos Estados Unidos e Japão (PAIVA, 2009).

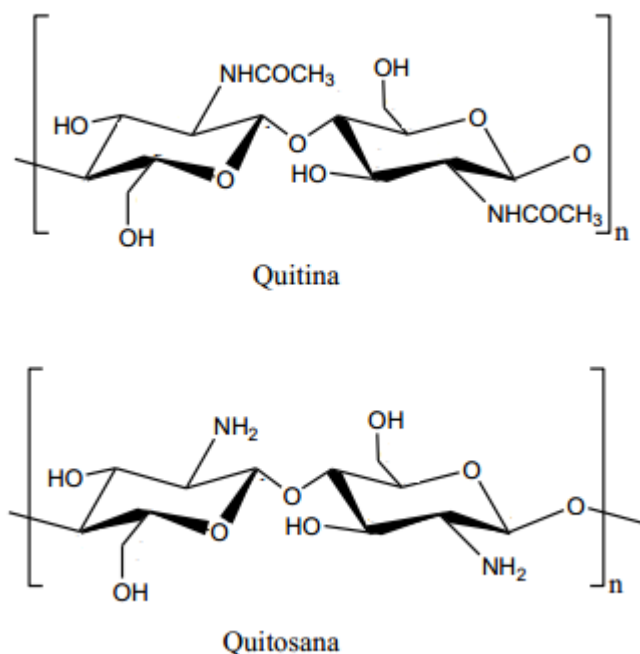
A quitina, oriunda de resíduos da indústria de processamentos de crustáceos, quando não aproveitada em muitos casos se constituem como poluentes nas regiões costeiras. Geralmente as indústria desses crustáceos descartam seus resíduos sem qualquer tipo de tratamento (AZEVEDO et al., 2007; CAMPANA-FILHO et al., 2007) ocasionando graves problemas de poluição, devido a elevada demanda bioquímica que esta biomassa produz. Além disso, a composição química das carapaças dos invertebrados marinhos demanda muitos anos para serem degradadas naturalmente (MIRANDA, 2004). Desta forma, a utilização e a destinação adequada desse subproduto é importante sob o ponto de vista ambiental e está diretamente relacionado ao desenvolvimento econômico e sustentável.

A quitina apresenta sob a forma de um pó amarelado, altamente hidrofóbico, bastante resistente, insolúvel em água, na maioria dos solventes orgânicos usuais, ácidos diluídos e álcalis. Em termos estruturais, a quitina é um polímero linear, de natureza de microfibrilas ordenadas de cadeia longa, o qual a unidade repetitiva é o dissacarídeo composto por uma sequência de monômeros de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose ligadas através de ligações glicosídicas do tipo β (1-4) (MUZZARELLI, 1977, CAMPANA-FILHO et al.; 2007; MOURA et al., 2008; RAMIREZ et al., 2011).

Uma grande variedade de aplicações biológicas para a quitina em diferentes áreas, tais como medicina, farmácia e biotecnologia, já foram descritas devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A quitina tem apresentado bons resultados como material para suturas resistentes ao ataque da bile, da urina e do suco pancreático, como material curativo e em aplicações de liberação controlada de fármacos (FERNANDES, 2009).

O mais importante derivado estrutural da quitina é a quitosana (Figura 1), que apresenta amplas possibilidades de aplicação por sua solubilidade em quase todos os ácidos aquosos, geralmente variando entre pH 2 a 6,5 devido aos grupos amino livres (NH_2) da quitosana serem bases fracas, sendo predominantemente protonadas em formas catiônicas (NH_3^+) quando o pH é menor que 6,5 (AN et al., 2009).

Figura 1. Esquema das estruturas dos polímeros quitina e quitosana (BUKZEM, 2013).



No estado sólido, a quitosana é um polímero linear encontrado naturalmente em pequenas quantidades na parede celular de muitos tipos de fungos. Sua produção ocorre industrialmente, através de desacetilação parcial da quitina. Esse procedimento pode ser executado em diferentes condições, tanto em meio ácido quanto alcalino. Contudo, a última condição é mais utilizada, pois o emprego do meio ácido no processo químico da desacetilação da quitina pode provocar severa degradação das cadeias poliméricas, devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. Em geral, a execução da reação de

desacetilação de quitina em temperaturas elevadas empregando soluções concentradas de NaOH é o método usual para a obtenção de quitosana (CAMPANA e DESBRIÈRES, 2000). Nesta reação, os grupamentos acetamida (NHCOCH_3) da quitina são transformados em grupos amino (NH_2) em graus variados (ANTÔNINO, 2007).

Estruturalmente, a quitosana é uma poliamina linear de alta massa molecular, de natureza policatiônica, que possui grupamentos amino e hidroxilas disponíveis para reações químicas, aos quais são atribuídas às propriedades de maior interesse (RIBEIRO, 2008). A quitosana, quimicamente é muito similar à quitina, diferenciando-se somente pelo fato que na quitosana predominam unidades constituído de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (CHU, 2002; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Após o processo de desacetilação da quitina o polímero resultante passa a se solubilizar em soluções aquosas de ácidos orgânicos diluídos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico (diluído) resultando em soluções viscosas (SANTOS et al., 2003). Essa característica identifica este material como quitosana e não mais quitina (TOLAIMATEA, 2003; FERNANDES, 2009). Logo, a quitosana é o nome atribuído genericamente ao polímero no qual o número de unidades monoméricas contendo o grupamento NH_2 é suficiente para tornar o polímero solúvel em ácido fraco (RIBEIRO, 2008).

A solubilidade da quitosana ocorre quando o polímero passar a se comporta como um polieletrólito catiônico pela ocorrência de protonação (adição de prótons) dos grupos amino (NH_3^+) nas cadeias poliméricas em presença de íons H^+ (FERNANDES, 2009). Sendo assim, sua solubilidade está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade dos grupos amino maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SANTOS et al., 2003).

A quitosana é um aminopolissacarídeo natural, reconhecida há vários anos devido ao fato de ser atóxico ao meio ambiente, biodegradável e biocompatível. Este polímero é de grande importância econômica e ambiental e têm sido extensivamente estudado em diversas aplicações industriais e tecnológicas, tais como liberação de drogas, nanofilmes, membranas e produtos químicos agrícolas, purificação de água, processamento de alimentos, quelação de íons metálicos, produtos cosméticos e farmacêuticos (DASH et al., 2011; LUO et al., 2010; KUMAR, 2000; UYGUN et al., 2011; LIU et al., 2012; BEKHEIT et al., 2011).

Entre as diversas propriedades da quitosana destacam-se seus efeitos coagulante, analgésico, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, aditivos alimentícios, quelante, cicatrizante,

atividades antioxidantes, antimicrobiana, controle de excesso de gordura das dietas, atividade antimicrobiana e antitumoral, além de atuar na modulação do sistema imune (MOURYA, INAMDAR e TIWARI, 2010; SILVA, SANTOS e FERREIRA, 2006; SEVERINO, VASCONCELLOS e FIGUEIREDO, 2007).

Entre as diversas aplicações da quitosana destaca-se: (i) agente imobilizador para liberação controlada de medicamentos; (i) auxilia na redução de peso em tratamentos de obesidade, através da captura das gorduras contidas nos alimentos; (iii) regenerador de ferimentos; (iv) controle da pressão arterial; (v) regenerador da estrutura óssea; (vi) redutor do nível de ácido úrico; (vii) redutor do colesterol; (viii) inibidor da formação de biofilme bacteriano entre outras aplicações (CRAVEIRO, CRAVEIRO e QUEIROZ et al., 1999).

A propriedade antibacteriana da quitosana tem sido utilizada para reduzir ou eliminar o crescimento de diferentes cepas de micro-organismos. Embora os mecanismos exatos pelos quais a quitosana exerce atividade antimicrobiana não estejam ainda totalmente esclarecidos, três diferentes mecanismos têm sido postulados na literatura: (i) os grupamentos aminos livres (positivamente carregado) podem agir nas membranas celulares dos micro-organismos (negativamente carregada) resultando em vazamento de componentes intracelular; (ii) ligação da quitosana com o DNA microbiano ocasionando a inibição da transcrição do DNA em RNA mensageiro e da síntese proteica e, por fim, (iii) formação de uma barreira externa, provocando a supressão de nutrientes essenciais ao crescimento microbiano (MASSON et al., 2008; ELDIN et al., 2008; GOY, BRITTO e ASSIS, 2009; MOURYAA, INAMDARA e TIWARI, 2010; MENG et al., 2012).

Além disso, é reconhecido que a atividade antimicrobiana da quitosana é influenciada por diversos fatores incluindo, o grau de polimerização, massa molecular, grau de desacetilação, concentração do polímero dentre outras propriedades físico-químicas (QI et al., 2004; MOURYAA, INAMDARA e TIWARI, 2010).

No estudo realizado por Zheng e Zhu (2003) foi avaliado o efeito antimicrobiano de amostras de quitosana de diferentes massas moleculares sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que o efeito antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* foi potencializada com o aumento da massa molecular do polímero, enquanto que o efeito sobre a *Escherichia coli* foi diminuído.

As concentrações mínimas inibidoras (CMI) de nanopartículas de quitosana pura e com cobre adsorvido contra *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella*

typhimurium e *Staphylococcus aureus* foram verificadas por Qi (2004), que observam que as nanopartículas de quitosana com ou sem cobre, foram capazes de inibir o crescimento das cepas testadas com valores de CMI inferiores a $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Propriedades antimicrobianas da quitosana extraída de resíduos de camarões contra as bactérias *Salmonella paratyphi* e *Staphylococcus aureus* foram relatadas por Islam, Masum e Mahbub (2011). Tais micro-organismos apresentaram-se sensíveis às soluções com diferentes concentrações de quitosana testada.

İkincet al. (2002) investigaram o potencial antimicrobiano de formulações de quitosana contra o patógeno periodontal, *Porphyromonas gingivalis* e observaram que a combinação de quitosana com gluconato de clorexidina exibiu atividade antimicrobiana mais elevada quando comparada com a mesma atividade isolado.

Em outro estudo No et al. (2002) realizaram estudo avaliando a atividade antimicrobiana de diferentes amostras de quitosana e oligômeros de quitosana com diferentes massas moleculares contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio parahaemolyticus*) e Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*), e verificaram que as quitosanas mostraram atividade antibacteriana mais elevado que os oligômeros de quitosana. Neste estudo o efeito inibitório da quitosana diferiu de acordo a massa molecular do polímero e com o tipo de cepa bacteriana ensaiada. Em geral, a quitosana apresentou efeitos inibitórios mais fortes contra bactérias Gram-positivas quando comparada com as Gram-negativas.

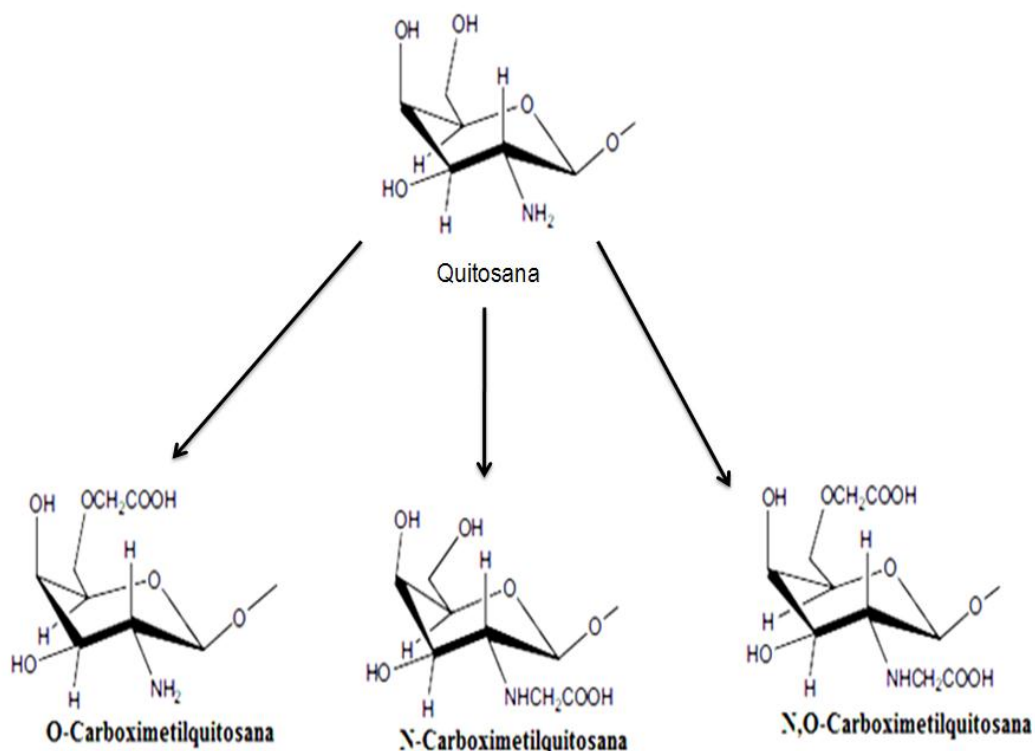
3.2 CARBOXIMETILQUITOSANA

A quitosana é susceptível a modificações químicas que podem resultar no aumento de suas atividades biológicas para as mais diversas aplicações (ABREU, 2006). A mudança estrutural desta molécula é possível devido à grande quantidade de sítios reativos presentes na cadeia polimérica como os grupos hidroxilas e os grupos amino (SANTOS et al., 2003). Ressalta-se que estes grupamentos apresentam susceptibilidade de reagir por meio de ataques nucleofílicos.

Várias modificações químicas da quitosana foram propostas, dentre as quais se podem citar, a carboximetilação, enxerto, sulfonação, quaternização, acetilação e a hidroxilação (SUN; WANG, 2006; DU, HSIEH, 2008). Entre as modificações citadas

destaca-se a carboximetilação da quitosana. Esta consiste na introdução de substituintes carboximetila na cadeia do biopolímero, que tem como derivados hidrossolúveis os derivados O-, N- ou N,O- carboximetilquitosana, a qual apresenta grupos funcionais amino e carboximetila reativos (MUZZARELLI et al., 1998, CAMPANA-FILHO; DESBRIÈRES, 2000; CERRUTTI, 2010; CHEN et al, 2002). Os derivados carboximetilados se diferem de acordo com a posição de substituição do grupo carboximetila (SONG et al., 2011), conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2. Derivados carboximetilados da quitosana (adaptado de BUKZEM, 2013)



A carboximetilquitosana é um dos derivados carboximetilado da quitosana, representando a forma mais interessante do polímero de origem, devido a sua solubilidade em água e em uma ampla faixa de pH (CHEN et al., 2002; CHEN, DU e ZENG, 2003; CHEN; PARK, 2003; GUO et al., 2006; LEITE et al.; 2005; ZHAO et al., 2003) viabilizando inúmeras aplicações na indústria de medicamentos, cosméticos, e alimentícia (ZHU et al., 2005; ABREU, 2006; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SILVA, 2011; FARAG, MOHAMED, 2012).

A solubilidade apresentada pelos derivados carboximetilados da quitosana em uma ampla faixa de pH está diretamente relacionado com os graus de substituição dos agrupamentos hidroxilas primários que estão livres na molécula (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009; MELLO, 2009). Conforme Largura (2009) e Abreu (2006) a solubilização da carboximetilquitosana em meio ácido deve ser atribuída a protonação dos grupos amino, enquanto a ionização do grupo carboxila é responsável pela solubilidade em meio alcalino, ou seja, a formação de cargas ao longo da cadeia da carboximetilquitosana é que governa sua solubilidade.

A carboximetilquitosana quimicamente é um polímero de alta massa molecular que contém na sua estrutura grupos COOH e NH₂. Para a síntese da *O*-Carboximetilquitosana exige a alcalinização da quitosana em solução aquosa fortemente alcalina. Em uma segunda etapa, emprega-se a reação da quitosana pré-alcalinizada suspensa em isopropanol com ácido monocloroacético por várias horas (CHEN; PARK, 2003; ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005). Na produção da *N,O*- carboximetilquitosana utiliza também quitosana suspensa em isopropanol em presença do ácido monocloroacético, contudo, a mistura reacional é mantida em uma temperatura mais elevada (MUZARELLI et al., 1989; ABREU, CAMPANA-FILHO, 2005). Para a síntese da *N*-carboximetilquitosana emprega-se ácido glicoxílico (CHEN et al., 2003; ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005).

As aplicações farmacêuticas da carboximetilquitosana devem-se, sobretudo, a sua solubilidade em meio fisiológico e às características associadas à segurança de seu uso, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade, ausência de alergenicidade, fácil degradação, boa capacidade de formação de películas, fibras e hidrogéis (FARAG, MOHAMED, 2012; ZHAO et al., 2013).

Vale destacar que os grupamentos amino (NH₂) protonados (NH₃) da quitosana e de seus derivados carboximetilados atuam como sítios antibacterianos. A natureza policatiônica da cadeia do polímero permite sua ação na superfície de carga negativa das células bacterianas alterando sua permeabilidade resultando em vazamento de componentes intracelular, conforme citado anteriormente. Ou seja, a atividade antimicrobiana do polímero se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica (NEVES, 2013). Desta forma, a ação antimicrobiana está relacionada à quantidade de grupamentos aminos protonados ao longo da cadeia polimérica da quitosana e de seus derivados (MOURYA, INAMDAR e TIWARI, 2010). Quanto maior a quantidade destes grupos, certamente, maior é a atividade antimicrobiana do polímero.

Na *N*-carboximetilquitosana o número efetivo de grupamentos aminos é baixo, por causa da substituição de grupamentos carboximetil na estrutura do polímero causando queda da ação antibacteriana. Já na *O*-carboximetilquitosana a inserção de grupamentos carboximetil ocorre somente nos grupamentos hidroxilas. Logo, o número de grupamentos aminos não é alterado e maior é a sua atividade antibacteriana. Além disso, a ação antimicrobiana da quitosana e de seus derivados muitas vezes é influenciada pela sua massa molecular, pois a maior massa molecular do polímero faz com que o conteúdo de $-NH_2$ também aumente (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010). Por isso, o estudo da atividade antimicrobiana deste polímero com diferentes massas moleculares vem sendo explorado por muitos pesquisadores.

A carboximetilquitosana é um biopolímero que tem despertado interesse devido a sua atividade antimicrobiana (NETO, et al., 2008). Tan et al (2011) estudaram o efeito da carboximetilquitosana sobre a viabilidade do biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Chromobacterium violaceum*. Verificou-se que a formação de biofilme por bactérias Gram-positiva e Gram-negativa é inibida em 74,6% e 81,6%, respectivamente pela carboximetilquitosana. Em outro estudo, Yu et al. (2011) demonstraram que a carboximetilquitosana preveniu a formação de biofilme de bactérias Gram-positivas com uma eficiência de 63,1% e de Gram-negativas com uma eficiência de 70,6%.

3.3 BIOENSAIO COM *Artemia salina*

Nos estudos de triagem de novas moléculas bioativas para tratar as enfermidades que afligem a população os testes toxicológicos assumem grande importância na triagem de uma ampla gama de compostos a fim de se avaliar ou prever a toxicidade relativa destas substâncias nos sistemas biológicos. Várias técnicas são utilizadas para a verificação da toxicidade de substâncias, com a utilização de organismos em laboratório, tais como micro-organismos, cobaias e até mesmo seres humanos. Atualmente há uma tendência natural a substituir o uso de animais de laboratório em testes toxicológicos, devido ao alto custo e ao sofrimento causado a estes animais. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levou à busca de novos testes (CAVALCANTE et al., 2000).

Os métodos alternativos incluem testes de toxicidade, como o que utiliza a *Artemia salina*. O bioensaio com *Artemia salina* é um ensaio biológico considerado como uma das

ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade (AMARANTE et al., 2011) de compostos sintéticos e produtos naturais. Embora o ensaio de letalidade com *Artemia salina* seja inadequado com a elucidação do mecanismo de ação dos componentes citotóxicos, é muito útil para encontrar e avaliar a bioatividade dos constituintes vegetais (KRISHNARAJU et al., 2005) de grande interesse para a pesquisa e programas de desenvolvimento na busca de descobrir novos medicamentos. Esse ensaio também pode ajudar na determinação da toxicidade de produtos químicos.

A *Artemia salina* é um microcrustáceo da ordem *Anostraca* (sem carapaça) que vive em águas salgadas e salinas de todo o mundo (SORGELLOOS et al., 1986; NASCIMENTO et al., 2008). A utilização desta espécie apresenta a vantagem de seus cistos serem metabolicamente inativos e resistirem à secagem e estocagem por longos períodos de tempos e mantidos desidratados, de preferência em vácuo, e em baixas temperaturas (GOMES, 1986). Os cistos podem ser adquiridos facilmente em lojas de aquaristas e por ter um ciclo de vida relativamente curto para eclodir (24 a 48 horas) em condições adequadas, favorece seu uso em testes de toxidade aguda e crônica.

O ensaio para a determinação de toxicidade aguda frente ao microcrustáceo *Artemia salina* constitui-se num método seguro, rápido, prático e de baixo custo (PISUTTHANAN et al., 2004; KRISHNARAJU et al., 2005; LUNA et al., 2005; LUNA et al., 2005; MOLINA-SALINA; SAID-FERNÁNDEZ, 2006). A simplicidade desse teste, o fato de não requerer métodos assépticos e equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira em laboratórios de produtos naturais.

Devido à capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade este ensaio, vem sendo empregado em diferentes áreas tais como toxicologia ambiental (SILVA, 2002; COSTA et al., 2003; DANTAS et al., 2003), estudos de pesticidas (BARAHONA & SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999; SPINDLER e SPINDLERBARTH, 1994), antibióticos (MIGLIORE et al., 1997) dentre outros.

Muitos autores correlacionam a eficiência deste ensaio com propriedades antifúngica (NIÑO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2007), antimicrobiana (BRASILEIRO et al., 2006; NIÑO et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2007), antitumoral (MCLAUGHLIN, 1991; MCLAUGHLIN et al., 1991, 1993) e tripanossomicida (DOLABELA, 1997) dos compostos estudados. Em geral, produtos naturais que apresentam potencial tóxico frente ao microcrustáceo *Artemia salina* apresentam potencial para estas atividades.

3.4 BIOFILMES MICROBIANOS

3.4.1 Conceito e aspectos gerais

Os micro-organismos têm potencial de viver na forma de um ou mais fenótipos: planctônico ou sésseis. As formas planctônicas, também conhecidas como células flutuantes ou de vida livre, circulam isoladamente em busca de nutrientes necessários à sobrevivência. As células sésseis são caracterizadas pela vida bacteriana em grupo, constituindo um agregado de células microbianas encapsuladas por uma matriz polimérica altamente hidrofóbica, imobilizadas a um suporte, podendo também ser denominadas como biofilmes (DUNNE, 2002; BOARI, 2008; TRENTIN, 2013).

Os biofilmes podem ser formados por uma única espécie ou de múltiplas espécies de micro-organismos, como bactérias, fungos e/ou protozoários. Contudo, as bactérias são o grupo predominante encontrados nos biofilmes. Apesar de sua relativa simplicidade, a maioria das bactérias, em condições adequadas, possui características que as fazem organismos com grandes capacidades de produção de biofilme, tais como (i) capacidade de multiplicar-se com rapidez, (ii) maior versatilidade e resistência, (iii) grande capacidade de adaptação e de produção de material polimérico extracelular (CHARACKLIS et al., 1990; BARROS, 2009; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

Os biofilmes são descritos como sendo uma forma de vida microbiana sésseis, caracterizada por células, de uma única, ou de múltiplas espécies, que estão irreversivelmente aderidas a uma superfície biótica ou abiótica (SUZUKI, 2009). Os biofilmes são circundados por uma complexa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de aspecto gelatinoso de sua própria produção que imobiliza e protege as células microbianas de ambientes hostis e da ação de agentes físicos e químicos, como antibióticos, detergentes, antissépticos e forças de cisalhamento (SUTHERLAND et al., 2001; JENKINSON e LAPPIN-SCOTT, 2001; DJORDJEVIC et al., 2002; ALLISON, 2003; MARQUES, 2005).

Vale mencionar que as bactérias, quando em biofilmes, podem ser na ordem de mil vezes mais resistentes aos antimicrobianos e a fatores imunes do hospedeiro quando comparado às formas planctônicas, em parte devido a barreira física que esta forma sobre as células impede que agentes bactericidas cheguem aos sítios ativos das células sendo

extremamente difícil erradicá-lo quanto parasitando um hospedeiro (DAVEY e O'TOOLE, 2000; DRENKARD, 2003).

É importante ressaltar que os micro-organismos que crescem em biofilmes, geralmente exibem, quando comparados aos mesmos micro-organismos na sua forma de vida planctônica, (i) um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição genética, (ii) apresentam um estado metabólico mais lento, (iii) grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, (iv) alto grau de organização, (v) maior tolerância ao stress e (vi) maiores níveis de resistência frente a agentes antimicrobianos, aquecimento e as defesas do sistema imune do hospedeiro (KUHN et al., 2002; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; TRACHOO, 2003; CARDOSO, 2004; NITSCHKE, 2006; BLANKENSHIP, 2006; SANTOS, WATANABE e ANDRADE, 2011).

A adesão de micro-organismos em superfícies úmidas e conseqüentemente a formação do biofilme são fenômenos que ocorre naturalmente. Vale ressaltar que não existe um material não passível de formação de biofilmes, desde que as condições permitam. Os biofilmes podem se acumular em uma variedade enorme de superfícies e ambiente, como células e tecidos animais ou vegetais, plásticos, cascos de navio, aço inox, vidro, borracha, polipropileno, dentes, próteses, canos de esgoto, cascos de navio, caixas de água, equipamento odontológico, ferro, dentre outros. Praticamente não há nenhuma superfície úmida que não possa ser ou vir a ser colonizado por bactérias e a conseqüente formar biofilme (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

3.4.2 Composição dos biofilmes

Os biofilmes não são apenas um aglomerado de células microbianas inclusas em uma matriz polimérica extracelular presa a uma superfície (HALL-STOODLEY et al. 2004). Os biofilmes são sistemas biológicos que apresentam uma composição complexa e heterogênea onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas. Representam sistemas biológicos, tipicamente constituídos por água, produtos de excreção autoproduzido denominada de matriz polimérica e qualquer material que esteja dentro da matriz resultante provenientes do meio aquoso onde está imerso (areias, argilas e matéria orgânica) e da lise celular (HOOD; ZOTTOLA, 1995; KALMOKOFF et al., 2001; CHAVANT et al., 2002; BARROS, 2009).

Um biofilme apresenta natureza química diversificada. Normalmente, a água constitui a maior fração da sua massa total, variando entre 70 a 90%. Já, os micro-organismos representam somente uma parte do volume que, frequentemente é menor que 10%. As substâncias poliméricas extracelulares que formam o emaranhado que envolve as células microbianas representam cerca de 70 a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme (BARROS, 2009).

A matriz polimérica dos biofilmes é uma estrutura que traz diversas vantagens para as bactérias. Ela é uma estrutura unificadora do biofilme responsável pela adesão entre as células microbianas, pela adesão das células microbianas a superfície e proteção contra fagocitose, anticorpos e muitos antibióticos. Além disso, a matriz polimérica facilita a comunicação entre as células organizadas nos biofilmes através da difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras, chamadas autoindutoras. Este sistema de sinalização, denominado *quorum-sensing* permite que pequenas moléculas difusíveis, produzidas pelas células bacterianas, possam ser detectadas por outros micro-organismos (KAPER e SPERANDIO 2005). A cascata de sinalização permite que as bactérias atuem como uma unidade coletiva que coordena atividades metabólicas em benefício mútuo.

O *quorum-sensing* é um mecanismo de sinalização célula-célula que permite as bactérias (i) dimensionarem seu comportamento e as características fenotípicas em relação ao meio ambiente, (ii) monitorarem sua densidade populacional, (iii) regularem de forma coordenada da expressão gênica (iv) e diversos processos fisiológicos como a diferenciação celular, motilidade em superfícies, fluxo de nutrientes (v) e a indução de fatores de virulência (SCHAUDER e BASSLER, 2001; RUMJANEK et al., 2004).

A composição química da matriz polimérica é muito heterogênea. Esta estrutura é composta por vários componentes, como partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais, detritos e vitaminas, proteínas, substâncias húmicas, ácidos nucleicos, glicoproteínas, fosfolipídios e outros compostos poliméricos que são encontrados entre as células (SURMAN et al.1996; PRAKASH et al., 2003; PARIZZI et al., 2004).

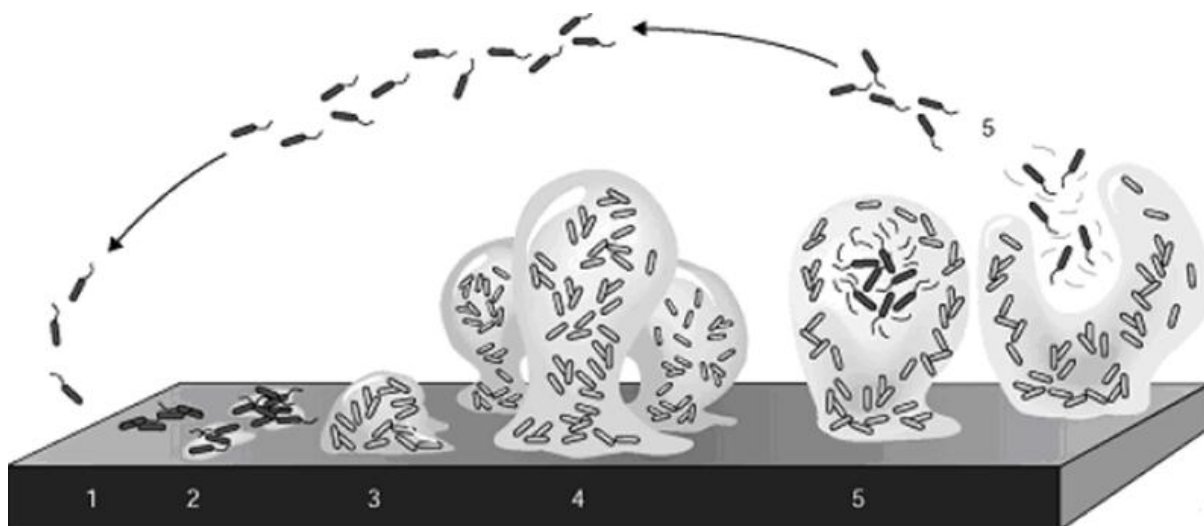
A matriz polimérica é a principal responsável pela estrutura e integridade funcional dos biofilmes. Ela possui estabilidade mecânica, favorece a absorção de nutrientes e age como adesivo impedindo que células microbianas não sejam arrastadas pelo fluxo de substâncias e barreira protetora dificultando fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no interior do biofilme. Além disso, a matriz possibilita ligações célula a célula e ligações células superfícies, serve como reserva de nutrientes e proteção contra agressões ambientais como

radiações ultravioleta, toxicidade por metais, alterações do pH e de osmolaridade e dessecação (JENKINSON e LAPPIN-SCOTT, 2001; TAKHISTOV e GEORGE, 2004; BOARI, 2008; CAIXETA, 2008).

3.4.3 Formação do biofilme

A formação de biofilme é um processo dinâmico e complexo. A dinâmica de formação de um biofilme pressupõe cinco estádios diferentes: (i) adesão reversível dos microorganismos circulantes com uma superfície sólida (estágio 1), (ii) adesão irreversível mediada pela produção da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (estágio 2), (iii) desenvolvimento da arquitetura do biofilme (estágio 3), (iv) maturação da arquitetura do biofilme (estágio 4) e (v) desprendimento das células sésseis, que, em forma planctônica, poderão ocasionar infecções ou formar biofilmes em outros locais proporcionando uma nova fonte de contaminação (estágio 5) (SAUER, 2003; MELCHIOR et al. 2006; SANTOS, e WATANABE ANDRADE, 2011). A formação do biofilme envolve uma sequência de eventos conforme ilustrado esquematicamente na Figura 3.

Figura 3. Etapas dos estágios de formação do biofilme bacteriano (SAUER, 2003).



Estágios de formação do biofilme bacteriano: Estágio 1 - Adesão reversível dos microorganismos. Estágio 2 - Adesão irreversível. Estágio 3 - Desenvolvimento da arquitetura do

biofilme. Estágio 4 - Maturação da arquitetura do biofilme. Estágio 5 - Desprendimento das células sésseis.

Segundo Sauer (2003) e Menoita et al. (2012) o processo de formação do biofilme é iniciado com o transporte de células microbianas, em seu estilo de vida planctônico, até a superfície sólida e sua subsequente colonização. No estágio de adesão do micro-organismo à superfície ocorrem interações célula-superfície por meio de interações intermoleculares e físico-químicas (ARAÚJO e ANDRADE, 2010). O processo de adesão do micro-organismo à superfície envolve duas etapas: a adesão reversível seguida pela adesão irreversível.

Durante a etapa inicial, de adsorção reversível, os micro-organismos precursores da formação de biofilmes apresentam movimento browniano (movimento aleatório rápido) e podem ser facilmente removidos por raspagem. A adesão reversível ocorre por meio de ligações fracas, que podem ser de natureza eletrostática, forças de *Van der Waals*, hidrodinâmicas e forças de interações hidrofóbicas (WATNICK E KOLTER, 2000; ROBINSON, 2000; DUNNE, 2002; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003; SAUER, 2003; CAIXETA, 2008; ARAÚJO e ANDRADE, 2010).

Após a adesão reversível das primeiras células na superfície; dá-se início a adesão irreversível. Nesta etapa ocorrem à interação célula-superfície por meio de forças físicas e químicas através do ancoramento de apêndices celulares externos, como pili, flagelos e proteínas específicas para adesão (adesinas fimbriais e afimbriais). Durante essa fase de adesão, os micro-organismos estão firmemente ligados à superfície, dificultando, assim, a remoção das células aderidas, sendo necessário para isso, o uso de forças mecânicas, como raspagens ou lavagem ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes ou calor (SINDE e CARBALLO, 2000; STOODLEY et al., 2002; PRAKASH et al., 2003; SAUER, 2003; CAIXETA, 2008).

A união entre os apêndices da bactéria e o substrato é essencialmente controlada por interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas (ROBINSON, 2000; SAUER, 2003; CAPELLETTI, 2006; ARAÚJO e ANDRADE, 2010). A produção do material extracelular é outro fator que consolida o processo de adesão e fortalece as ligações entre as células e a superfície (MAH e O' TOOLE, 2001; DONLAN e COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002; TRENTIN, GIORDANI e MACEDO, 2013).

Depois do estágio de adesão, ocorre a etapa de desenvolvimento e maturação da arquitetura tridimensional do biofilme. A maturidade acontece por meio do (i) crescimento e rearranjo estrutural do biofilme, (ii) redistribuição das bactérias, (iii) aumento da densidade celular motivada pela divisão celular (iv) e pronunciada produção e deposição de matriz extracelular penetrada por canais e poros por onde há difusão de nutriente e água com o meio externo. Esse processo leva ao aumento da espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente (STOODLEY e DAVIES, 2002; SAUER, 2003; CHENG et al., 2007).

Uma vez formado, a camada mais interna do biofilme maduro, forma-se um ambiente anaeróbio e no exterior um ambiente aeróbio. O ambiente anaeróbio no interior do biofilme provoca um aumento de ácidos e gás insolúvel que começa a degradar o biofilme, liberando células individuais ou em grupo, servindo como uma fonte perpetuadora do ciclo ao liberar formas planctônicas para contaminar e colonizar outras superfícies (STOODLEY et al., 2002; TRACHOO, 2003; SAUER, 2003; CHMIELEWSKI e FRANK, 2003).

3.5 CARACTERIZAÇÕES DAS BACTÉRIAS ESTUDADAS

Entre as bactérias Gram-negativas que podem crescer em biofilmes destacam a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Burkholderia cepacia*. Neste estudo, optou-se por estas bactérias, as quais serão descritas brevemente, porque são formadoras de biofilme e apresentam baixa susceptibilidade aos antimicrobianos, conforme discutido por MCDONNELL e RUSSELL (1999).

3.5.1 Características gerais de *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria pertencente à família Pseudomonadaceae. Morfologicamente apresentam-se como bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos medindo de 1,5 a 3,0 µm de comprimento e 0,5 a 0,8 µm de largura. Estes micro-organismos se apresentam isolados ou em grupos, podendo ser observados aos pares ou em cadeias curtas. Fisiologicamente, possuem metabolismo oxidativo sendo estritamente aeróbios, tendo o oxigênio o acceptor final de elétrons. No entanto, em alguns casos, crescem sob condições anaeróbias na presença de nitrato em substituição ao oxigênio

comoceptor final de elétrons. São produtores das enzimas catalase, oxidase, indofenol e arginina-hidrolase. Estes micro-organismos possuem a capacidade de locomoção por meio de um ou vários flagelos polares e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 37° a 42°C (VASCONCELOS, 2005; MILAN, 2007; THOMAS, O'ROURKE e WAINWRIGHT, 2008; MURRAY et al., 2007; TRABULSI; LINCOPAN, 2008; TODAR, 2008).

Uma característica bioquímica especial das cepas é a capacidade de produzir em meio de cultivo colônias grandes com brilho metálico e odor semelhante ao de frutas. Além de produzir pigmentos solúveis, como a pioverdina (pigmento esverdeado e fluorescente), fenazínico (pigmento azul) e com menor frequência outros pigmentos como piorrubina (pigmento vermelho) e piomelanina (pigmento marrom a preto) (MURRAY et al, 2007; REIS et al, 2008).

Em sua maioria, são micro-organismos de vida livre de natureza ubiquitária, ou seja, apresenta uma ampla distribuição ambiental incluído o solo, a água, matéria orgânica em decomposição, vegetais, componente da flora normal da pele, mucosas e intestino de animais e variados ambientes hospitalares (VASCONCELOS, 2005; TRABULSI e LINCOPAN, 2008).

Esta bactéria é capaz de viver mesmo em ambientes hostis, devido a uma série de características entre as quais evidenciam (i) a versatilidade nutricional e capacidade de utilizar diferentes substratos orgânicos como fontes de carbono, (ii) apresentam pouca exigência nutricional para crescimento, (iii) e o podem sobreviver por períodos prolongados em condições úmidas (GALES et al. 2001).

No ser humano quando os mecanismos de defesa são suplantados, a *Pseudomonas aeruginosa*, comporta-se como patógeno oportunista causando diversas enfermidades tais como as do trato urinário, dermatites; pneumonias, infecções tegumentares e ósseas. As infecções causadas por esta bactéria são mais frequentes em pacientes hospitalizados, e apresenta grande patogenicidade e risco para pessoas debilitadas ou imunocomprometidas com queimaduras severas, ferimentos de pele, câncer ou AIDS (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

Os prováveis fatores de virulência utilizados pela *Pseudomonas aeruginosa* para produzir infecções incluem; (i) componentes estruturais, (ii) toxinas extracelulares (iii) e enzimas extracelulares.

Entre os componentes estruturais, destacam-se, as fímbrias ou pili, os flagelos e o alginato ou cápsula de exopolissacarídeo. As fímbrias são estruturas filamentosas que facilitam a adesão bacteriana às membranas das células epiteliais hospedeiras. Os flagelos são apêndices celulares externos que conferem mobilidade à bactéria e desempenham papel fundamental na dispersão de biofilme. Notadamente, tal estrutura parece que facilita a aderência às células epiteliais. As cepas não flageladas possuem uma virulência atenuada quando comparada as formas flageladas (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; GEWIRTZ et al., 2001; JYOT et al., 2011).

Outra substância que contribui na virulência da bactéria é o alginato, um exopolissacarídeo mucoide constituído pelos ácidos manurônico e glicurônico, que forma uma cápsula proeminente na superfície bacteriana e protege contra o sistema imune do hospedeiro, a desidratação e a ação de antibióticos. Além disso, esse polímero promove a formação de biofilme, tem como função a aderência da bactéria aos tecidos do hospedeiro e impedir a difusão dos antibióticos. Evidências sugerem que o sistema genético de virulência que controla a produção deste polímero é ativado em pacientes com fibrose cística, doença obstrutiva crônica, de natureza genética, que causa o acúmulo de muco denso e pegajoso nos pulmões e pâncreas predispondo os portadores a infecções crônicas repetidas do trato respiratório. É comumente relatado que o alginato, no pulmão do fibrocístico, protege a bactéria da ação de antibióticos, anticorpos, ação ciliar do trato respiratório, fagócitos e do sistema do complemento (MURRAY et al., 2006; BEN et al., 2011).

Outros importantes fatores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa* é a capacidade de produção e secreção de diferentes toxinas extracelulares, bem como de um conjunto de enzimas extracelulares, que são introduzidas nas células do organismo hospedeiro danificando-as e enfraquecendo e degradando barreiras físicas. Parece que a principal função destas substâncias é defender a bactéria da fagocitose mediada por neutrófilos e por macrófagos. As proteases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* são responsáveis por processos invasivos, intensa reação inflamatória, lesões de pele e hemorragias. Em geral, estas substâncias estão relacionadas com o rompimento da integridade epitelial, por meio de processos de necrose tecidual, uma vez, que interrompem a síntese de proteínas nas células (MURRAY et al., 2006; BEN et al., 2011).

3.5.2 Características gerais de *Escherichia coli*

As bactérias da espécie *Escherichia coli* pertencente à microbiota entérica de mamíferos e aves. Os mais de 250 sorotipos de *Escherichia coli* pertencem à família Enterobacteriaceae. Morfologicamente, apresenta forma de bastonetes com coloração Gram negativa, não esporulada, medindo de 2 a 6 µm de comprimento a 1,5 de largura. A *Escherichia coli* é uma bactéria mesófila típica, com crescimento ótimo a temperaturas entre 30 a 37 °C. Em sua maioria, são móveis devido à existência de flagelos peritríqueos (MURRAY, 2006).

O metabolismo da *Escherichia coli* pode ser do tipo respiratório e fermentativo, pois, essas bactérias são aeróbias e anaeróbias facultativas. Utilizam a D-glicose e outros carboidratos, formando ácido e gás no final de seu metabolismo (SOUZA, 2006; LEITE e FRANCO, 2006; FRANCO, 2002). A *Escherichia coli* fornecem evidência direta de contaminação fecal recente em água potável e alimentos, e por sua vez podem indicar provável presença de outros micro-organismos por enteropatógenos (POPE et al, 2003). Esta espécie é a mais conhecida e mais facilmente diferenciada dos membros não fecais (LEITE e FRANCO, 2006).

A *Escherichia coli* da microbiota intestinal humana pode atuar como um organismo inofensivo e comensal, coexistindo com o hospedeiro humano sem causar nenhum efeito adverso à saúde humana. As linhagens de *Escherichia coli* comensais podem prover desde benefícios nutricionais até a defesa contra organismos patogênicos (KUHNERT, P. BOERLIN e FREY, 2000; SOUZA, 2006). No entanto, há outras que podem se tornar oportunistas provocando distúrbios intestinais (FENG et al., 2011). Em hospedeiros debilitados, imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrintestinais são traumatizadas, mesmo as espécies não patogênicas, podem causar infecções intestinais graves como diarreia, disenteria, colite hemorrágica, septicemias, gastroenterites, bem como infecções extra intestinais como inflamações do peritônio, infecções urinárias e meningites em neonato (VON SYDOW et al., 2006; PINTO et al., 2011).

3.5.3 Características gerais de *Burkholderia cepacia*

A *Burkholderia cepacia*, anteriormente classificada como *Pseudomonas cepacia*, é uma bactéria Gram-negativa, tem a forma de bacilo reto, é aeróbia, não esporulada e móvel, pertencente à família bacteriana Pseudomonadaceae (GIL, 2001; BERRIATUA et al., 2001; COENYE e VANDAMME, 2003; NASSER et al., 2004; ROMERO-GOMEZ et al., 2008).

Estes microrganismos ocupam uma variedade de nichos ecológicos para sua proliferação, designando-se por isso ubiqüitários. Estão presentes naturalmente na água, solo e vegetação, onde são abundantes na rizosfera do milho, do trigo e do arroz. Ecologicamente, existem espécies que estabelecem relação de simbiose com algumas leguminosas, nomeadamente, por desempenhar um papel importante na fixação biológica do enxofre (BERRIATUA et al., 2001; COENYE e VANDAMME, 2003; ARORA e JAIN, 2012).

Esta bactéria representa um importante patógeno oportunista, por sua capacidade de causar infecções em enfermos imunocomprometidos com granulomatosa crônica e paciente com fibrose cística (HUSAIN; SINGH, 2002; TAYLOR et al., 2010; LEITÃO et al., 2010). Esse micro-organismo é considerado o agente mais frequentemente relacionado com a síndrome clínica denominada “Síndrome Cepacia”, uma pneumonia necrotizante e fatal a cerca de 20% dos doentes infectados em virtude do rápido declínio da função pulmonar (MAHENTHIRALINGAM, BALDWIN e VANDAMME, 2002; COENYE e VANDAMME, 2003; CUNHA et al., 2004; TAYLOR et al., 2010).

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÍONS METÁLICOS

Elementos metálicos, como a prata, o cobre e o zinco possuem atividade antibacteriana bem conhecida (CLEMO, 2005) e por isso, são agentes ativos em diferentes tipos de produtos com ação antimicrobiana, tais como enxágue bucal e soluções orais, pomadas, creme dental e medicamentos.

As propriedades antimicrobianas destes elementos metálicos estão sob investigação constante. Cada vez mais estudos têm demonstrado a eficiência antimicrobiana de diferentes tipos de íons metálicos na forma de nanopartículas, sais metálicos, ligas e complexos metálicos sobre uma ampla gama de bactérias que ameaçam a saúde pública.

Em estudo realizado por KIM et al. (2007) foi analisada a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que as cepas de *Escherichia coli* apresentaram-se sensíveis frente às nanopartículas de prata. Porém foi encontrado um discreto efeito inibidor sob o crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Em outro estudo, utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, Jung et al. (2008) estudaram o efeito antibacteriano de íons de prata por meio do método de contagem em placas e citometria de fluxo, bem como o mecanismo de ação dos íons de prata sobre os micro-organismos por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os autores observaram reduções significativas do crescimento das cepas em ambas às técnicas empregadas, obtendo-se resultados mais satisfatórios por meio do método de contagem em placa. A microscopia eletrônica mostrou mudanças consideráveis nas membranas das células bacterianas após tratamento com os íons de prata, que pode ser a causa ou consequência da morte celular.

Morones Ramirez et al. (2013) avaliando a combinação da prata com diferentes drogas antimicrobianas usuais com o objetivo de potencializar seus efeitos sobre bactérias Gram-negativas, observaram efeito sinérgico com os antibióticos gentamicina, ampicilina e ofloxacina para o micro-organismos *Escherichia coli*.

Estudos demonstram que várias bactérias morrem quando colocado em superfícies de cobre e ligas de cobre. Faúndez et al. (2004) estudaram a taxa de inatividade microbiana de superfícies de cobre metálico sobre *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni*. Demonstrou-se que a superfície de cobre reduz consideravelmente a concentração dos micro-organismos exibindo propriedades antibacterianas. Em contraste, nas superfícies dos controles (aço inoxidável e um polímero sintético) a concentração de micro-organismos manteve inalterada ou aumentou com o tempo.

Em outros estudos, tais como os realizados por Maule e Keevil (2000) e Wilks, Michels e Keevil (2005), foi demonstrado que cepas *Escherichia coli* O157: H7 morreram rapidamente quando em contato com superfícies de cobre. Conforme Michels et al. (2005) superfícies feitas com este material são capazes de inibir ou reduzir o desenvolvimento microbiano e reduzir significativamente a contaminação microbiana. Para os autores superfícies feitas com cobre podem ser utilizados para aquelas expostas ao toque humano (tais como maçanetas de portas, louças sanitárias, interruptores de luz), e nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados para a manipulação de alimentos (tais como mesas e

bancadas e sistemas de transporte) contribuindo para redução na transmissão de patógenos potencialmente infecciosos.

A atividade antimicrobiana do sulfato de zinco, foi verificada por FAIZ et al. (2011) contra *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*. Foi observado que o sulfato de zinco é capaz de provocar a inibição no crescimento microbiano em todos os micro-organismos avaliados, em concentrações que variaram de 0,06 mg mL⁻¹ a 0,5 mg mL⁻¹.

Oladipo, Adeoye e Adeyemo (2013) examinaram o efeito antimicrobiano de diferentes íons metálicos sobre vários micro-organismos e o zinco apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Lactococcus lactis*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus* com concentração mínima inibitória de 0,5 mg mL⁻¹.

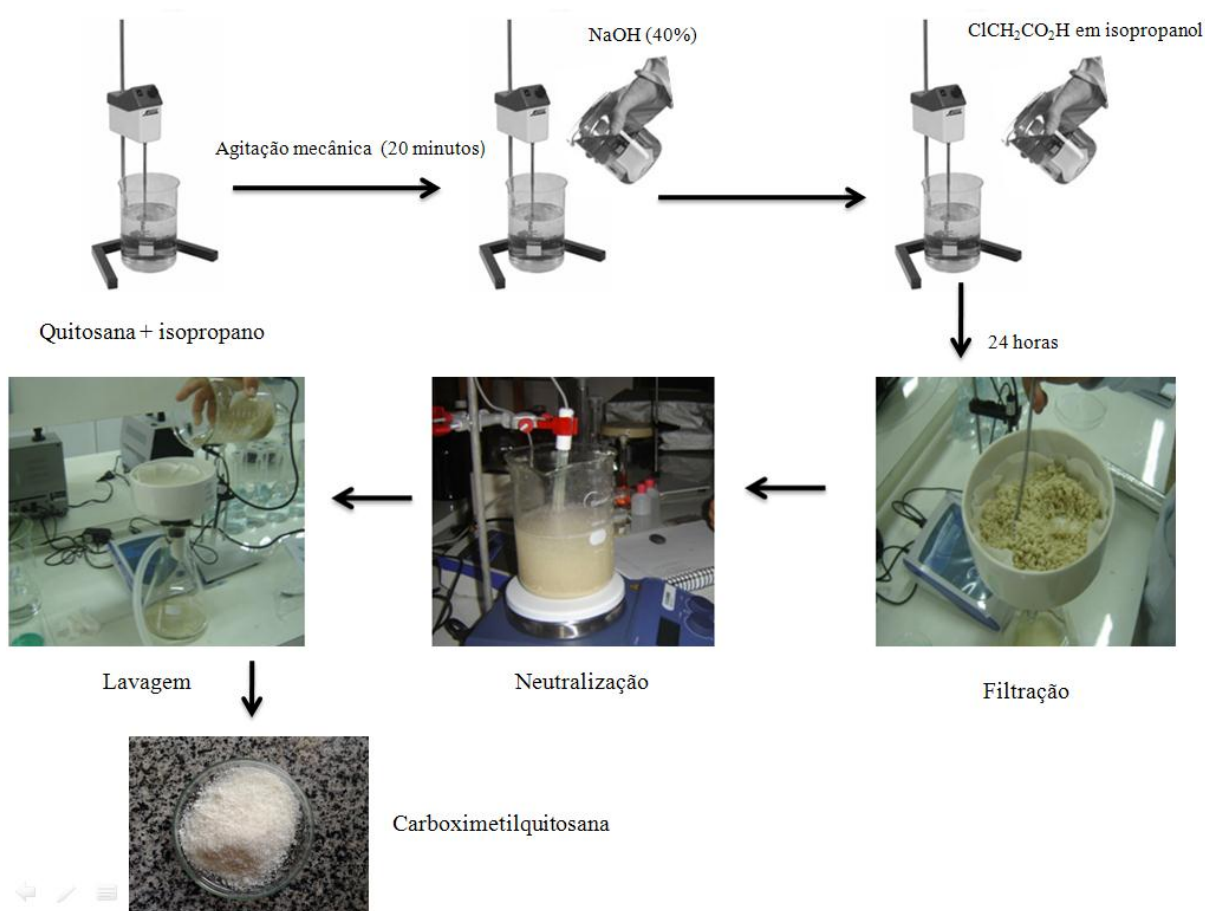
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA

A síntese da carboximetilquitosana foi realizada conforme a rota química descrita por Abreu (2006) com modificações. Para isso, 6 g de quitosana de alta massa molar (Sigma-Aldrich, Lote: BCBH3811V, Alemanha) foram dispersa em 130 mL de isopropano sob agitação mecânica (60 rpm) por 20 minutos. Adicionou-se em sequência 40,8 g da solução aquosa de NaOH a 40%. Em seguida, nesta mistura, foram adicionados lentamente 28,8 g de solução de ácido monocloroacético em isopropanol (1:1 m/m).

A reação ocorreu por 24 h, sob agitação constante e a temperatura ambiente. Após a reação, o material foi filtrado utilizando papel filtro (Whatman – tipo 3), colocado em suspensão em 300 mL de metanol 80%, e neutralizado com ácido acético glacial até pH neutro. Logo após, o resíduo sólido foi filtrado novamente e lavado com 100 mL de etanol 80% e, por fim, com 100 mL de etanol absoluto. O produto da reação foi transferido para uma placa de petri e a secagem foi feita a temperatura ambiente. A figura 4 apresenta as principais etapas da reação de carboximetilação da quitosana.

Figura 4. Principais etapas da síntese carboximetilquitosana.



4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA

Para analisar as modificações químicas ocorridas na reação de carboximetilação a carboximetilquitosana foi submetida a análises para determinação das seguintes características: grau de substituição por titulação potenciométrica e análise de infravermelho por espectroscopia.

4.2.1 Grau de substituição

A determinação do grau de substituição (GS) da carboximetilquitosana foi realizada através do método potenciométrico descrito por Abreu (2006). Neste procedimento, 0,25 g de carboximetilquitosana foram dispersa em 100 mL de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 24 horas até solubilização completa da carboximetilquitosana. Ao final deste tempo, o pH da solução foi ajustado para

2,2 através da adição de ácido clorídrico concentrado. Na sequência a solução final foi titulada com alíquotas de uma solução de hidróxido de sódio padronizada (0,1 mol L⁻¹) através de um titulador potenciométrico, modelo 877 *Titrino plus* da *Metrohm* (Figura 5).

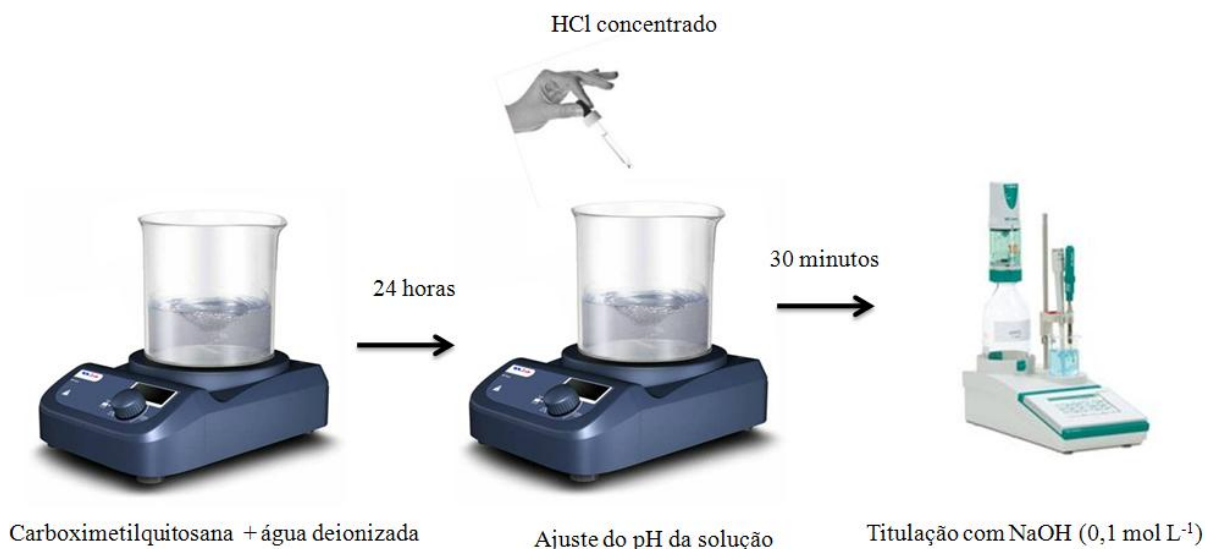


Figura 5. Representação esquemática da titulação potenciométrica da carboximetilquitosana.

Para obter, as derivações da curva de titulação, os dados foram tratados por meio do programa gráfico Origin 6.1.

O grau de substituição foi calculado a partir da equação, proposta por Ge e Lou (2005):

$$GS = \frac{161 \times C_{NaOH} \times V_{NaOH}}{M_{CMQ} - 58 \times C_{NaOH} \times V_{NaOH}}$$

Sendo que C_{NaOH} (mol L⁻¹) corresponde à concentração da solução de Hidróxido de Sódio empregado na titulação, V_{NaOH} (L) é a quantidade de volume gasto para a desprotonação grupos funcionais e M_{CMQ} (g) representa a massa de carboximetilquitosana. Os valores 161 e 58 correspondem, respectivamente, a massa molar da glucosamina e do grupo carboximetil.

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro na região do infravermelho da quitosana e da carboximetilquitosana sintetizada foi registrado em espectrofotômetro Perkin-57 Elmer modelo Spectrum Frontier FT-IR/NIR (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT), no Laboratório Instrumental da Universidade Estadual de Goiás - UEG, UnUCET, Anápolis, Goiás.

Aproximadamente 1 mg de carboximetilquitosana e 100 mg de KBr com grau espectroscópico foram previamente secos em estufa por 12 h a 60 °C. Em almofariz, as amostras foram trituradas simultaneamente e transferidas para uma prensa para a confecção da pastilha para a análise de infravermelho.

4.3 TOXICIDADE EM *Artemia salina*

Os ensaios foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços com as concentrações de 2400, 1200, 600, 300 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a carboximetilquitosana e de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os sais metálicos utilizados neste estudo (nitrato de prata anidro, sulfato de cobre penta-hidratado e sulfato de zinco anidro). A toxicidade da carboximetilquitosana combinada com os sais metálicos foi avaliada com a combinação de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do polímero com as mesmas concentrações dos sais isolados.

Os ensaios foram realizados, segundo metodologia adaptada de Rahman et al. (2005). Sucintamente, 60 mg de cistos de *Artemia salina* foram incubados em um artemilheiro contendo meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho (40 g L⁻¹) e suplementação com extrato de levedura (6 g L⁻¹). Para a eclosão dos cistos, o meio foi mantido sobre saturação constante de oxigênio, por um período de 48 horas a temperatura ambiente e iluminação natural.

Após a incubação, os náuplios foram transferidos para uma placa de Petri e com auxílio de uma micropipeta, foram distribuídas dez larvas para cada poço da microplaca na presença das concentrações dos compostos a serem testados. Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem de artêmias vivas e mortas ou imobilizadas. Os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 90 indivíduos expostos para cada concentração. Todos os testes foram acompanhados de controles negativos, somente com água salina, e positivos com

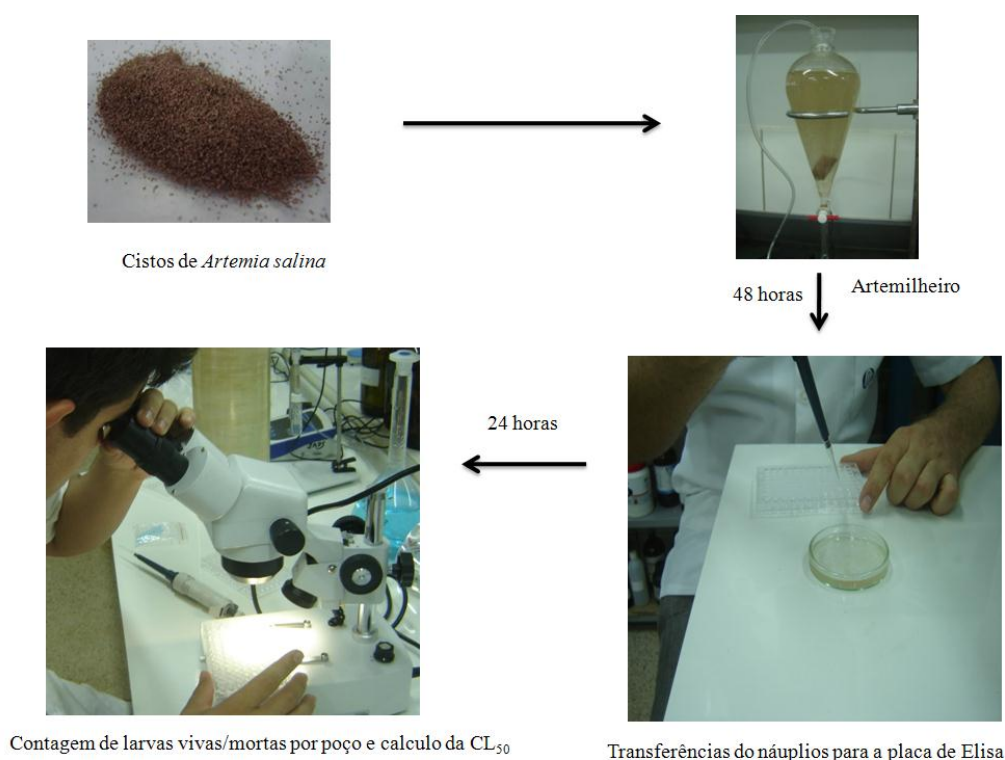
solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,25 $\mu g mL^{-1}$.

A toxicidade foi expressa como a concentração letal a 50% da população do microcrustáceo por meio do cálculo da CL_{50} estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração da substância teste, usando o programa Probitos.

Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Nguta et al. (2012). O autor considera toxicidade forte para valores de CL_{50} até 100 $\mu g mL^{-1}$, toxicidade moderada para CL_{50} entre 100 e 500 $\mu g mL^{-1}$ e toxicidade baixa para CL_{50} entre 500 $\mu g mL^{-1}$ e 1000 $\mu g mL^{-1}$, e não tóxico acima de 1000 $\mu g mL^{-1}$.

Os valores de CL_{50} dos compostos isolados e em combinação foram submetidos ao teste de *t de Student* pareado para se averiguar a significância das diferenças observadas. A Figura 6 ilustra os detalhes do teste de toxicidade em *Artemia salina*.

Figura 6. Esquema do ensaio de letalidade em *Artemia salina*.



4.4. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.1 Micro-organismos utilizados no estudo

Para a realização dos ensaios foram utilizados estirpes padrão de bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25312 e *Burkholderia cepacia* ATCC 17759, provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia (UEG/Anápolis).

4.4.2 Manutenção e reativação das cepas estudadas

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva; Costa e Chinarelli (2008) com pequenas modificações. Primeiramente, foram realizado repique das cepas a fim de se obterem colônias isoladas. As cepas foram repicadas em meio sólido ágar *Mueller Hinton*, pela técnica de esgotamento por estrias e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Logo em seguida, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL de caldo BHI (brain heart infusion) + 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°C. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1 mL para microtubos tipo Eppendorf, previamente esterilizados e devidamente rotulados. Posteriormente as alíquotas foram armazenadas a 8° C por sete dias e congeladas em freezer a -20°C.

As cepas foram reativadas em ágar *Mueller Hinton*, pela técnica do esgotamento. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida foram incubadas a 35°C por 24 horas.

4.4.3 Formação de biofilme: determinação da biomassa total (polissacarídeos e bactérias) e atividade metabólica de bactérias associadas

Para a formação do biofilme bacteriano, foi utilizada a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2004) com algumas modificações. Resumidamente, as colônias de cada linhagem bacteriana foram suspensas em 5 mL de solução fisiológica estéril 0,9 % e a suspensão foi ajustada a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Em seguida foi transferido 1 mL da suspensão para 9 mL de SFE (1/10), ajustando o inóculo para $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Depois, em cada poço de uma microplaca de poliestireno, contendo 100 µL do meio de cultura *Mueller Hinton*, foram colocados 5 µL da suspensão celular para o crescimento do biofilme (1×10^5 UFC/mL), exceto no poço usado para como controle negativo, no qual apenas foram colocados 100 µL de meio de cultura.

As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. Após este período foi feita a leitura visual, confirmando o crescimento das cepas e a não contaminação dos controles negativos. Após a leitura visual, o meio *Mueller Hinton* foi retirado dos poços, e lavado cinco vezes com 200 µL com solução fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas. Logo em seguida, adicionou-se o corante cristal violeta nas placas para os ensaios de biomassa total e resazurina para estudo da atividade metabólica.

Para os ensaios de biomassa total, as placas foram tratadas segundo metodologia descrita por Naves et al. (2008). Resumidamente, foram adicionados 200 µL de cristal violeta a 1% por 5 minutos, em seguida o corante foi desprezado e as placas lavadas quatro vezes com 300 µL de água destilada. As placas foram secadas a 35°C por 20 minutos, posteriormente foram adicionados 200 µL de etanol absoluto em cada poço para a coloração das bactérias aderidas e a placa incubada durante 5 minutos. Posteriormente, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) a 492 nm dos poços. Os experimentos para determinação da biomassa total e atividade metabólica estão esquematizados na Figura 7 e 8 respectivamente.

Figura 7. Esquema do ensaio para a determinação de biomassa total pelo método cristal violeta.

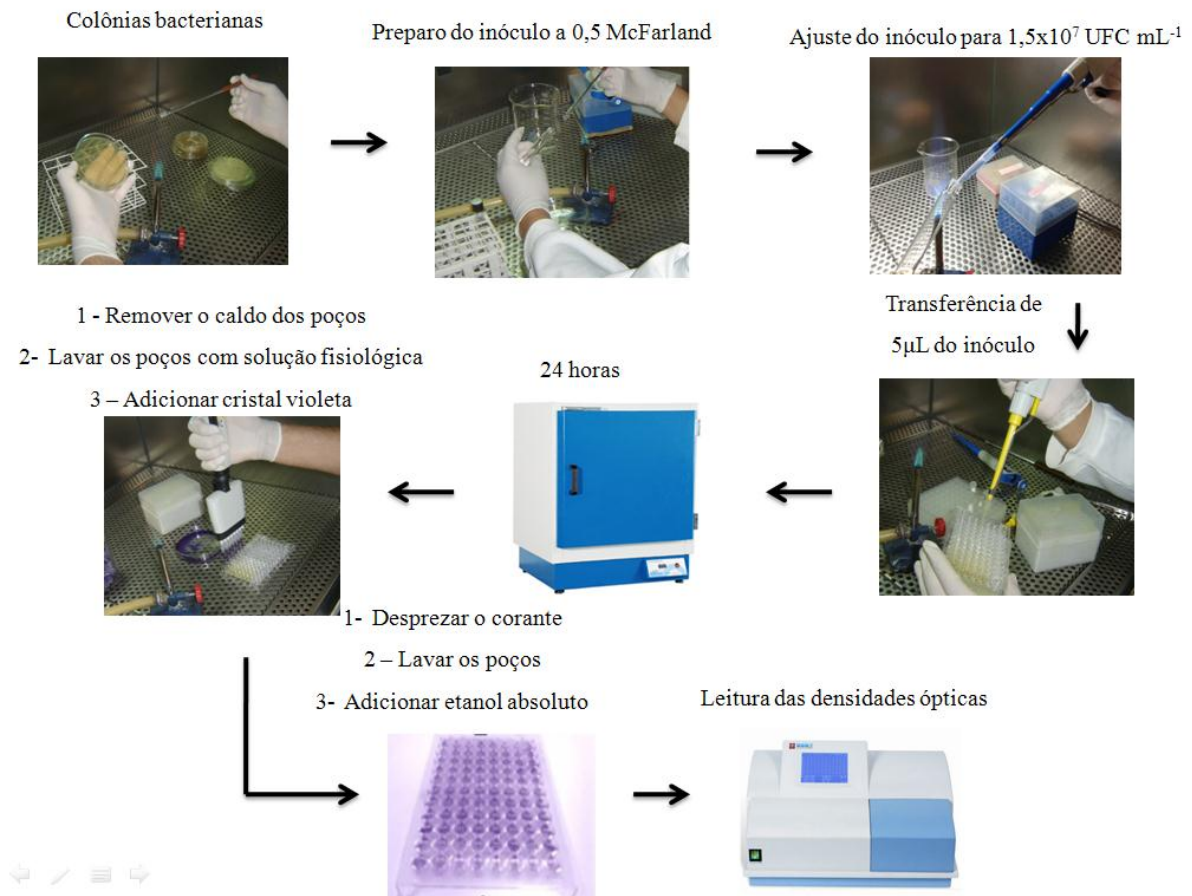
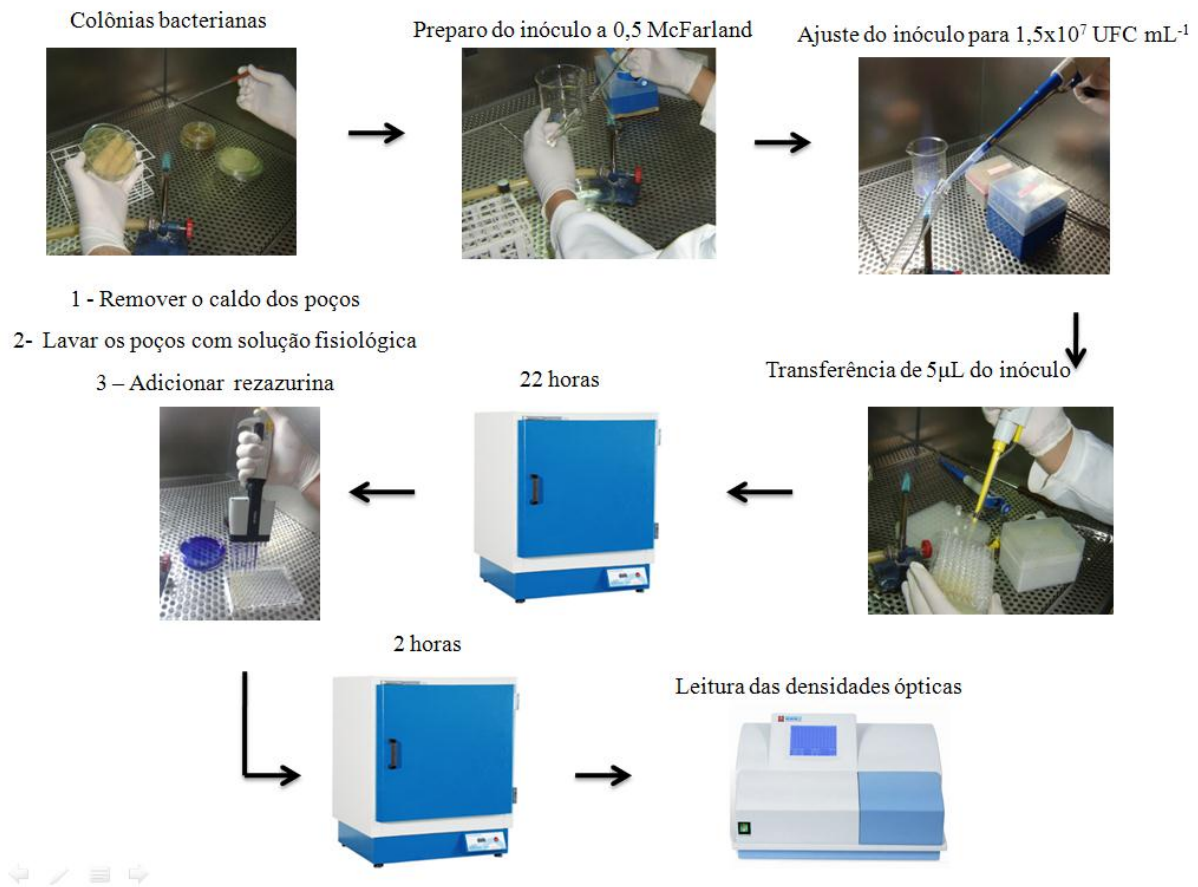


Figura 8. Esquema do ensaio para a determinação da atividade metabólica pelo método resazurina.



As densidades ópticas obtidas permitiram o cálculo da formação de biofilme pela seguinte fórmula: $FB = BA - PC$ (NAVES, 2009). Sendo que FB corresponde à formação do biofilme, BA é a densidade óptica dos poços com as bactérias aderidas, PC representa as densidades ópticas dos poços controle não inoculados.

4.4.4 Determinação da concentração mínima inibitória

Foram determinadas as CMI dos compostos isolados e combinados pela técnica de microdiluição em caldo conforme o protocolo estabelecido pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010) usando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) como indicador de viabilidade bacteriana (SARKERS et al., 2007).

Os compostos foram diluídos em caldo *Muller Hinton*, obtendo-se as concentrações mostradas na Tabela 1.

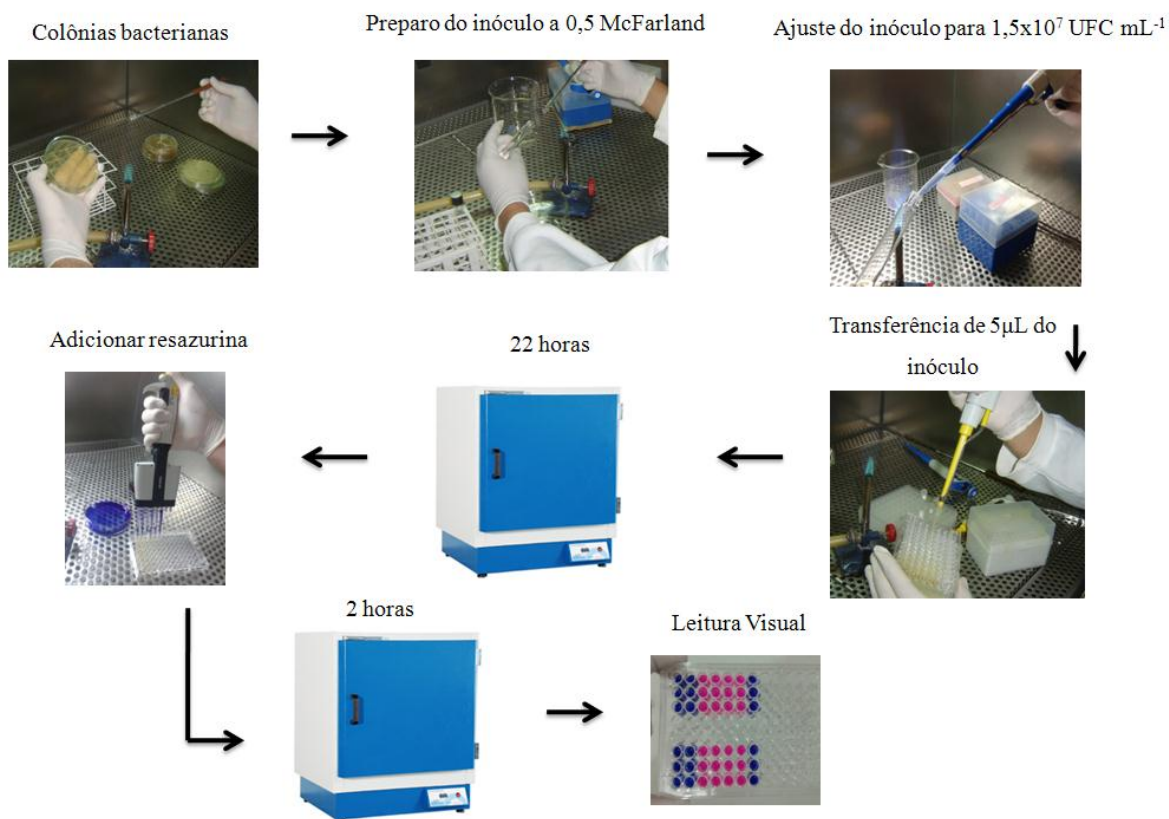
Tabela 1. Concentrações de cada composto testado nos ensaios de determinação da CMI

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carboximetilquitosana	1000; 500; 250; 125 e 62,5
AgNO ₃	1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9 e 1,9
CuSO ₄ .5H ₂ O	1000; 500; 250; 125 e 62,5
ZnSO ₄	1000; 500; 250; 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + AgNO ₃	500 [#] + 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9 e 1,9
Carboximetilquitosana + CuSO ₄ .5H ₂ O	500 [#] + 1000; 500; 250; 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + ZnSO ₄	500 [#] + 1000; 500; 250; 125 e 62,5

[#] No estudo foi fixada a concentração subinibitória de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a carboximetilquitosana combinada aos sais.

Alíquotas de 5 μL do inóculo (1×10^7 UFC mL⁻¹) foram transferidos para os poços da microplaca de poliestireno contendo os compostos nas concentrações testadas. Após incubação das placas a 35°C a 24 horas foi adicionado 100 μL do corante vital resazurina (Sigma) em cada poço da placa. A menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano foi determinada de forma visual, observando-se a mudança de coloração da resazurina adicionado nos poço após incubação de 2 horas. O teste foi acompanhado de controle positivo com os micro-organismos na ausência dos compostos testados e controle negativo. Todos os testes foram realizados em triplicata. O experimento do ensaio de determinação da concentração mínima inibitória está esquematizado na Figura 9.

Figura 9. Esquema do ensaio de determinação da atividade metabólica pelo método da resazurina.



4.4.5 Avaliação da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes

A atividade inibitória da formação de biofilme por concentrações subinibitórias dos compostos isolados e em combinação foi verificada seguindo as metodologias previamente descritas nos ensaios de formação de biofilme, com a utilização do cristal violeta para a determinação da biomassa total formada e da resazurina para o estudo do metabolismo das células bacterianas associadas ao biofilme. A metodologia descrita foi baseada no trabalho de NAVES et al. (2008).

O ensaio de atividade metabólica de biofilme, inicialmente foi realizado conforme o procedimento empregado para a formação de biofilme. Após a incubação das placas a 35 °C por 22 horas foi retirado o caldo crescido com as formas planctônicas e os poços foram

lavados quatro vezes com 300 μL de solução fisiológica estéril. Após este procedimento, foram adicionados 150 μL de corante resazurina a 0,01% em solução aquosa esterilizada. As microplacas foram incubadas novamente por mais 2 horas e as leituras das densidades ópticas a 492 nm e 630 nm foram obtidas. Os experimentos para determinação da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes pelo método cristal violeta e resazurina estão esquematizados na Figura 10 e 11, respectivamente.

Figura 10. Esquema do ensaio da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes pelo método cristal violeta.

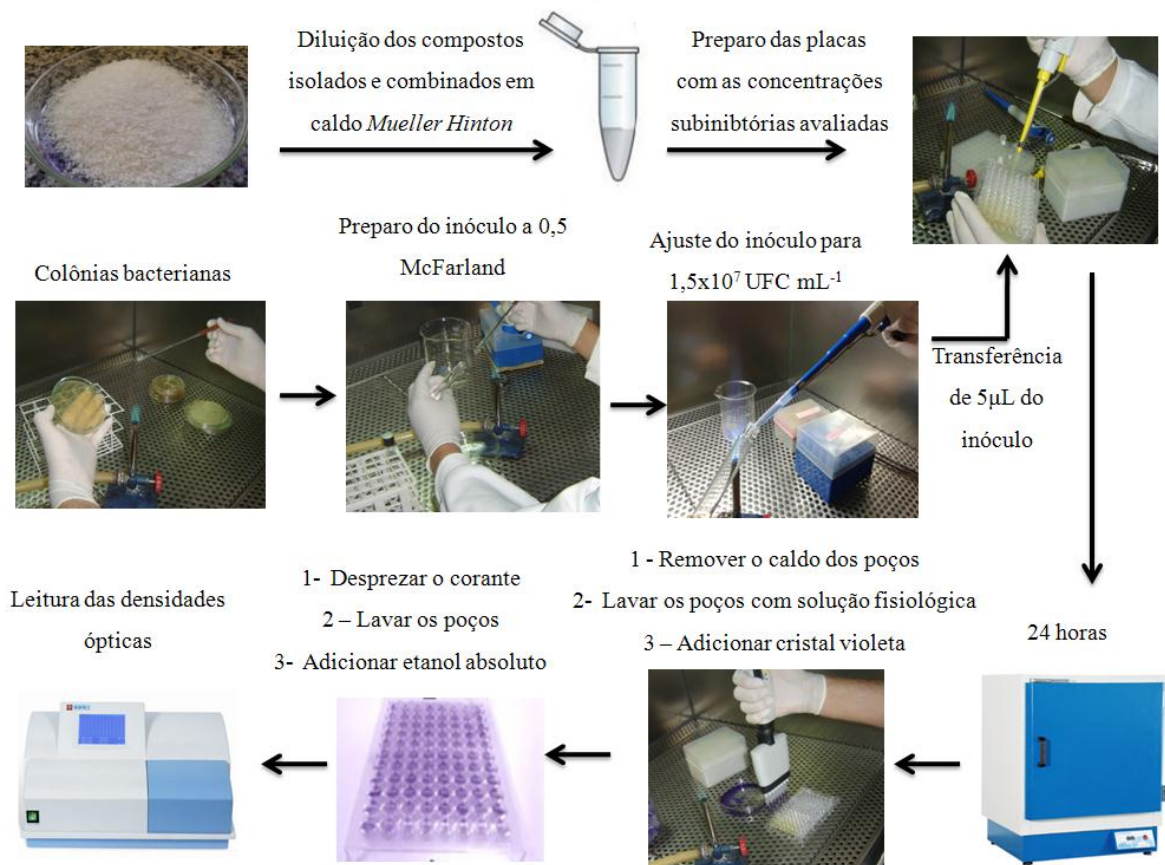
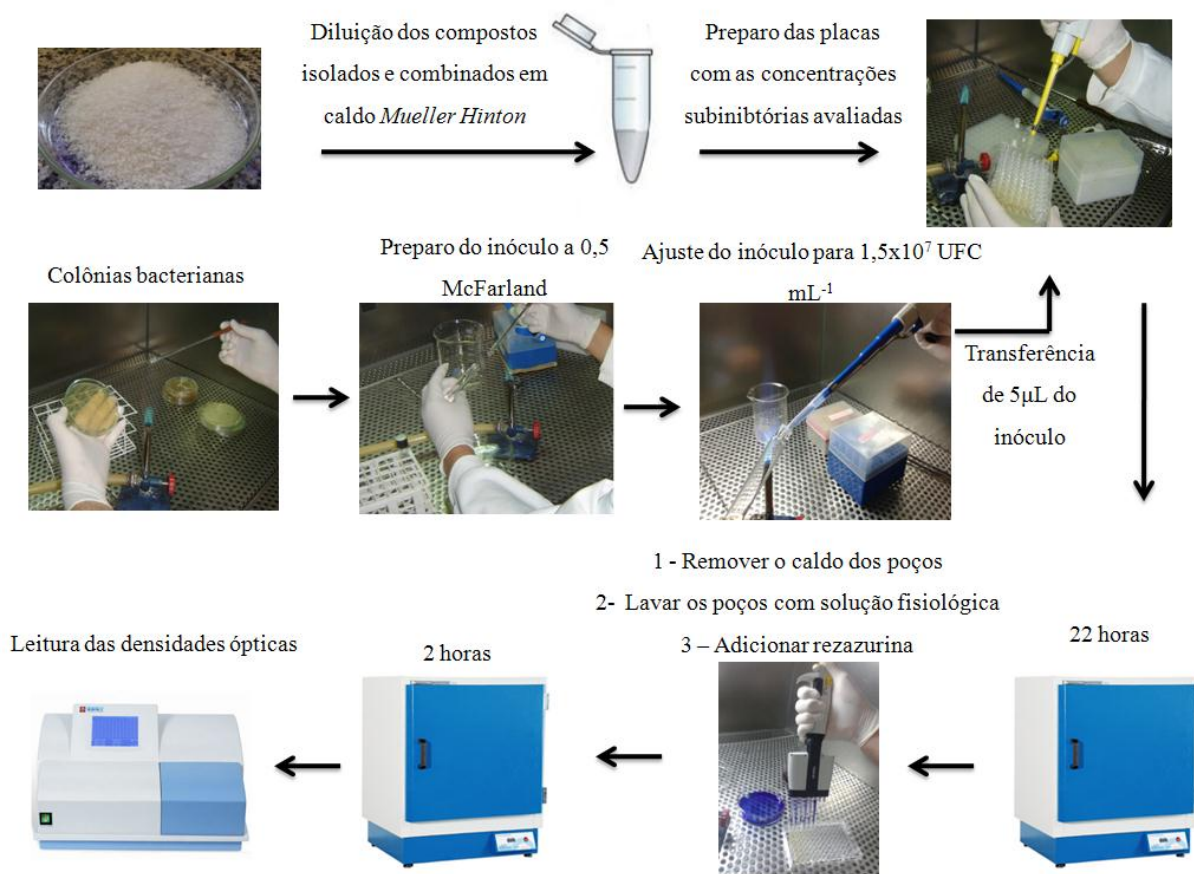


Figura 11. Esquema do ensaio da atividade inibitória por concentrações subinibitórias dos compostos na formação de biofilmes pelo método da resazurina.



A porcentagem de inibição da formação do biofilme por concentrações subinibitórias foi calculada ao comparar a média dos valores de absorvância obtidos com o crescimento do biofilme tratado pelos compostos isolados e em combinação em relação aos valores de absorvância obtidos para os poços controle não inoculados

A porcentagem de redução da atividade metabólica foi determinada pelo cálculo da extinção molar da resazurina, dada pela seguinte fórmula $(PT_{492\text{nm}} - ((PT_{630\text{nm}} \times FC_{630\text{nm}}) / (CP_{492\text{nm}} - (CP_{630\text{nm}} \times FC_{630\text{nm}}))) \times 100$, aonde, PT = DO dos Poços-Teste, FC = DO do Fator de Correção e CP = DO dos controles positivos.

Tendo como referência a CMI dos compostos, foram utilizadas as concentrações subinibitórias descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações subinibitórias dos compostos testados na determinação da atividade inibitória da formação de biofilme.

Compostos	Concentrações subinibitórias ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carboximetilquitosana	1000; 500 e 250
AgNO_3	7,8; 3,9 e 1,9
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	250; 125 e 62,5
ZnSO_4	500; 250 e 125
Carboximetilquitosana + AgNO_3	500 [#] + 7,8; 3,9 e 1,9
Carboximetilquitosana + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	500 [#] + 250; 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + ZnSO_4	500 [#] + 500; 250 e 125

[#] No estudo foi fixada a concentração subinibitória de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a carboximetilquitosana combinada aos sais.

4.4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em ensaios independentes. As variáveis quantitativas geradas – CL_{50} , índices de formação de biofilmes, atividade inibitória da formação de biofilme – foram analisadas descritivamente com o cálculo das médias e desvios padrão.

Para avaliar o significado das diferenças entre a formação de biofilme na presença e na ausência dos compostos para a biomassa foi utilizado o teste t Student pareado bicaudal ($p < 0,01$). Para determinar diferenças significativas entre a atividade inibitória dos compostos isolados e em combinação foi definida pelo teste t Student não pareado bicaudal ($p < 0,01$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

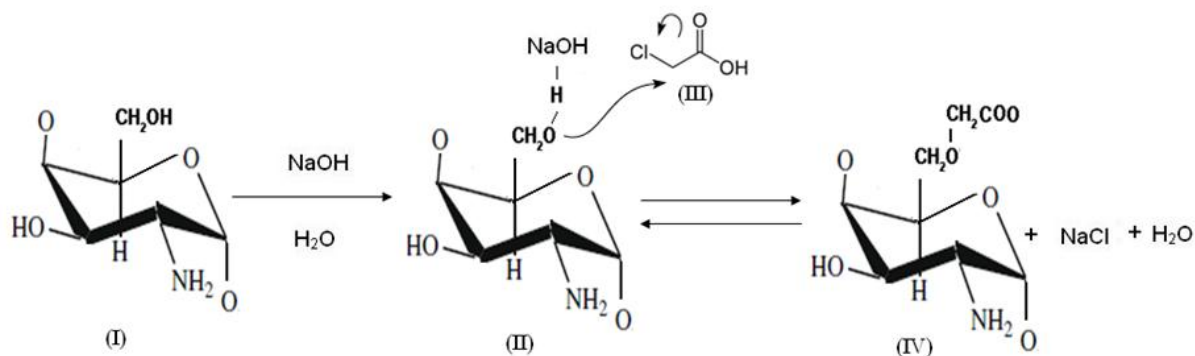
5.1 SÍNTESE DA CARBOXIMETILQUITOSANA E RENDIMENTO DA REAÇÃO

O processo químico de obtenção da carboximetilquitosana envolve dois estágios consecutivos. No primeiro ocorre a reação de alcalinização e em seguida a reação de eterificação.

Na primeira etapa do processo ocorre o tratamento alcalinizante da quitosana em suspensão com isopropanol utilizando solução extremamente concentrada de hidróxido de sódio. O meio fortemente alcalino empregado na reação possui a função de favorecer a ocorrência de protonação dos grupos hidroxílicos, preferencialmente, dos carbonos 3 e 6 da cadeia polimérica da quitosana, preservando os grupamentos NH_2 (MELO, 2009). Neste processo, os grupos hidroxilas protonados, atuam como sítios reativos, permitindo a eterificação da estrutura do polímero (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010).

Na etapa posteriormente de eterificação, a reação consiste no mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$) que ocorre em uma única etapa. No processo o nucleófilo (hidroxilas da quitosana alcalina), previamente polarizado pela solução de hidróxido de sódio, ataca o carbono alfa do ácido monocloroacético (agente eterificante) com expulsão simultânea de cloreto resultando, assim, na substituição do átomo de hidrogênio do grupamento O-hidroxila por grupamentos carboximetil através de uma ligação éter em diferentes monômeros (BAUMANN FAUST, 2001; ABREU, 2006, LARGURA, 2009) conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12. Representação esquemática da síntese da carboximetilquitosana: quitosana (I), quitosana alcalina (II), ácido monocloraacético (III), carboximetilquitosana (IV) (adaptado de ABREU, 2006).



O rendimento de síntese da carboximetilquitosana foi estimado através da relação da massa do produto final (carboximetilquitosana) obtida na reação pela massa do reagente (quitosana). Ao término da reação foi obtido um rendimento superior a 190%. O rendimento reacional superior a 100% sugere que a reação foi bem sucedida. Ressalta-se que o ganho de porcentagem de massa após a reação de carboximetilação através do emprego de ácido monocloraacético ocorre porque há substituição dos átomos de hidrogênio de alguns grupos hidroxílicos (-OH) pelos grupos carboximetila (CH₂COOH) na cadeia polimérica da quitosana (MELO, 2009).

O processo de obtenção do polímero resultou em uma carboximetilquitosana sob a forma de um pó granuloso e esbranquiçado (coloração clara) e solúvel em meio aquoso não acidificado, dentro da especificação descrita em trabalhos anteriores (LOPES, 2005; MELO, 2009).

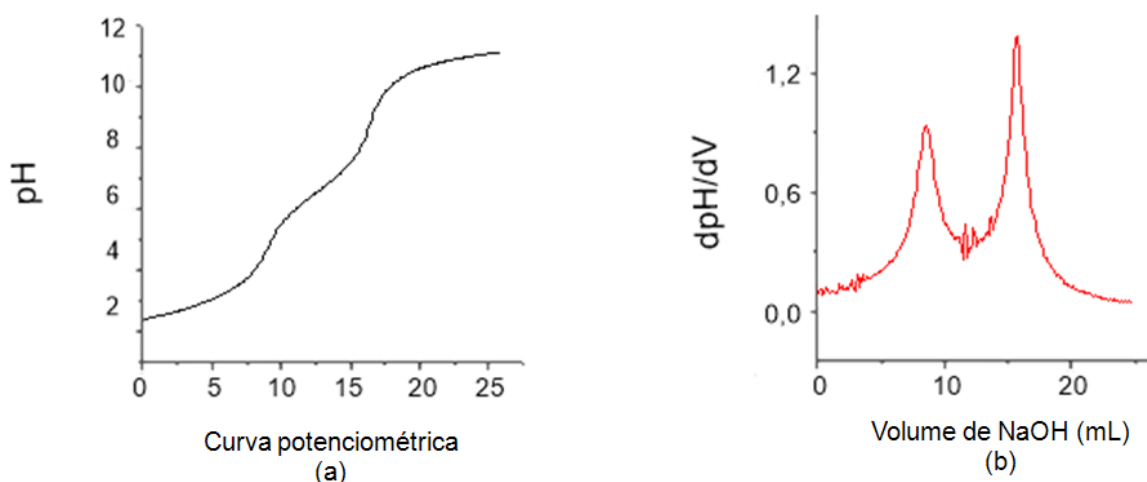
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA

5.2.1 Grau de substituição

O número de grupos carboximetil inseridos na cadeia do polímero por unidade monomérica transformadas, determinado foi de 1,87. Os valores para o grau de substituição obtidos no presente estudo se mostram superiores aos trabalhos de Chen e Park (2003) e Ge e Luo (2005) que sintetizaram diferentes amostras de carboximetilquitosana variando as condições reacionais. No primeiro, os autores, obtiveram amostras de carboximetilquitosana, com valores entre 0,2 a 1,0. Já no segundo, as amostras sintetizadas apresentaram valores entre 0,25 e 0,89. Para Martins (2004) este fato reflete a dificuldade de padronização no processo de síntese, mesmo com o emprego de condições reacionais muito semelhantes.

A partir das medidas da variação do pH em relação ao volume de NaOH adicionado foi construída a curva de titulação da carboximetilquitosana (Figura 13).

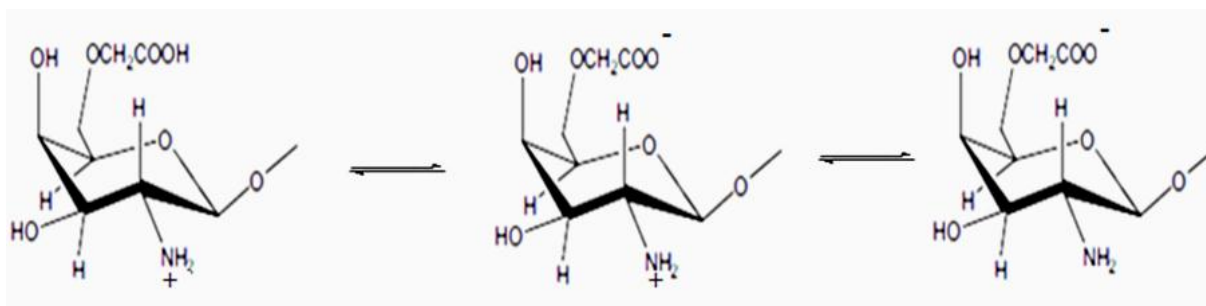
Figura 13. (a) Curva potenciométrica da carboximetilquitosana e (b) derivada de primeira ordem dessa curva.



A titulação potenciométrica da carboximetilquitosana em meio ácido com o hidróxido de sódio é representada por duas reações de equilíbrio. A primeira reação é representada no primeiro ponto de inflexão da curva de titulação potenciométrica. Ela refere-

se ao consumo de NaOH necessário para a desprotonação do grupo funcional ácido carboxílico (-COOH), uma vez que é o grupo que apresenta o menor valor de pKa por ser mais ácido. Já a outra reação representa o segundo ponto de inflexão da curva. Este ponto corresponde à desprotonação do grupamento amino (-NH₃⁺). A Figura 14 ilustra as reações de equilíbrio da titulação potenciométrica da carboximetilquitosana.

Figura 14. Reações da desprotonação dos grupos funcionais aminos e ácido carboxílico da Carboximetilquitosana.



As reações envolvidas na titulação potenciométrica dos derivados carboximetilados avalia o comportamento dos polímeros em função do pH do meio. Para isso o pH foi ajustado para aproximadamente 2,0 (meio ácido), com o emprego de uma solução de ácido clorídrico. O meio ácido indica que os grupos funcionais aminos (-NH₂) e os ácidos carboxílicos (-COOH) da cadeia polimérica estão protonados. Durante o processo de titulação dos grupos funcionais com o emprego da solução de hidróxido de sódio como titulante, a neutralização do excesso de HCl ocasiona a desprotonação dos grupos funcionais da carboximetilquitosana.

A técnica de titulação potenciométrica é utilizada para determinar o grau de substituição de um polímero após a reação de modificação química. É frequentemente um dos procedimentos mais importantes na caracterização da carboximetilquitosana, pois, o grau de substituição, além de comprovar o sucesso da síntese, reflete no comportamento físico químico e biológico do polímero. O grau de substituição é interessante do ponto de vista da atividade antimicrobiana. SUN et al. (2006); ANITHA et al. (2009) relatam que quanto mais alto do grau de substituição da carboximetilquitosana maior o seu potencial antimicrobiano. Martins (2010) avaliou a ação antimicrobiana de derivado da carboximetilquitosana com caráter anfifílico confirmando que o composto que melhor apresentou ação antimicrobiana contra a *S. aureus* foi aquele com maior grau de substituição.

O grau de substituição se refere ao grau de carboximetilação ocorrida durante a reação de síntese da carboximetilquitosana a partir da quitosana. Ele determina a substituição média

do hidrogênio (H) presente nos grupamentos hidroxilas (OH) pelos grupamentos carboximetila (CH_2COO^-) dos monômeros de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose da cadeia polimérica da carboximetilquitosana, diferenciando a quitosana da carboximetilquitosana (BATTISTI e CAMPANA-FILHO, 2008).

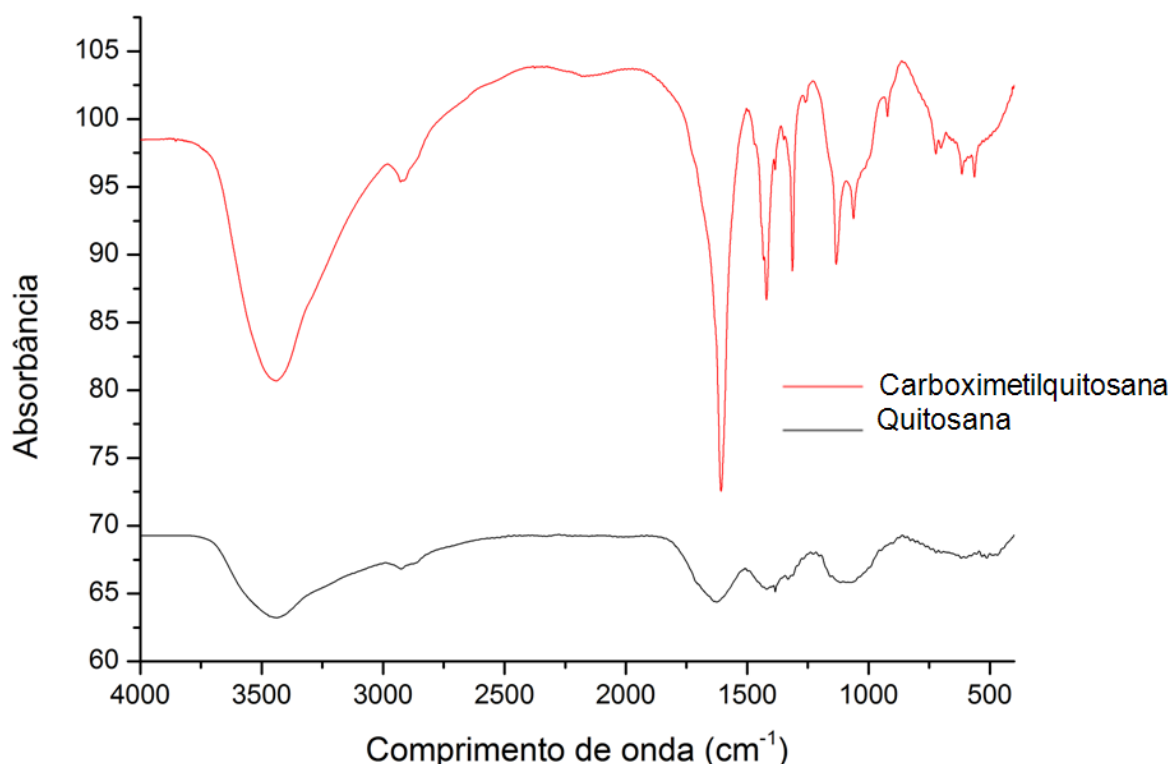
5.2.2 Espectroscopia do infravermelho

O espectro da quitosana e da carboximetilquitosana, mostrada na Figura 15, permitiu avaliar as modificações químicas da quitosana após a reação de carboximetilação. O espectro de infravermelho da quitosana apresenta como bandas características principais: deformação de (-OH) axial larga e intensa na região de 3400 cm^{-1} essa banda que se sobrepõe a banda axial de ($-\text{NH}_2$) que normalmente aparece como duas bandas de absorção fracas; a primeira em 3500 cm^{-1} e a outra em 3400 cm^{-1} . Também é verificada uma banda de deformação axial simétrica relacionada aos grupos (-CH) e (- CH_2) em uma frequência aproximadamente de 2885 cm^{-1} . É possível observar ainda uma banda intensa em torno de 1085 cm^{-1} que é devido à deformação axial assimétrica de éter (C-O-C). Deformação angular simétrica no plano de (N-H) (tesoura) apresenta banda em uma região próximo à 1600 cm^{-1} .

O espectro da carboximetilquitosana sugere que na reação de carboximetilação os grupos carboximetila (ácido carboxílico) foram efetivamente introduzidos nas hidroxilas da matriz polimérica comprovando o sucesso da síntese. Isto é evidenciado na região em 1610 cm^{-1} e 1390 cm^{-1} de deformações axiais simétricas e assimétricas do grupo (-COO) características do grupo carboximetila.

O espectro da carboximetilquitosana apresenta ainda (i) uma banda larga e intensa característica de estiramento axial de grupo (-OH) na região de 3420 cm^{-1} sobrepondo às bandas de estiramento N-H; (ii) banda característica de estiramento C-H em 2890 cm^{-1} ; e uma (iii) deformação axial de C-O de grupo éter na região de 1040 cm^{-1} .

Figura 15. Espectros das análises de infravermelho para carboximetilquitosana e quitosana.



As bandas observadas neste estudo concordam com os descritos por CHEN e PARK, 2003; ROSA, 2008; ANITHA et al., 2009; MOURYA et al., 2010.

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho é um dos principais métodos analítico para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas, uma vez, que fornece informações sobre os grupos funcionais que podem estar presentes nas estruturas das moléculas. Esta valiosa técnica tem sido usada largamente na indústria e na pesquisa científica nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES e FASCIO, 2004).

5.3 ENSAIO DE TOXIDADE COM *Artemia salina*

Os resultados do teste de toxicidade da carboximetilquitosana e dos sais isolados e em combinação sobre as larvas de *Artemia salina* após 24 horas de exposição são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Toxicidade dos compostos expressada como concentração letal para 50% (CL₅₀) das larvas de *Artemia salina*.

Compostos testados	CL ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Classificação da toxicidade (Nguta et al., 2012)
Carboximetilquitosana	> 1000	Não tóxico
AgNO ₃	424,64	Moderada
CuSO ₄ .5H ₂ O	260,87	Moderada
ZnSO ₄	311,55	Moderada
Carboximetilquitosana + AgNO ₃	654,24	Baixa
Carboximetilquitosana + CuSO ₄ .5H ₂ O	520,30	Baixa
Carboximetilquitosana + ZnSO ₄	1108,81	Não tóxico
K ₂ Cr ₂ O ₇	11,49	Forte

Os resultados obtidos demonstram que a carboximetilquitosana não apresentou toxicidade para o microcrustáceo *Artemia salina* nas concentrações testadas. Em contrapartida, pôde-se observar toxicidade para os todos os sais testados, sendo que destes o sulfato de cobre apresentou maior toxicidade (CL₅₀= 260,87 µg mL⁻¹), seguido pelo sulfato de zinco (CL₅₀ = 311,55 µg mL⁻¹) e nitrato de prata (CL₅₀ = 424,64 µg mL⁻¹). As diferenças entre a toxicidade da carboximetilquitosana isolada e em combinação com os sais foram significativas com o valor de p < 0,0001 indicando o efeito protetor da carboximetilquitosana.

Tem sido descrita a ausência de toxicidade da carboximetilquitosana, sugerindo que a utilização deste biopolímero em aplicações médicas é segura. Em recente estudo Martins (2010) analisou a toxicidade de carboximetilquitosana e de seus derivados anfifílicos, utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. O referido autor não identificou níveis significativos de toxicidade. Do mesmo modo, em estudo realizado por Rosa (2008) a carboximetilquitosana não apresentou toxicidade em *Artemia salina*.

Ramesh, Viswanatha e Tharanathan (2004) e Lopes et al. (2005) avaliaram o potencial de toxicidade aguda da carboximetilquitosana em ratos *Wistar* não observando alterações comportamentais dos animais nem qualquer sinal de toxicidade. Vale destacar que na literatura pesquisada não foi encontrada relatos de testes de toxicidade de substâncias, tais

como sais metálicos, incorporadas a carboximetilquitosana com o bioensaio de *Artemia salina*.

Os resultados obtidos revelaram que houve uma redução do efeito tóxico dos íons metálicos para *Artemia salina*, quando combinado com a carboximetilquitosana, denotando um papel protetor deste biopolímero. Estes resultados podem ser atribuídos devido à ausência de efeitos tóxicos observadas na carboximetilquitosana, conforme demonstrado em estudos anteriores, como também sua alta viscosidade dificultando, assim, maior interação dos sais metálicos com as larvas de *Artemia salina*. É interessante assinalar também que a carboximetilquitosana possui forte capacidade de quelação de íons de metálicos (LEITE et al., 2005). Isto explica o porquê da redução da toxicidade dos sais quando combinados a carboximetilquitosana.

A sobrevivência de 100% das *A. salina* no controle de viabilidade e a toxicidade do dicromato de potássio ($CL_{50} = 11,49 \mu\text{g mL}^{-1}$) dentro dos padrões apresentados pela literatura atesta a adequação das condições experimentais (MOLINAS-SALINAS e SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

5.4 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

A Concentração Mínima Inibitória foi um parâmetro observado por meio do emprego indicador colorimétrico de crescimento celular, resazurina. A utilização deste método permitiu verificar o valor da concentração mais baixa das substâncias testadas que impede o crescimento visível dos micro-organismos analisados neste estudo após o tempo de incubação de 24 horas. Nos testes de sensibilidade de antimicrobianos a concentração mínima inibitória é considerada o “padrão ouro” para determinar a suscetibilidade de micro-organismos (ANDREWS, 2001).

Os resultados da CMI da carboximetilquitosana e dos sais isolados e em combinação são apresentados na Tabela 4.

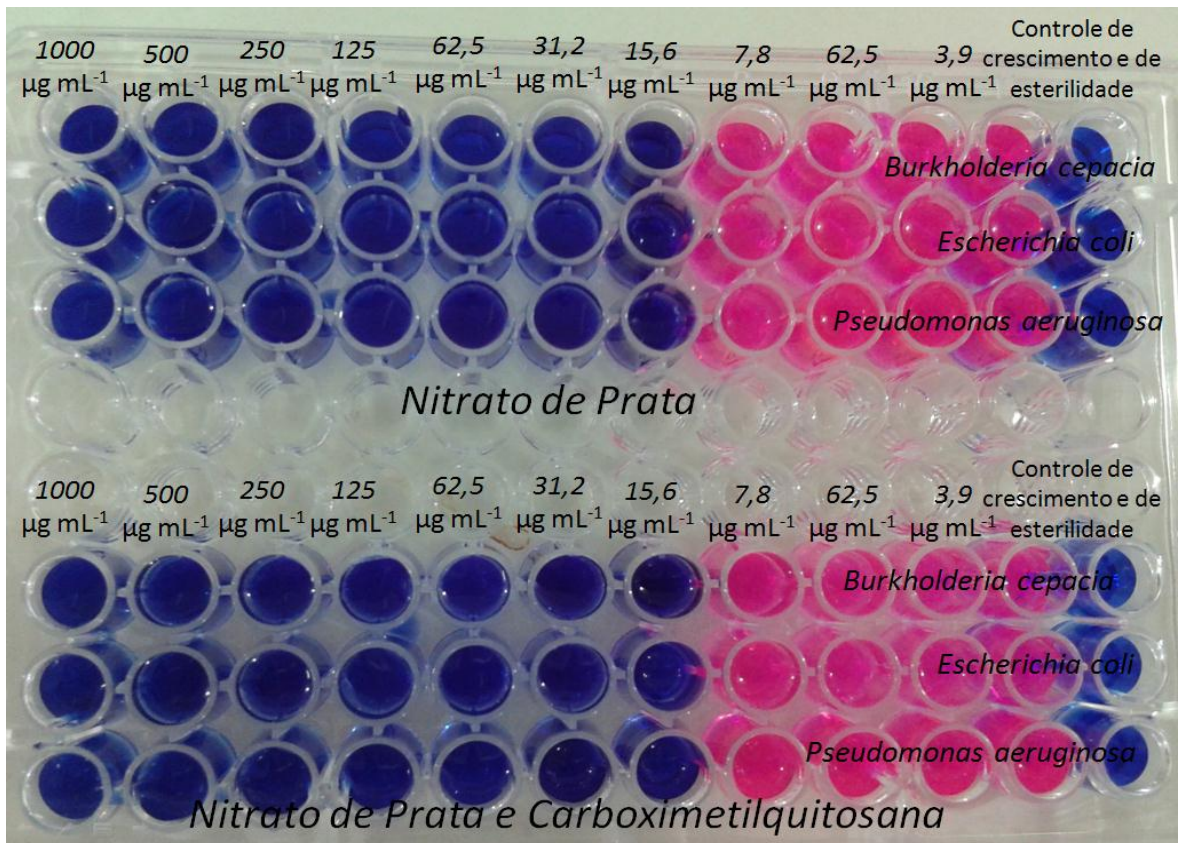
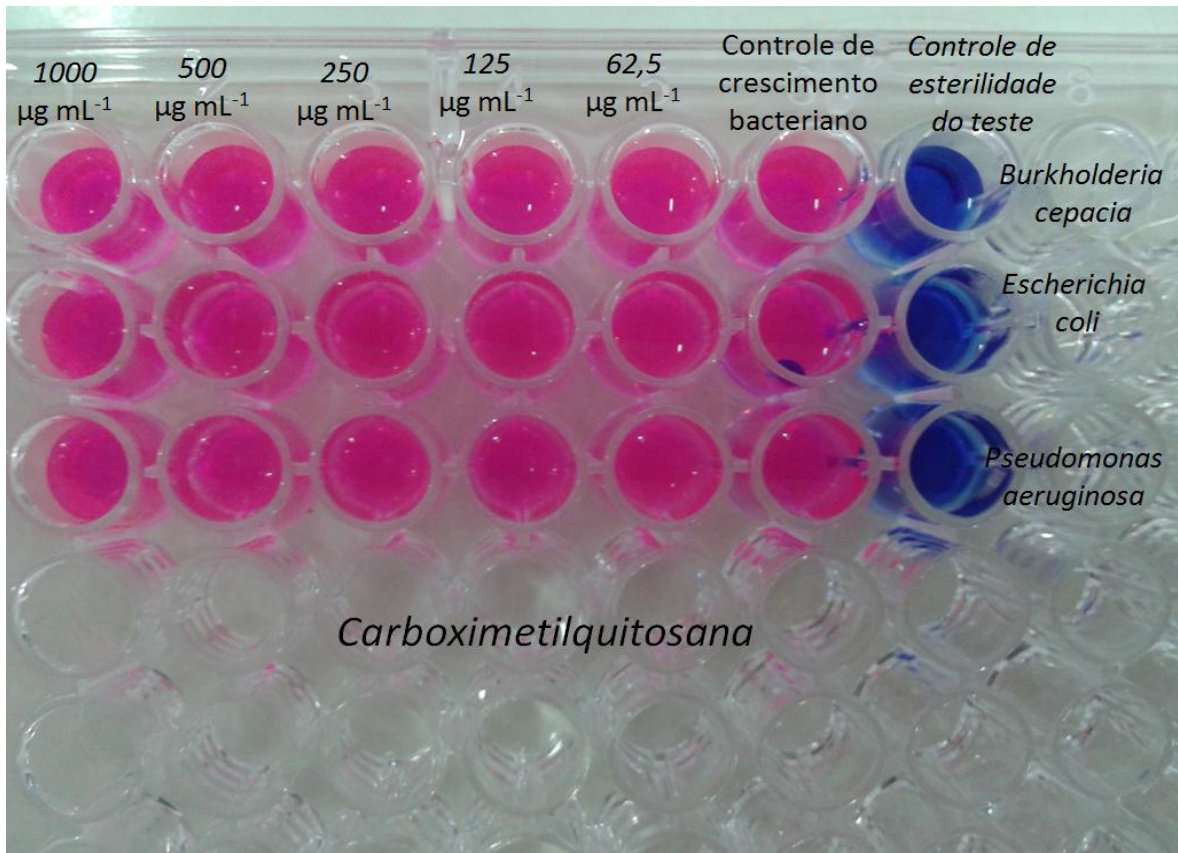
Tabela 4. Concentração mínima inibitória da carboximetilquitosana e dos sais isolados e em combinação.

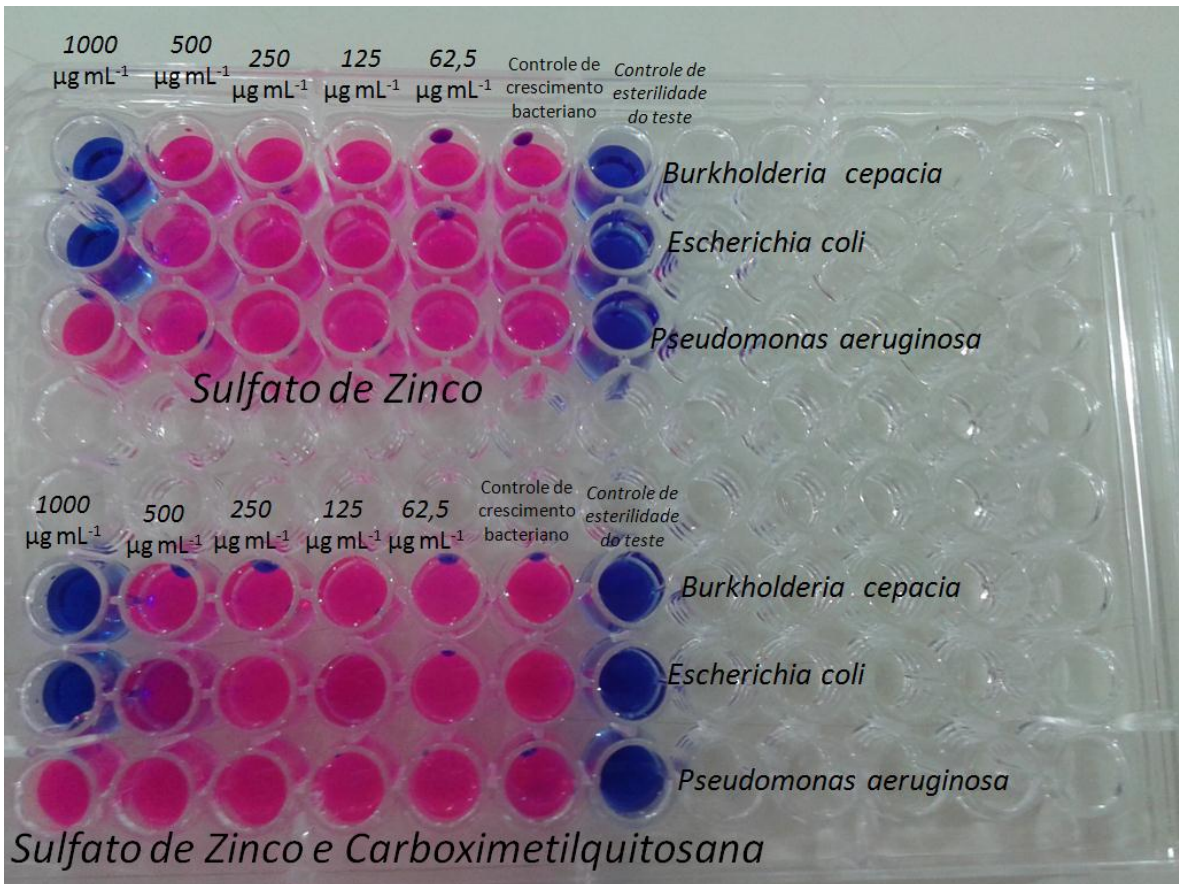
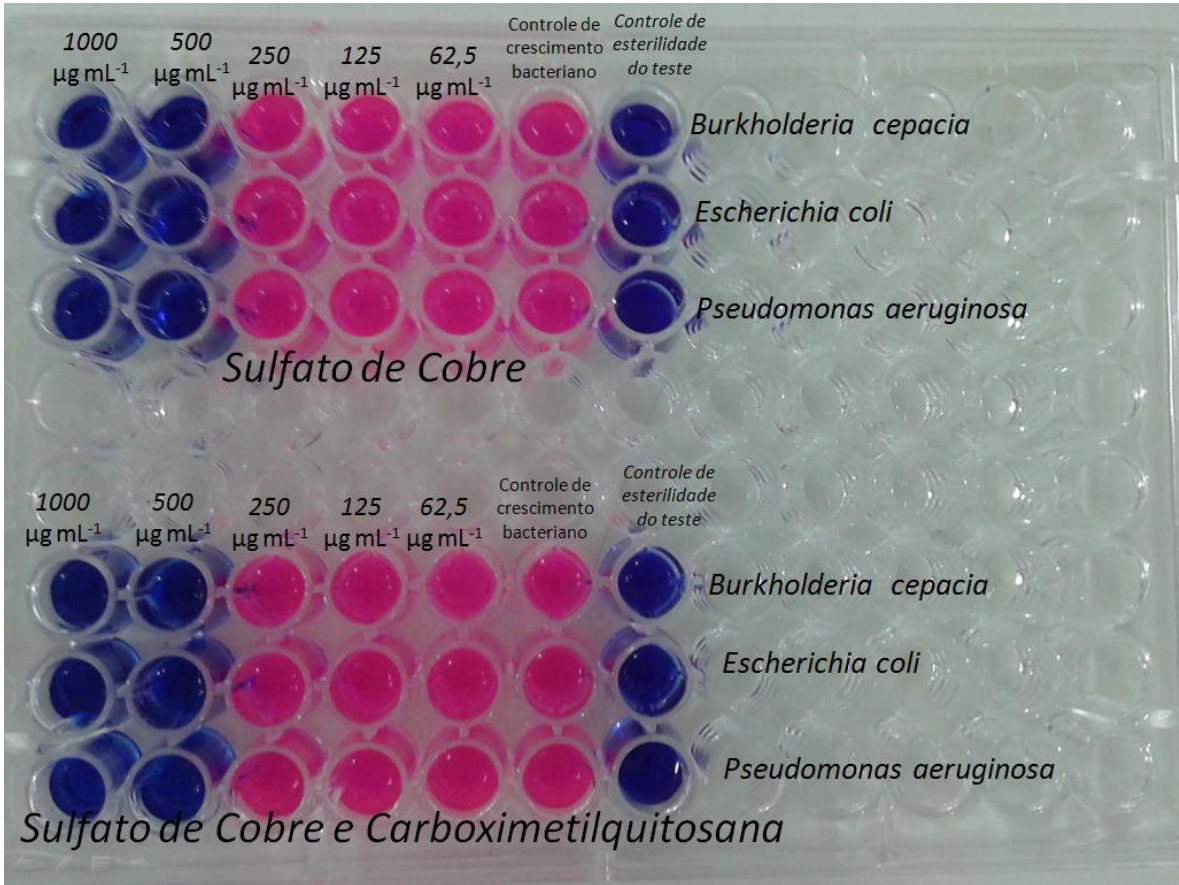
Compostos testados	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>B. cepacia</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Carboximetilquitosana	> 1000	> 1000	> 1000
AgNO ₃	15,6	15,6	15,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	500	500	500
ZnSO ₄	1000	1000	> 1000
Carboximetilquitosana + AgNO ₃	15,6	15,6	15,6
Carboximetilquitosana + CuSO ₄ .5H ₂ O	500	500	500
Carboximetilquitosana + ZnSO ₄	1000	1000	> 1000

Na determinação da CMI, o nitrato de prata isolado e em combinação com a carboximetilquitosana inibiu o crescimento das cepas bacterianas na concentração de 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o sulfato de cobre (isolado e em combinação) a CMI ocorreu na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que o sulfato de zinco (isolado e em combinação) apresentou atividade antimicrobiana na concentração máxima testada (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), excetuando para *Pseudomonas aeruginosa* a qual não conferiu atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações.

A figura 16 mostra os resultados da atividade antimicrobiana representadas pela CMI. Os poços em azul indicam ausência de crescimento bacteriano enquanto os róseos indicam crescimento bacteriano. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (de cor azul) ao seu produto reduzido, resofurina (de cor rósea) na presença de células viáveis (PALOMINO et al., 2002; ROZATTO, 2012).

Figura 16. Placas dos ensaios antimicrobianos revelado com resazurina 0,01%.





Neste estudo a carboximetilquitosana não demonstrou atividade inibitória do crescimento bacteriano para as três cepas estudadas. No estudo de Martins (2010), dos quatorze derivados anfifílicos da carboximetilquitosana apenas três demonstraram atividade antimicrobiana, sendo que um composto apresentou significativa atividade (CMI = 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra a cepa *S. aureus*, e dois compostos apresentaram efeito em concentrações mais elevadas para os micro-organismos *S. aureus* (CMI = 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. albicans* (CMI = 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em outro estudo, bases de schiff produzidas por meio da reação da carboximetilquitosana com aldeídos aromáticos foram testadas por Guo et al. (2006) como agentes antifúngicos com os fungos *Valsa mali*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporium*. Observou-se que tal produto potencializou o efeito antifúngico da molécula de carboximetilquitosana.

Em relação aos estudos efetuados por Ribeiro (2013) sobre a atividade antifúngica da carboximetilquitosana na formação de biofilme de leveduras do gênero *Candida*, o polímero apresentou uma discreta atividade antifúngica para algumas cepas.

Os metais apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias testadas. A exceção foi verificada em *Pseudomonas aeruginosa*, a qual apresentou crescimento em todas as concentrações testadas para o sulfato de zinco. Os resultados também mostraram que não houve diferença de atividade antimicrobiana entre os metais isolados e em combinação com a carboximetilquitosana, uma vez, que os valores da CMI foram idênticos. Este fato evidencia que não há ocorrência de sinergismo entre os compostos.

Foi possível observar que os micro-organismos apresentam ser mais sensíveis ao emprego do nitrato de prata, nomeadamente porque mostrou valores de CMI mais baixos quando comparado aos demais metais que apresentaram valores mais altos. Diferentes patógenos (tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), são suscetíveis à ação de antimicrobianos à base de prata e os resultados do presente estudo corroboram com os dados da literatura que apresentaram excelentes resultados *in vitro* para este metal (KIM et al., 2007; JUNG et al., 2008; KORA e ARUNACHALAM, 2011).

Embora, a prata seja utilizada como um agente antimicrobiano desde a antiguidade, os seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados. É provável que ocorra uma interação da prata com a membrana bacteriana e interferência em processos vitais, incluindo (i) desativação do ácido desoxirribonucléico e proteínas enzimáticas; (ii) inibição da divisão celular; (iii) bloqueio da respiração celular; (iv) aumento da permeabilidade da

membrana e (v) aumento da produção de espécies reativas de oxigênio causando danos (FENG et al., 2002; JUNG et al., 2008; MORONES-RAMIREZ et al., 2013).

A atividade antibacteriana do cobre já foi relatada anteriormente para diversos micro-organismos, entre os quais se incluem *Salmonella enterica* e *Campylobacter jejuni* (FAÚNDEZ et al., 2004), *Escherichia coli* O157: H7 (MICHELS et al., 2005 e 2008 e WILKS, MICHELS e KEEVIL (2005), *Salmonella enterica* (ZHU et al., 2012); *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (STEINDL et al., 2012); *Staphylococcus haemolyticus* (SANTO et al., 2012). *Enterococcus faecalis* (WARNES e KEEVIL, 2011).

Os mecanismos de atividade antimicrobiana do cobre são explicados por Paiva (2009). Conforme o autor o efeito antimicrobiano deste metal são atribuídos a três fatores: (i) o primeiro pressupõe que a habilidade do cobre de aceitar ou doar facilmente seus elétrons altere as proteínas das células dos micro-organismos impedindo a execução de processos do metabolismo promovendo a morte da bactéria; (ii) além disso, o cobre tem a capacidade de perturbar a permeabilidade seletiva da membrana celular dos micro-organismos causando-lhes danos; (iii) e por fim, se observa que o cobre é responsável por inibir o transporte de eletrólitos nas interações da parede celular, ligando o DNA e desordenando as estruturas helicoidais.

Nas últimas décadas, muitas pesquisas concentraram-se nas propriedades antimicrobiana do zinco. Estudos tem confirmado a ação antimicrobiana deste metal sobre muitas espécies de bactérias, incluindo *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* (FAIZ et al., 2011), *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri*, *Lactococcus lactis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *S. aureus* (OLADIPO, ADEOYE e ADEYEMO (2013). O mecanismos do efeito antimicrobiano do zinco foi referenciado por Canteli (2010) com base em pesquisas de outros pesquisadores que utilizaram como organismo experimental a *Escherichia coli*. Os autores relataram que o zinco atuaria inibindo o transporte ativo de açúcares, aminoácidos e succinato na célula de *Escherichia coli*. Além disso, os íons de zinco atuariam no bloqueio da atividade do sistema oxidase, inibindo a atividade da cadeia respiratória dos micro-organismos.

5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Na Tabela 5 são apresentados as médias e os desvios padrão das densidades ópticas obtidas nos ensaios de formação de biofilme pela técnica da biomassa pelo cristal violeta e a classificação das cepas conforme a capacidade de formar biofilme.

Tabela 5. Classificação da Formação de biofilme pelas bactérias estudadas.

Cepas/Controle	DO 420 nm (MED ± DP)	Classificação
<i>B. cepacia</i>	0,724 ± 0,014	Moderado (0,691)
<i>E. coli</i>	0,685 ± 0,042	Moderado (0,652)
<i>P. aeruginosa</i>	1,371 ± 0,050	Forte (1,338)
Poços controle não inoculados	0,033 ± 0,004	-

Os resultados obtidos permitiram a identificação do padrão de formação de biofilme pelas bactérias estudadas. Houve formação moderada de biofilme pela *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759) e *Escherichia coli* (ATCC 25312). Porém, verificou-se que a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) possui forte capacidade de formação de biofilme na superfície da placa de poliestireno.

O ensaio colorimétrico com cristal violeta é uma metodologia presuntiva muito útil para quantificar a formação de biofilmes de diferentes micro-organismos. O corante cristal violeta se liga a biomassa do biofilme por apresentar afinidade por células e pela matriz extracelular permitindo, assim o estudo de formação e desenvolvimento através de medidas de densidade óptica. Este método é extensamente usado por se caracterizar como rápido e adaptável; de baixo custo e de alto rendimento; confiável e simples (LI et al, 2003; PITTS et al, 2003; RAMAGE et al., 2005).

Sabe-se que a capacidade específica de formação de biofilme difere de acordo com a cepa bacteriana. Características das cepas como a hidrofobicidade, a carga elétrica da superfície do micro-organismo, capacidade de produção de exopolissacarídeos e a presença ou ausência de apêndices celulares externos, como pili, flagelos e proteínas para adesão, são importantes fatores que podem afetar o processo de formação de biofilme (ZOTTOLA, 1994;

PARIZZI et al., 2004; CHAE et al., 2006).

Dentre as bactérias Gram-negativas produtoras de biofilme destacam-se a *Pseudomonas aeruginosa* (MACEDO, 2000). Segundo Freitas, Sand e Simonett (2010), *Pseudomonas aeruginosa* é um micro-organismo caracterizado por grande aptidão para formar biofilmes. As características que posicionam a *Pseudomonas aeruginosa*, entre as principais bactérias com habilidade em formar biofilme, estão (i) a composição extremamente hidratada da matriz extracelular, (ii) produção de cápsula (iii) e a presença de flagelos.

Tem sido reconhecido, conforme discutido por Freitas, Sand e Simonett (2010) que cepas que produzem matriz altamente hidratada aderem facilmente à superfície devido à superação de força de repulsão eletrostática que favorece a interação celular com a superfície de contato. Semelhantemente a produção de cápsula de natureza hidrofóbica pela *Pseudomonas aeruginosa* e demais micro-organismos é um fator importante para o estabelecimento do biofilme. Pesquisadores com, Peters e Pulverer (1984) e Jain e Agarwal (2009), tem sugerido que a cápsula facilita a aderência e fixação da bactéria em superfícies, condição inicial necessária à formação do biofilme.

Além disso, enfatiza-se que a *Pseudomonas aeruginosa* possui a capacidade de locomoção por meio de flagelos polares; apêndice celular que além de atribuir mobilidade à bactéria assume grande importância na aderência da bactéria às superfícies conforme discutido por O'Toole e Kolter (1998).

Com relação à *Escherichia coli*, já foi demonstrado sua moderada capacidade de formar biofilmes (SHEIK et al., 2001). Em estudos realizados foi verificado que a motilidade flagelar é indispensável para a bactéria se espalhar ao longo de superfícies inertes para a formação de biofilme (SHEIKH et al., 2001; REISNER et al., 2003; HOUDT E MICHIELS, 2005; REISNER et al., 2006; WOOD et al., 2006).

Tem sido reportado que a motilidade exibida pela *Escherichia coli* mediada por flagelos parece ser essencial na formação do biofilme. Esta estrutura contraria as forças hidrodinâmicas e eletrostáticas perto da superfície e impulsionam as células em direção a uma superfície favorável à colonização (DUNNE, 2002; VAN HOUDT E MICHIELS, 2005; WOOD et al., 2006; PRUSS et al., 2006). Por outro lado, Prigent Combaret et al., (2000) estudando estruturas da superfície bacteriana envolvidas na formação do biofilme mostraram que a motilidade flagelar é dispensável para formação de biofilme em cepas de *Escherichia coli* ompR234.

Diversos estudos realizados, tais como os conduzidos por Cookson et al. (2002), Moreira et al. (2003) e Orndorff et al. (2004), correlacionam uma possível associação entre a formação de biofilme em superfícies abióticas por cepas de *Escherichia coli* com a presença da organela adesiva denominada de fimbria curli (ou pili). Tem sido reportado que as fimbrias curli são estruturas importantes para as interações iniciais da superfície celular e das interações entre as células, promovendo, assim, a formação de biofilme em superfícies abióticas (COOKSON et al 2006; UHLICH et al 2006).

Os resultados do estudo de Pratt e Kolter (1998) reforçam a ideia de que fimbria e flagelos são essenciais para a formação de biofilmes. No referido estudo foi verificado em mutantes de *Escherichia coli* (K-12) que a ausência de fimbria e de flagelos interfere na capacidade de formação de biofilme, pois não se observou nenhuma fixação da bactéria à superfície a ser colonizada.

A formação de biofilme *in vitro* é uma habilidade comum de cepas de *Burkholderia cepacia* e tem sido tido relatadas em infecções persistentes do trato respiratório em pacientes fibrocísticos. Além disso, uma das principais limitações na erradicação bem sucedida de *Burkholderia cepacia* tem sido associada com sua capacidade de formar biofilmes (CONWAY, VENU e SPEERT, 2002).

Dales et al. (2009) em seu estudo verificaram a suscetibilidade de combinações de 94 antibióticos frente cepas de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* em condições de biofilmes, cultivadas a partir de amostras de pacientes com fibrose cística. Os testes de suscetibilidade demonstraram que o biofilme de *Burkholderia cepacia* foi mais resistente aos antibióticos quando comparado aos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. Algumas das estruturas celulares de *Burkholderia cepacia* incluem flagelos polares usados para a motilidade e pili usado na adesão.

5.6 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os resultados da inibição da formação de biofilme dos compostos isolados e combinados na presença de concentrações subinibitórias (determinados após a realização de teste de avaliação da CMI) pelo método de cristal violeta estão expressos na tabela 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Porcentagem de inibição da formação de biofilme na presença de concentrações subinibitórias dos compostos isolados, comparada aos controles sem os compostos pelo método de determinação da biomassa total com cristal violeta.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cepas		
		<i>B. cepacia</i> (MED \pm DP)	<i>E. coli</i> (MED \pm DP)	<i>P. aeruginosa</i> (MED \pm DP)
CMQ	1000	82,35 \pm 3,00	82,74 \pm 1,53	64,77 \pm 2,08
	500	81,74 \pm 2,52	84,59 \pm 2,52	23,60 \pm 1,53
	250	81,35 \pm 2,65	74,54 \pm 1,53	21,87 \pm 1,53
AgNO ₃	7,8	87,89 \pm 2,00**	88,56 \pm 2,08**	72,46 \pm 2,52**
	3,9	78,33 \pm 1,73	77,70 \pm 2,08*	72,46 \pm 2,08**
	1,9	74,29 \pm 2,00	44,75 \pm 3,06*	62,44 \pm 2,52**
CuSO ₄ .5H ₂ O	250	81,68 \pm 2,52	83,25 \pm 3,06	72,14 \pm 3,06**
	125	78,12 \pm 1,53	81,75 \pm 1,53*	70,14 \pm 2,00**
	62,5	63,30 \pm 1,53*	68,62 \pm 1,24*	55,35 \pm 2,08**
ZnSO ₄	500	85,66 \pm 1,53	77,97 \pm 2,00*	62,53 \pm 3,06**
	250	77,92 \pm 2,08	73,00 \pm 2,62*	59,98 \pm 2,08**
	125	71,80 \pm 1,53*	71,73 \pm 1,88*	59,00 \pm 3,06**

CMQ: carboximetilquitosana. MED: Média. DP: Desvio padrão

* Diferenças significativas, CMQ (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou melhor ação inibitória sobre a formação de biofilme quando comparada com os sais.

** Diferenças significativas, os sais isolados apresentaram melhor ação inibitória sobre a formação de biofilme quando comparada com a CMQ (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 7. Porcentagem de inibição da formação de biofilme na presença de carboximetilquitosana 500 µg mL⁻¹ combinada com os sais, comparada aos controles sem os compostos pelo método de determinação da biomassa total com cristal violeta.

Compostos	Concentração (µg mL ⁻¹)	Cepas		
		<i>B. cepacia</i> (MED ± DP)	<i>E. coli</i> (MED ± DP)	<i>P. aeruginosa</i> (MED ± DP)
CMQ	7,8	93,04 ± 1,73 ^{**}	81,36 ± 3,21	93,22 ± 2,89 ^{**}
+ AgNO ₃	3,9	92,07 ± 1,00 ^{**}	80,65 ± 1,53 [*]	72,69 ± 3,2 ^{**}
	1,9	89,90 ± 0,58 ^{**}	76,49 ± 3,21 ^{**}	72,26 ± 2,52 ^{**}
CMQ	250	76,71 ± 1,53 [*]	83,25 ± 4,04	71,87 ± 2,89 ^{**}
+ CuSO ₄ .5H ₂ O	125	76,57 ± 1,15 [*]	78,75 ± 3,06 [*]	70,20 ± 1,53 ^{**}
	62,5	4,11 ± 1,00 [*]	68,62 ± 3,21 [*]	37,11 ± 2,65 ^{**}
CMQ	500	88,68 ± 1,53 ^{**}	77,39 ± 4,16 [*]	91,01 ± 3,06 ^{**}
+ ZnSO ₄	250	87,75 ± 1,53 ^{**}	76,71 ± 4,04 [*]	70,98 ± 3,21 ^{**}
	125	84,74 ± 3,21	72,75 ± 3,21 [*]	70,55 ± 1,00 ^{**}

CMQ: carboximetilquitosana. MED: Média. DP: Desvio padrão

* Diferenças significativas, CMQ isolada apresentou melhor ação inibitória sobre a formação de biofilme quando comparada com a CMQ combinada com os sais.

** Diferenças significativas, CMQ combinada com os sais apresentou melhor ação inibitória sobre a formação de biofilmes quando comparada com a CMQ isolada.

Foi detectada inibição da biomassa total dos biofilmes na presença da carboximetilquitosana isolada e em combinação com os sais para as diferentes concentrações avaliadas. Segundo Tan et al. (2011), a carboximetilquitosana é um polímero antibiofilme, que atua impedindo a aderência de cepas bacterianas e inibindo a formação de biofilme. Para Yu et al. (2011) a ação da carboximetilquitosana sobre a formação do biofilme ocorre por meio da floculação das células dos micro-organismos causada pela inibição da aderência e redução da interação célula-célula.

Os valores de porcentagem de inibição da biomassa total para as três cepas estudadas pela carboximetilquitosana isolada (500 µg mL⁻¹) foram confrontados com valores da porcentagem de inibição das diferentes concentrações dos sais isolados.

Dentre um total de 27 diferentes concentrações subinibitória dos sais isolados na inibição da formação de biofilme houve diferença significativa em um total de 21 (77,77%) concentrações subinibitórias quando comparado aos valores de porcentagem de inibição obtidos para a carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 6).

Observou-se que a carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou melhor atividade sobre a inibição da formação de biofilme em 10 (37,03%) diferentes concentrações subinibitórias, ao passo que o efeito dos sais isolados sobre a inibição da formação de biofilme foi mais ativo sobre 11 (40,74%) diferentes concentrações.

Semelhantemente, o valor da porcentagem de inibição do biofilme para as três cepas estudadas pela carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram comparadas aos valores de inibição das diferentes concentrações da carboximetilquitosana combinada com os sais. Dentre as 27 diferentes concentrações subinibitórias avaliadas para a carboximetilquitosana combinada com os sais houve diferença significativa em um total de 24 (88,88%) concentrações subinibitórias quando comparadas as porcentagem de inibição demonstrada para a carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) conforme mostrado na Tabela 7.

A carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou melhor atividade sobre a inibição da formação de biofilme em 9 (33,33%) diferentes concentrações subinibitórias, ao passo que o efeito da carboximetilquitosana combinada com os sais sobre a inibição da formação de biofilme foi mais ativo sobre 15 (55,96%) diferentes concentrações subinibitórias.

5.6 REDUÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO BIOFILME NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DOS COMPOSTOS

Na tabela 8 são apresentados os valores da porcentagem de inibição da atividade metabólica de células viáveis associadas ao biofilme na presença de concentrações subinibitórias da carboximetilquitosana e dos sais isolados.

Tabela 8. Porcentagem de redução da atividade metabólica das bactérias associadas ao biofilme na presença de concentrações subinibitórias da carboximetilquitosana e dos sais isolados, comparada aos controles sem os compostos pelo método da resazurina.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cepas		
		<i>B. cepacia</i> (MED \pm DP)	<i>E. coli</i> (MED \pm DP)	<i>P. aeruginosa</i> (MED \pm DP)
CMQ	1000	76,75 \pm 0,60	77,66 \pm 0,68	87,00 \pm 0,31
	500	67,29 \pm 0,20	63,68 \pm 0,49	70,43 \pm 0,49
	250	56,48 \pm 0,23	56,79 \pm 0,19	61,87 \pm 0,19
AgNO ₃	7,8	54,00 \pm 0,53	88,56 \pm 0,56	54,05 \pm 0,44
	3,9	41,58 \pm 0,46	59,61 \pm 0,56	40,78 \pm 0,13
	1,9	35,13 \pm 0,88	19,53 \pm 0,50	27,50 \pm 0,61
CuSO ₄ .5H ₂ O	250	36,84 \pm 0,29	26,35 \pm 0,27	69,06 \pm 0,39
	125	29,31 \pm 0,91	19,30 \pm 0,22	69,60 \pm 0,64
	62,5	19,15 \pm 0,35	-31,70 \pm 0,08	47,92 \pm 0,51
ZnSO ₄	500	57,80 \pm 0,28	16,66 \pm 0,82	86,82 \pm 0,56
	250	39,20 \pm 0,33	4,85 \pm 0,14	63,04 \pm 0,71
	125	-37,90 \pm 0,66	17,30 \pm 0,94	60,36 \pm 0,57

CMQ: carboximetilquitosana. MED: Média. DP: Desvio padrão

A análise revelou inibição da atividade metabólica das células associadas ao biofilme pela carboximetilquitosana e os sais isolados frente todas as bactérias testadas, excetuando para *B. cepacia* na presença de sulfato de Zinco 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para *E. coli* na presença de sulfato de cobre 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Observa-se que a carboximetilquitosana, em concentrações subinibitórias, inibiu a atividade metabólica das bactérias em biofilme acima de 50%. Os sais apresentaram diferente perfil de redução da atividade metabólica do biofilme, sendo que para as maiores concentrações testadas, respectivamente para nitrato de prata, sulfato de cobre e sulfato de zinco, houve redução da atividade metabólica em 88,56% para *E. coli*, 69,05% para *P. aeruginosa* e 86,82% para *P. aeruginosa*.

Este método é utilizado para quantificar a atividade metabólica de respiração de uma cultura bacteriana em crescimento. Baseia-se na conversão bioquímica da resazurina em seu

produto reduzido resofurina por ação da succinil-desidrogenase, enzima presente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas relacionadas com o sistema de transporte de íons H^+ para dentro da mitocôndria durante o metabolismo (O'BRIEN et al., 2000).

Na tabela 9 apresentam-se os valores de porcentagem de inibição da atividade metabólica das bactérias associadas ao biofilme na presença de CMQ $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ combinada com os sais.

Tabela 9. Porcentagem de redução da atividade metabólica das bactérias associadas ao biofilme na presença de carboximetilquitosana $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ combinada com os sais, comparada aos controles sem os compostos pelo método da resazurina.

Compostos	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cepas		
		<i>B. cepacia</i> (MED \pm DP)	<i>E. coli</i> (MED \pm DP)	<i>P. aeruginosa</i> (MED \pm DP)
CMQ + AgNO_3	7,8	62,14 \pm 0,38	40,36 \pm 0,44	72,78 \pm 0,31
	3,9	44,32 \pm 0,49	30,13 \pm 0,48	58,46 \pm 0,37
	1,9	20,20 \pm 0,49	20,40 \pm 0,44	56,53 \pm 0,32
CMQ + $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	250	31,28 \pm 0,23	40,36 \pm 0,26	71,87 \pm 0,11
	125	13,84 \pm 0,30	30,13 \pm 0,55	70,20 \pm 0,95
	62,5	14,30 \pm 0,40	20,00 \pm 0,92	37,11 \pm 0,94
CMQ + ZnSO_4	500	17,00 \pm 0,27	65,10 \pm 0,43	71,80 \pm 0,78
	250	10,40 \pm 0,43	55,80 \pm 0,22	61,47 \pm 0,03
	125	7,00 \pm 0,46	4,90 \pm 0,15	56,98 \pm 0,26

CMQ: carboximetilquitosana. MED: Média. DP: Desvio padrão

No estudo realizado com os compostos combinados também houve diminuição da atividade metabólica frente a todas as cepas estudadas, conforme mostrado na tabela 9.

A carboximetilquitosana em combinação com o nitrato de prata em concentração de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ promoveu redução da atividade metabólica de 62,14%, 40,36 e 72,78, para *B. cepacia*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Já para o sulfato de cobre (combinado com a carboximetilquitosana) em concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu maior redução da atividade metabólica para *P. aeruginosa* (71,87%), seguido de *E. coli* (40,36%) e *B. cepacia* (31,28%). Semelhantemente o sulfato de zinco (na concentração de 500mg mL^{-1}) em combinação com a

carboximetilquitosana mostrou maior redução da atividade metabólica para os micro-organismos *P. aeruginosa* (71,80%), *E. coli* (65,10%) e *B. cepacia* (17,00%), respectivamente.

Na concentração mínima de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de zinco em combinação com a carboximetilquitosana praticamente não houve redução da atividade metabólica das células de *B. cepacia* (0,07%) e *E. coli* (4,90%)

Apesar da carboximetilquitosana não ter apresentado uma atividade inibitória do crescimento total nas concentrações testadas, sem a determinação da CMI, apresentou um interessante nível de inibição da formação de biofilme, tanto da biomassa total como do metabolismo das células associadas a esta estrutura.

6 CONCLUSÃO

- A reação de carboximetilação da quitosana foi confirmada através da espectroscopia na região do infravermelho, na qual, os espectros da carboximetilquitosana apresentaram o pico característico do grupo carboxílico.
- A carboximetilquitosana não apresentou toxicidade para *Artemia salina*, os sais apresentaram grau variável de toxicidade, sendo observadas reduções significativas da toxicidade dos sais quando combinados com a carboximetilquitosana.
- A redução do efeito tóxico dos sais metálicos para *Artemia salina*, quando combinado com a carboximetilquitosana sugere a possibilidade de emprego deste biopolímero na redução da toxicidade de compostos com aplicações biológicas.
- A carboximetilquitosana não apresentou atividade antimicrobiana sobre as formas planctônicas dos micro-organismos em nenhuma das concentrações testadas.
- A combinação dos metais com a carboximetilquitosana não potencializou a atividade antimicrobiana quando testados frente às formas planctônicas.
- Entre os metais, o nitrato de prata demonstrou melhor atividade antimicrobiana.
- Os testes de inibição da formação de biofilme comprovaram a eficácia dos compostos isolados e em combinação na redução da biomassa total das células associadas a essa estrutura.
- Os sais foram mais ativos na inibição da formação do biofilme quando comparados com a carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando avaliados pelo método de cristal violeta.
- A carboximetilquitosana combinada com os sais apresentou melhor ação inibitória da formação do biofilme quando comparada a carboximetilquitosana isolada ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), quando avaliada pelo método de cristal violeta.
- O estudo de redução da atividade metabólica das células associadas ao biofilme, por meio da resazurina, demonstrou que os compostos isolados e combinados, provocaram queda no metabolismo das cepas estudadas (excetuando para *B. cepacia* na presença de sulfato de Zinco $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para *E. coli* na presença de sulfato de cobre $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).
- Concentrações subinibitórias da carboximetilquitosana isolada inibiram a atividade metabólica acima de 50% para todas as cepas estudadas crescendo em biofilme.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, F. R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. Tese (Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade de São Paulo, 2006.
- ABREU, F. R.; CAMPANA -FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethyl-chitosan. **Carbohydrate Polymers**, vol.75, p.214-221, 2009.
- ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.15, n.2, p.79-83, 2005.
- ALLISON, D. G. The Biofilm Matrix. Biofouling. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 19, p. 139-150, 2003.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, p.431 – 434, 2011.
- AMINI, S., HOTTES, A.K., SMITH, L.E., TAVAZOIE, S. Fitness Landscape of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **PLoS Pathogens**, v.7, n.10, 2011.
- ANITHA, V. V.; DIVYA, A. R.; KRISHNA, V. S.; SELVAMURUGAN, S. V.; NAIR, H. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v.78, n. 4, p. 672 - 677, 2009.
- ARAÚJO, E.A. & ANDRADE, N.J. Aspectos coloidais da adesão de microorganismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1940 – 1948, 2010.
- ARORA, P. K. E.; JAIN, R. K. Metabolism of 2-Chloro-4-Nitrophenol in a Gram Negative Bacterium, *Burkholderia sp.* RKJ 800. **Published online**, v. 7, n.6, 2012.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.23, p. 27-34, 2007.
- BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469 – 476, 1999.
- BARCAT, J. A. Biofilms. **Medicina**, v. 65, n. 4, p.369 - 372, 2005.
- BATTISTI, M. V.; CAMPANA-FILHO, S. P. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, vol.31 n.8, p. 2014 -2019, 2008.
- BAUMANN, H.; FAUST, V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydrate Research**, v.331, n.1, p. 43-57, 2001.
- BEKHEIT, M.M, NAWAR, N., ADDISON, A.W. ABDEL-LATIF, D.A., MONIER, M. Preparation and characterization of chitosan-grafted-poly(2-amino-4,5-pentamethylene-thiophene-3-carboxylic acid N'-acryloyl-hydrazide) chelating resin for removal of Cu(II),

Co(II) and Ni(II) metal ions from aqueous solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 558-565, 2011.

BEN, H.A.J., KHALIFA, A., MOISSENET, D., VU THIEN H., KHEDHER, M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Ann Biol Clin (Paris)**, v.69, n.4, p.393-403. 2011.

BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.3, p.990-4, 2001.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588–594, 2006

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BÔAS, G. K. V.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n.6, p.1463-1471, 2007.

BRASILEIRO, B. G.; PIZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmêuticas**, v. 42, n.2, p. 195-202, 2006.

BUKZEM, A. L. **Otimização do processo de obtenção de carboximetilquitosana a partir da carboximetilação da quitosana e estudo cinético e termodinâmico de sua interação com íons de cobre (II)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares); Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2013.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.

CAIXETA, D. S.. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAMPANA, S. P.; DESBRIERES, J. Chitin, chitosan and derivatives. in: *Natural Polymers and Agrofibers Composites*, cap. 3, E. Frollini; A. Leão & L. H. C. Mattoso (eds.), EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, São Paulo, 2000.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITTO, D.; CURTLE,.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, L. R. Extração, Estruturas e Propriedades de α - e β -Quitina. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 644 - 650, 2007.

CANTELI, T. R. **Diferentes alternativas no controle de diarreia pos desmame em leitões**. Dissertação (Zootecnia), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade do Minho, Universidade do Minho, 2004.
- CAVALCANTE, M. F. Síntese de 1,3,5 - Triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente *Artemia Salina*. *Química Nova*, v. 23, n.1, 2000.
- CERNOHORSKA, L.; VOTAVA, M. Antibiotic synergy against biofilm forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiologia*, v.53, n.1, p.57 – 60, 2008.
- CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, n.3, p. 250 - 259, 2006.
- CHEN, L., DU, Y., WU, H., XIAO, L. Relationship between molecular structure and moisture-retention ability of carboxymethyl chitin and chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 83, p. 1233–1241, 2002.
- CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture – absorption and moisture- retention abilities of carboxymethyl chitosan : II. Effect of degree of 54 desacetylation and carboxymethylation. *Carbohydrate Research*. v. 338, n. 4, p. 333 - 340, 2003.
- CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355 – 359, 2003.
- CHENG, G.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERS, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4192 - 9, 2007.
- CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Inst.Food. Technol.**, v. 2, p. 22-32, 2003.
- CHU, K. H. Removal of Copper from Aqueous Solution by Chitosan in Prawn Shell: Adsorption Equilibrium and Kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 90, n. 1, p.77-95, 2002.
- CLEMO, B. A nova geração antimicrobiana baseada na nanotecnologia da prata. **Química Têxtil**, n.80, p. 14-18, 2005.
- COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39 n. 10, p. 3427-3436, 2001.
- CONWAY, B. A. D.; VENU, V.; SPEERT, D. P. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.20, p.5678–5685, 2002.
- COOKSON, A. L.; COOLEY, W. A.; WOODWARD, M. J. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 292, p. 195-205, 2002.
- COSTA, F. C.; CAMPOS, J. C.; SANT'ANNA JR, G. L.; DEZOTTI, M. Aplicação de carvão ativado em pó (CAP) ao processo biológico de tratamento de um efluente da indústria química. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 170 - 176, 2003.

- COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customised microniche. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n.8, p. 2137–2142, 1994.
- CUNHA, M. V.; SOUSA, S. A.; LEITÃO, J. H.; MOREIRA, L. M.; VIDEIRA, P. A.; SA-CORREIA, I. Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* Complex in biofilm formation and in persistent of respiratory infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 07, p. 3052-3058, 2004.
- DALES, L.; FERRIS, W.; VANDEMHEEN, K.; ARON, S. D. Combination antibiotic susceptibility of biofilm grown *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.28, n.10, p.1275–1279, 2009.
- DANTAS, T. L. P., JOSÉ, H. J., MOREIRA, R. F. P. M. Fenton and Photo Fenton oxidation of tannery wastewater. **Acta Scientiarum Technology**, v. 25, n. 1, p. 91-95, 2003.
- DASH, M., CHIellini, F., OTTENBRITE, R. M., CHIellini, E. Chitosan - A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. **Journal of Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.6, p.2950-8, 2002.
- DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Minas Gerais. Dissertação (Fisiologia e Farmacologia), Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, 167-193, 2002.
- DÖRING G, CONWAY SP, HEIJERMAN HG, HODSON ME, HOIBY N, SMYTH A. Antibiotic Therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: a European Consensus. **European Respiratory Journal**, v.16, n.4, p.749-67, 2000.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Review Microbs and Infections**, v. 5, n.13, p. 1231-1219, 2003.
- DU, J.; HSIEH, Y. Nanofibrous membranes from aqueous electrospinning of carboxymethyl chitosan. **Nanotechnology**, v. 19, n. 12, 2008.
- DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.
- DURAN, N.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; SOUZA, G. I. H.; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology** 2005, 3:8 doi:10.1186/1477-3155-3-8, 2005.
- DURAN, N.; MARCATO, P. D.; CONTI, R.; ALVES, O. L.; COSTA, F. T. M.; BROCCHI, M. Uso potencial de nanopartículas de prata em bactérias patogênicas, sua toxicidade e possíveis mecanismos de ação. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.6, p. 949-959, 2010.

- DUTTA, P.K. et al. **Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications**. Food Chemistry, v. 114, p. 1173-1182, 2009.
- EFTHIMIADOU, E. K., KARALIOTA, A.; PSOMAS, G. Copper (II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure-activity relationship. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 102, n. 4, p. 910-20, 2008.
- ELDIN, M. S. M.; SOLIMAN, E. A.; HASHEM, A. I.; TAMER, T. M. Antibacterial activity of chitosan chemically modified with new technique. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 22, n. 3, p. 125-137, 2008.
- ETO, F. S.; RASLAN, S. A.; CORTELLI, J. R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista biociências**, v. 9, n. 2, p.45-51, 2003.
- FAIZ, U.; BUTT, T.; SATTI, L.; HUSSAIN, W.; HANIF. Efficacy of zinc as an antibacterial agent against enteric bacterial pathogens. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, v. 23, n.2, p. 18-21, 2011.
- FARAG, R. K.; MOHAMED, R. R. Synthesis and characterization of carboxymethyl chitosan nanogels for swelling studies and antimicrobial activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 190–203, 2012.
- FAÚNDEZ, G.; TRONCOSO, M.; NAVARRETE, P.; FIGUEROSA, G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **BMC Microbiology**, v. 4, n.19, 2004.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **U.S. Food and Drug Administration**. Bacteriological analytical manual, 2011.
- FENG, Q. I.; WU, J.; CHEN, G.Q.; KIM, T. N.A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 52, n. 4, p. 662-8, 2002.
- FRANCO, M. R. G. **Detecção de Metallo-beta-lactamases em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecções sistêmicas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo. São Paulo, SP. 2009.
- FRANCO, R. M.; ***Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana**. Tese (Doutorado em Higiene veterinária), Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2002.
- 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. 2, p. 146-55, 2001.
- GE, H. C.; LUO, D. K., Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v.340, p. 1351-1356, 2005.
- GEWIRTZ, A. T., NAVAS, T. A., LYONS, S. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **The Journal of Immunology**, v.167, n. 4, p.1882-5, 2001.
- GIL D. DE M., M. Bacteremia de curso fatal por *Burkholderia cepacia*: revisão de la literatura a propósito de un caso clínico. **Revista Chilena de Infectología**, v.18, n.1, p.41-44, 2001.
- GOMES, L. A. O Cultivo de crustáceos e moluscos . São Paulo: Nobel, 1986. 226 p.

- GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A. Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antimicrobianos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GURGEL, T. C.; CARVALHO, W. S. A. Assistência Farmacêutica e o Aumento da Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos. **Latina Americana Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.118-23, 2008.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.
- HÉQUET, A.; HUMBLLOT, V.; BERJEAUD, J. M.; PRADIER, C. M. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 301-309, 2011.
- HOUDT, R. V.; MICHIELS, C. R. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res. Microbiol.**, v.156, p.626-633, 2005
- HOYLE, B. COSTERTON, J. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Progress in Drug Research**, 37: 91–105, 1991.
- HUSAIN, S.; SINGH, N. *Burkholderia cepacia* infection and lung transplantation. Seminars in Respiratory Infections. **Pittsburgh**, v. 17, n. 4, p. 284-290, 2002.
- ISLAM, M.; MASUM, S. M. D.; MAHBUB, K. R. In vitro antibacterial activity of shrimp chitosan against *Salmonella paratyphi* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bangladesh Chemical Society**, v.24, n.2, p.185-190, 2011.
- JACOBY, T. S. **Associação entre consumo de antimicrobianos e multirresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de Hospital Universitário Brasileiro, 2004-2006**. Dissertação (Ciências Médicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n.1, p. 88-92, 2009.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.163-173, 2004.
- JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in microbiology, Great Britain: Elsevier Science**, v. 9, n. 1, p. 9-10, 2001.
- JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H. ; PARK, Y. H.; Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.4, n.7, p. 2171-8, 2008.
- JYOT, J., BALLOY, V., JOUVION, G., VERMA, A., TOUQUI, L., HUERRE, M., CHIGNARD, M., RAMPHAL, R. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n.10, p.1369-77, 2011.
- KAPER J. B, SPERANDIO V. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v. 73, n. 6, p. 3197-209, 2005.

- KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n.1, p. 95-101, 2007;
- KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v.36, n.2, p.78-91, 2006.
- KORA, A. J.; ARUNACHALAM, J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p.1209–1216, 2011.
- KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, n.1, p. 268-274, 2000.
- KUHN, D. M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 878-888, 2002.
- KUHNERT, P. BOERLIN, P. FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.107-117, 2000.
- KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*. v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.
- KUMAR, M. N. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, n.1, p.1-27, 2000.
- LARGURA, M. C. T. **Síntese e caracterização da O-carboximetilquitosana-n-lauril e utilização como polímero anfifílica em comprimidos de triancinolona**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.
- LEITÃO, J. H.; SOUZA, S. A.; FERREIRA, A. S.; RAMOS, C. G.; SILVA, I. N.; MOREIRA, L. M. Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n.1, p.31-40, 2010.
- LEITE, A. M. O; FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 2, p.80-83, 2006.
- LEITE, F.; MODESTO, C. M. D.; NASCIMENTO, R. F.; DIAS, F. S. Adsorção de Cd (II) de soluções aquosas com microesferas de N-carboximetilquitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 6, n. 3, 2005.
- LI L.; REDDING S.; DONGARI-BAGTZOGLU A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. **Journal of Dental Research**, v.86 n.3 p.204-15, 2007.
- LOPES W. A., FACIO M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v.. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-11, 2010.

- LUO, Y., ZHANG, B., CHENG, W.-H., WANG, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Journal of Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 942-951, 2010.
- MACEDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v.2, n.7, p. 19-24, 2000.
- MACEDO, J. A. B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos e Medicamentos**, v.2, n.7, p.19-24, 2000.
- MAGALHÃES, A. F., TOZZI, A. M. G. A., SANTOS, C. C, SERRANO, D. R., ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M., MAGALHÃES E. G., MAGALHÃES L. A. Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 713-718, 2007.
- MAH, T. H. C.; O' TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, v.9, n.1, p.34-38, 2001.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A. VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p.533-8, 2002.
- MARQUES, C. S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.
- MARTINEZ, L. R.; MIHU, M. R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R. J. B.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A. J.; FRIEDMAN, J. M.; NOSANCHUK, J. D. The use chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v.31, n.4, p.669-679, 2010.
- MARTINS, P. **Avaliação da atividade antimicrobiana, mutagênica e toxicidade aguda de derivados anfifílicos da *O*-carboximetilquitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, 2010.
- MASSON, M.; HOLAPPA, J.; HJALMARSÓTTIR, M.; RUNARSSON, O. V.; NEVALAINEN, T.; JARVINEN, T. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 566-571, 2008.
- MAULE, A. KEEVIL, C. W. Long survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 on stainless steel work surfaces and inhibition on Copper and Brass, ASM-P-119. **American Society For Microbiology**, p. 101-581, 2000.
- MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- MCLAUGHLIN, J. L., CHANG C. J., SMITH D. L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman A (ed.) *Studies in Natural Product Chemistry* 9. Amsterdam: Elsevier, p. 383-409, 1991.
- MCLAUGHLIN, J. L., CHANG, C. J, SMITH, D. L. Simple bench-top bioassays (BS & PD) for discovery of plant antitumor compounds-review of recent progress in human medicinal agents from plants. Nova York: Kinghorn & Balandrini, p. 112-137, 1993.
- MELCHIOR MB, VAARKAMP H, FINK-GREMMELS J 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, n.3, 398-407, 2006.

MELLO, K.G.P.C.de. Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana. Tese (Tecnologia Bioquímico-farmacêutica) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MELO, K. G. P. C. **Imobilização de pepsin em membranas liofilizadas de quitosana e O-Carboximetilquitosana.** Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

MENG, X.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; LI, K.; QIN, Y.; LI, P. Molecular weight and pH effects of aminoethyl modified chitosan on antibacterial activity in vitro. **International Journal of Biologian Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 918 - 24, 2012.

MENOITA, E.; SANTOS, V.; TESTAS, C.; GOMES, C.; SANTOS, A. Biofilms: Knowing the Entity. *Journal of Aging & Inovation*, v. 1, n. 2, p. 23-32, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**. v. 45, p. 31-34, 1998.

MICHELS, H. T.; WILKS, S. A.; MICHELS, J. Antimicrobial Properties of Copper Alloy Surfaces, with a Focus on Hospital-Acquired Infections. **Advanced Materials e Processes Web Exclusive**, 2008. Disponível em: http://www.tistrip.be/websites/uploadfolder/75/cms/images/effet_ab_sur_bact_hospi.pdf. Acesso em: 02-12-2014.

MICHELS, H. T.; WILKS, S. A. ; NOYCE, J. O.; KEEVIL, C. W. Copper Alloys for Human Infectious Disease Control. **In:** Presented at Materials Science and Technology Conference. Copper for the 21st Century Symposium, 2005.

MIGLIORE, L. et al. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Water Research**, v. 31, p. 1801-1806, 1997.

MILAN, A. Estudo epidemiológico-molecular e da resistência ao imipenem, ocasionada pela perda de canais de porina, em *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes hospitalizados. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, SP, 2007.

MILIOLI, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em pó dopada com prata.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

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

MOREIRA, C. G.; CARNEIRO, S. M.; NATARO, J. P.; TRABULSI, L. R.; Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n.1, p. 79-85, 2003.

MORONES-RAMIREZ, J. R.; WINKLER, J. A.; SPINA, C. S.; COLLINS, J. J. Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 190, p. 1-11, 2013.

MOURA, C. M. **Avaliação da reação de desacetilação da quitina e estudo da secagem de pellets de quitosana para aplicação em filmespoliméricos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS, 2008.

- MOURYAA, V. K.; INAMDARA, N. N.; TIWARIB, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v.1, n.1, p. 11-33, 2010.
- MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathog**, v.4, p.100- 113, 2008.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. J., Jorgensen J H, et al. Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, v. 1, p. 719 –725. 2003.
- MURRAY, T. S. AND BARBARA, I. K. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **Journal of Bacteriology**, v.188, p. 370–377, 2008.
- MUZZARELLI, R. A. A. ACKNOWLEDGEMENTS, In Chitin. **Pergamon Press**, 1977, p. 15, 1977.
- MUZZARELLI, R. A. A., RAMOS, V., STANIC, V., DUBINI, B., MATTIOLI-BELMONTE, M., TOSI, G., GIARDINO, R. Osteogenesis promoted by calcium phosphate N,N-dicarboxymethyl chitosan. **Journal of Carbohydrate Polymers**, v. 36, p. 267-276, 1998.
- NASSER, R. M.; RAHI, A. C.; HADDAD, M. F.; DAOUD, Z.; IRANI-HAKIME, N.; ALMAWI, W. Y. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia traced to contaminated hospital water used for dilution of an alcohol skin antiseptic. **Infectious Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n. 3, p. 231-239, 2004.
- NAVES, P. L. F. Formação de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación com factores de virulência: Prevenção y actividad de antimicrobianos frente a organismos. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2009.
- NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J. DAHBI, G. BLANCO, M.; PONTE MDEL, C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb.Pathogen**, v.45, p.88-91, 2008.
- NETO, R.S.; PAVONE, C.; FREITAS, R. M.e; MARCANTONIO, R. A. C.; JÚNIOR, E. M. NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina L.* (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, 14 (2): 358-361, 2012.
- NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.
- NOUÉR S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.** Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias), Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- O,BRIEN, J.; WILSON, L.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resasurin) fuorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000
- O'TOOLE G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n.2, p. 295-304, 1988.

OLADIPO, I. C.; ADEOYE, I. O.; ADEYEMO, A. A. Antimicrobial activity some transition metal picolines. **American journal of food and nutrition**, v.3, n.2, p.53-57, 2013.

OLIVEIRA, K. R. Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle. Monografia (Análise Clínica e Gestão de Laboratório), Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2011.

ORNDORFF, P. E.; DEVAPALI, A.; PALESTRANT, S.; WYSE, A.; EVERETT, M. L.; BOLLINGER, R. R.; PARKER, W. Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. **Infection and Immunity**, v.72, n.4, p.1929-38, 2004.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F.; Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PARIZZI, S. Q. F., et Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.47, n.1, p. 77- 83, 2004.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J. DE; SILVA, C. A. DE S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. DA. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brasilian Archives of Biology and technology**, v. 47, n. 1, p.77-83, 2004.

PETERS, G.; PULVERER, G. Pathogenesis and management of *Staphylococcus epidermidis* 'plastic' foreign body infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy: Oxford Journals**, v.14, n.1, p.67-71, 1984.

PINTO, F. A.; DIAS, C. R.; RAMOS, M.; ELLIOT, S. L. Interações simbióticas entre *Escherichia coli* e seres humanos: a instabilidade de uma relação. **Revista HCPA**, v. 31, n.4, p. 451-455, 2011.

PITTS, B.; HAMILTON, M. A.; ZELVER, N.; STEWART, P. S. A microtiter plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, n. 2, p.269-276, 2003.

PEPEL, M. L.; BUSSEN, M.; FEIGE, M. A.; SHADIX, L.; GONDER, S.; RODGERS, C.; CHAMBERS, Y.; PULZ, J. MILLER, K. CONNELL, K.; STANDRIDGE, J. Assessment of the Effects of Holding Time and Temperature on *Escherichia coli* Densities in Surface Water Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.10, p. 6201–6207, 2003.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**, v. 85, n. 9, p. 1299-1307, 2003.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p.285-93, 1998.

PRIGENT-COMBARET, C.; PRENSIER, G.; LE THI, T. T.; VIDAL, O.; LEJEUNE, P.; DOREL, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environmental Microbiology**, v.2, n.4, p. 450-64, 2000.

PRUSS, B. M.; BESEMANN, C.; DENTON, A.; WOLFE, A. J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.11, p.3731-9, 2006.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, **Carbohydrate research**, v. 339, n.16, p. 2693-2700, 2004.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSEN, W. J. Bioassay Techniques for Drug Development. **1^a ed. Singapore**: Taylor & Francis e-Library, 2005.

RAI, M.; YADAY, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.2, n.1, p. 76-83, 2009.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPES-RIBOT, J.L. Candida biofilms: An Update. **American Society for Microbiology**, v.4, n.4, p.633-638, 2005.

RAMESH, H.; VISWANATHA, S.; THARANATHAN, R. N. Safety evaluation of formulations containing carboxymethyl derivatives of starch and chitosan in albino rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 435-441, 2004.

RAVI KUMAR, M. N. V.A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

REISNER, A.; HAAGENSEN, J. A.; SCHEMBRI, M.A.; ZECHNER, E. L.; MOLIN, S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 8, n.4, p.933-46, 2003.

REISNER, A.; KROGFELT, K. A.; KLEIN, B. M.; ZECHNER, E. L.; MOLIN, S. In vitro Biofilm Formation of commensal and Pathogenic *Escherichia Coli* strains: impact of environmental and Genetic Factors. **J. Bacteriol**, v. 188, p. 3572-3581, 2006.

ROCHA, D. P.; PINTO, G. F.; RUGGIER, R.; OLIVEIRA, C. A.; GUERRA, W.; FONTES, A. P. S.; TAVARES, T. T.; MARZANO, I. M.; MAIA, E. C. P. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n.1, p.111-118, 2011.

ROMERO-GÓMEZ, M. P.; QUILES-MELERO, M. I.; PEÑA-GARCÍA, P. P.; GUTIÉRREZ- ALTES, A. G.; GARCIA DE MIGUEL, M.A.; JIMÉNEZ, C.; VALDEZATE, S.; SÁEZ NIETO, J. A. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia caused by contaminated chlorhexidine in a hemodialysis unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 4, p. 377-378, 2008.

ROSA, T.R.O. **Síntese de derivados anfífilos da O-carboximetilquitosanae aplicações de solubilidade de fármaco pouco solúvel (triancinolona)**. Dissertação (Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. Dissertação (Ciências Farmacêuticas), UNESP, Araraquara – SP , 2012.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Belo Horizonte, Edição nº 33, 2004.

SANCHEZ, J. S. Resistencia a antimicrobianos. **Revista Latino americana de Microbiologia**, v.48, n.2, p.105-112, 2006.

SANTO, C. E.; QUARANTA, D.; GRASS, G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. **Microbiology Open**, v.1, n.1, p.46-52, 2012.

SANTOS, A. P.; WATANABE, E.; ANDRADE, D. Biofilme em marca-passo artificial: ficção ou realidade? **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v..97 n.5, p. 113 -120, 2011.

- SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. O.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, v. 7, n.9, 2001
- SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes e development**, v.15, n. 12, p.1468-1480, 2001.
- SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, v.41, p.983-97, 2001.
- SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL’AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.41, n.5, p. 983-97, 2001.
- SILVA, A. C. Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.
- SILVA, D. S. **Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana**. Dissertação (Ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- 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. 04, 2006.
- SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; CHINARELLI, S. H. RECHE Manutenção de leveduras por congelamento a – 200C. **RBAC**, v. 40, n. 01, p.73-74, 2008.
- SILVA, R. B. **Biofilmes e lentes de contato**. Dissertação (Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2012.
- SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food. Microbiol.**, v.17, n.4, p.439-447, 2000.
- SONG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, J.; DING, C. Synthesis and Property Studies of N - Carboxymethyl Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 1, p. 3282–3285, 2011.
- SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.; VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia em acuicultura. Project reports, n.10, 312p., 1986.
- SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.
- SPINDLER, K.; SPINDLERBARTH, M. Inhibition of chitinolytic enzymes from *Streptomyces Griseus* (Bacteria), *Artemia-Salina* (Crustacea), and a cell line from *Chironomus Tentans* (Insecta) by Allosamidin and Isoallosamidin. **Pesticide Science**, v. 40, n. 2, p. 113-120, 1994.
- STEINDL, G.; HEUBERGER, S.; SPRINGER, B. Antimicrobial effect of copper on multidrug resistant bacteria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Veterinary Medicine Austria*, v. 99, n.1, p. 38-43, 2012.
- STEPANOVIC, S.; CIRKOVIC, I. RANIN, L.; SVABIC, M. Biofilm Formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v.8, n. 358, p.135-358, 2001.
- STOODLEY, P.; SAUER, K. DAVIES; D. G.; COSTERTON. J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- SUN,L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN,X.; YANG,J. Preparation characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulpcap. **Polymer**, v.47, p.1796-1804, 2006.
- SURMAN, S.; MORTON, G.; KEEVIL, B. Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, v.13, n.1, p.33-38, 1996.
- SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**.147, n.1, 3-9. 2001.
- TAKHISTOV, P., GEORGE, B. Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 259-270, 2004.
- TAN, Y.; HAN, F.; MA, S; YU, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilme. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p.1365–1370, 2011.
- TANA, Y.; HANA F.; MA, S.; YU, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.1365–1370, 2011.
- TANG, H.; ZHANG, P.; KIEFT, T.L.; RYAN, S.J.; BAKER, S.M.; WISMANN, W.P.; ROGELJ, S. Antibacterial action of a novel functionalizes chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.7, p. 2562-2571, 2010.
- TAYLOR, J. B.; HOGUE, L. A.; LIPUMA, J. J.; WALTER, M. J.; BRODY, S. L.; CANNON, C. L.. Entry of Burkholderia organisms into respiratory epithelium: CFTR, microfilament and microtubule dependence. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 9, n. 1, p. 36–43, 2010.
- THOMAS, C. L.; O'ROURKE, P. K.; WAINWRIGHT, C. E. Clinical outcomes of Queensland children with cystic fibrosis: a comparison between tertiary centre and outreach services. **Medical Journal of Australia**, v. 188, p.135 - 139, 2008.
- TOLAIMATEA, A.; DESBRIERESB, J.; RHAZIA, M.; ALAGUIC, A. Contribution to the preparation of chitins and chitosans withcontrolled physico-chemical properties. **Polymer**, v. 44, n. 26, p.7939-7952, 2003.
- TONG, C. **Carboxymethyl chitosan-functionalized magnetic nanoparticles for disruption of biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biomolecular), Universidade Nacional de Cingapura, 2012.
- TRABULSI, L. R.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 ed., São Paulo: Atheneu. 2008, p. 369-381
- TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Journal of Science and Technology**, v.25, n.6, p.807-815, 2003.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- UHLICH, G. A.; COOKE, P. H.; SOLOMON, E. B. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n.4, p.2564-72, 2006.

- UYGUN, A., KIRISTI, M., OKSUZ, L., MANOLACHE, S., ULUSOY, S. RF hydrazine plasma modification of chitosan for antibacterial activity and nanofiber applications. **Journal of Carbohydrate Research**, v. 346, p. 259-265, 2011.
- VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v.56, n.6, p.626-33, 2005.
- VASCONCELOS, U. **Investigação do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias do grupo coliforme**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2005.
- VON SYDOW, A. C. M. D. G.; COOGAN, J. A.; MORENO, A. M.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de fezes de cães errantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.4, p.401-407, 2006.
- WARNES, S. L.; KEEVIL, C.W. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact. **Applied and environmental microbiology**, v.77, n.17, p. 6049–6059, 2011.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p.2675-9, 2000.
- WILKS, S. A.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. W. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n. 3, p. 445–54, 2005.
- WOOD, T. K.; BARRIOS, A. F. G.; HERZBERG, M.; LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, n.2, p.361-367, 2006.
- YU, C.; LIU, Y.-F.; TANG, H.-L.; TAN, H.-M. Study of Carboxymethyl Chitosan based Polyampholyte superabsorbent Polymer (Parte II): Investigating the State of Water in CMCTS. *Iranian Polymer Journal*.vol.19, n.6, p.417-425, 2010.
- YU, W. Carboximethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers**, n 84, p. 1365-1370, 2011.
- ZHAO, L.; ZHU, B.; JIA, Y.; HOU, W.; SU, C. Preparation of biocompatible carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of antibiotic drug. **BioMed Research International**, Int. 2013; 2013: 749240, 2013.
- ZHENG, L. Y.; ZHUN, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**,v. 54, n. 1, p. 527–530, 2003.
- ZHU, L, ELGUINDI, J., RENSING, C.; RAVISHANKA, S. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 303-310, 2012.
- ZHU, A. P.; FANG, N.; PARK, M. B. C.; CHAN, V. Interaction between O-carboxymethylchitosan and dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayer. **Biomaterials**, v.26, n.34, p.6873-6879, 2005.
- ZHU, A.P.; JIN, W.; YUAN, L.; YANG, G.; YU, H.; WU, H. O-carboxymethylchitosan – based novel gatifloxacin delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 693-700, 2007.
- ZOTTOLA, A. E. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for food industry? **Food Technology**, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

ZULPO, D. L.; PERETTI, J.; ONO, L. M.; GARCIA, J. L. Avaliação microbiológica da água consumida nos bebedouros da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 107-110, 2006.