



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS
EXATAS E TECNOLÓGICAS – HENRIQUE
SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS MOLECULARES**



**AÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA ISOLADA E EM
COMBINAÇÃO COM SAIS METÁLICOS CONTRA A FORMAÇÃO
DE BIOFILMES POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS**

Anápolis, Goiás

Maio/2015

DIEGO PEREIRA DA SILVA

**AÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA ISOLADA E EM
COMBINAÇÃO COM SAIS METÁLICOS CONTRA A FORMAÇÃO
DE BIOFILMES POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Moleculares (nível mestrado)
da Universidade Estadual de Goiás como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Co-orientadora: Dra. Roberta Signini

Anápolis, Goiás

Maio/2015

Silva, Diego Pereira.

Ação da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos contra a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas. – 2015.

58 folhas. il figuras.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2015.

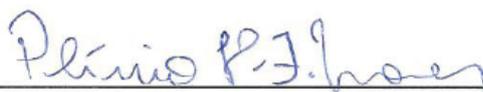
1. Carboximetilquitosana. 2. Biofilme. 3. Sais. I. Título.

ACÇÃO DA CARBOXIMETILQUITOSANA ISOLADA E EM COMBINAÇÃO COM SAIS METÁLICOS CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

DIEGO PEREIRA DA SILVA

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.

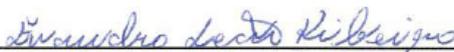
Aprovada em 15/05/2015 por:



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves (UEG)



Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro (UFG)

ANÁPOLIS – GO
MAIO/2015

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus por ter me fortalecido em sua palavra e promessa, que em meio à tristeza, problemas e conflitos sempre me amparou e confortou meu coração para que um trabalho bem feito pudesse ser produzido.

A minha família que sempre incentivou a busca por meus objetivos, que me amparam, me conduzem e me instruem com respeito e paciência para que meus sonhos sejam alcançados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves pela sua conduta extremamente ética e humana, pelos conselhos e incentivos que muito acrescentaram em minha carreira profissional.

À minha Co-orientadora Prof. Dr. Roberta Signini pela paciência, esclarecimentos e ajuda em momentos complicados.

Aos amigos, Brendon José Dutra Belo, Osvaldo Gomes Pinto e Randys Caldeira Gonçalves, muito obrigado pela amizade, pela colaboração e pela companhia de todos vocês, e aos demais que em muitos momentos me ajudaram e me apoiaram.

A CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

E a tantos outros que em meio a tantos momentos felizes ou adversos estiveram ao meu lado, me apoiaram, me incentivaram e fizeram parte desta conquista tão importante.

RESUMO

A carboximetilação é uma modificação que visa ampliar a diversidade de aplicações médicas e farmacêuticas da quitosana pelo fato de aumentar a solubilidade em diversos meios de interesse fisiológico. Além disso a carboximetilquitosana apresenta baixa toxicidade. A prata, o cobre e o zinco na forma de sais têm sido amplamente utilizados como antimicrobianos por apresentarem atividade contra diversas cepas. O presente trabalho pretende demonstrar o efeito da carboximetilquitosana isolada e em combinação com nitrato de prata, sulfato de cobre e sulfato de zinco contra a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas. Com este propósito, foi efetuada a síntese e caracterização da carboximetilquitosana, avaliada a toxicidade do biopolímero isolado e em combinação com os sais dos metais pelo teste de letalidade de *Artemia salina* e demonstrado a atividade antimicrobiana e o potencial dos compostos isolados e em combinação contra a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas. Os resultados demonstraram uma síntese bem sucedida com rendimento de 190%, grau de substituição de 1,87, as substituições dos grupamentos foram comprovadas por espectroscopia na região do infravermelho. Não foi observada toxicidade da carboximetilquitosana para *Artemia salina*, os sais apresentaram toxicidade variável, quando os mesmos foram combinados com a carboximetilquitosana a toxicidade foi diminuída. A atividade antimicrobiana da carboximetilquitosana não foi detectada nas concentrações testadas ($\text{CMI} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), o nitrato de prata isolado e em combinação com a carboximetilquitosana apresentou CMI de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sulfato de cobre e sulfato de zinco tanto isolados como em combinação com a carboximetilquitosana apresentaram $\text{CMI} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerando a formação de biofilme, evidenciou-se a ação inibitória da carboximetilquitosana contra as bactérias Gram-positivas, sendo que em combinação com o nitrato de prata, este fenômeno foi potencializado. Os outros sais metálicos em combinação com o biopolímero não potencializaram de forma significativa a sua atividade inibitória da formação de biofilme, tanto da biomassa total quanto da atividade metabólica das células associadas a esta estrutura. A carboximetilquitosana demonstrou atividade antibiofilme evidenciando sua potencialidade no controle deste importante mecanismo de virulência.

ABSTRACT

The carboxymethylation is a modification which aims to extend the variety of pharmaceutical and medical applications because of chitosan to increase the solubility in various modes of physiological interest. Furthermore, the CMC has low toxicity. Silver, copper and zinc in the form of salts have been widely used as antimicrobial agents due to their activity against different strains. The present study intends to demonstrate the effect of CMC alone and in combination with silver nitrate, copper sulfate and zinc sulfate against biofilm formation by gram-positive bacteria. For this purpose, the synthesis and characterization of CMC was conducted, evaluated the toxicity of biopolymer isolated and in combination with the salts of the metals by the brine shrimp lethality test and demonstrated the antimicrobial activity and the potential of the isolated compounds and in combination against biofilm formation by gram-positive bacteria. The results demonstrate the successful synthesis yield of 190% degree of substitution of 1.87, the groups of substitutions were confirmed by spectroscopy in the infrared region. No toxicity was observed for the CMC *Artemia salina*, salts showed varying toxicity when they were combined with the CMC has decreased toxicity. The antimicrobial activity of CMC was not detected in all tested concentrations ($MIC > 1000\mu\text{g ml}^{-1}$), silver nitrate alone and in combination with CMC showed $1000\mu\text{g ml}^{-1}$ MIC, copper sulfate and zinc sulfate either alone or in combination with the CMC presented $CMI > 1000\mu\text{g ml}^{-1}$. Whereas biofilm formation, evidence of the inhibitory action of CMC against Gram-positive bacteria, and in combination with silver nitrate, this phenomenon was enhanced. Other metal salts in combination with the biopolymer does not significantly potentiated the inhibitory activity of a biofilm formation, both the total biomass as the metabolic activity of the cells associated with this structure. The CMC demonstrated antibiofilm activity showing its potential in the control of this important virulence mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 — Imagem de microscopia de varredura da adesão de <i>Staphylococcus epidermidis</i> a um material sulcado. 3×10^8 ufc mL ⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitro) em condições estáticas.....	15
Figura 02 – Formação de um biofilme bacteriano.....	16
Figura 03 – Imagem de microscopia de varredura de um biofilme formado por <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 04 – Diferentes formas da carboximetilquitosana.....	21
Figura 05 – Esquema da síntese da carboximetilquitosana.....	25
Figura 06 – Esquema do ensaio de formação do biofilme.....	31
Figura 07 – Amostra de carboximetilquitosana durante o processo de secagem.....	33
Figura 08 – (a) Curva potenciométrica da carboximetilquitosana e (b) derivada de primeira ordem da curva.....	34
Figura 09 – Espectro da análise de infravermelho da quitosana.....	35
Figura 10 – Espectro da análise de infravermelho da carboximetilquitosana.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Concentrações dos compostos testados no teste de letalidade de <i>A. salina</i>	28
Tabela 02 – Concentrações subinibitórias dos compostos testados na determinação da atividade inibitória da formação de biofilme.....	32
Tabela 03 – CL ₅₀ dos compostos testados.....	37
Tabela 04 – Concentração mínima inibitória dos compostos.....	38
Tabela 05 – Biomassa total das cepas no biofilme.....	39
Tabela 06 – Metabolismo total das cepas no biofilme.....	40
Tabela 07 – Porcentagem do biofilme formado na presença dos compostos detectado pelo método de determinação da biomassa total com o cristal violeta.....	41
Tabela 08 – Porcentagem do biofilme formado na presença dos compostos detectado pelo método de determinação do metabolismo com o corante vital resazurina.....	43

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Caldo *Brain Heart Infusion*

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

UFC – Unidades formadoras de colônia

CMQ – Carboximetilquitosana

CL₅₀ – Concentração letal a 50%

TSB – Caldo *Tryptic Soy Broth*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Biofilmes.....	15
3.2 Cepas bacterianas.....	17
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18
3.2.3 <i>Kocuria rhizophila</i>	19
3.3 Bioensaio com <i>Artemia Salina</i>	19
3.4 Quitosana.....	20
3.5 Carboximetilquitosana.....	21
3.6 Atividade antimicrobiana de sais metálicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Síntese da carboximetilquitosana.....	25
4.2 Caracterização pelo grau de substituição.....	26
4.3 Caracterização por infravermelho.....	27
4.4 Toxicidade pelo ensaio de letalidade de <i>Artemia salina</i>	27
4.5 Micro-organismos utilizados nos ensaios.....	28
4.6 Conservação e reativação dos micro-organismos utilizados.....	29
4.7 Solubilização dos compostos.....	29
4.8 Determinação da concentração mínima inibitória.....	29
4.9 Avaliação da formação de biofilme pelas cepas estudadas.....	30
4.10 Ação inibitória dos compostos contra a formação de biofilme.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Síntese da carboximetilquitosana.....	33
5.2 Grau de substituição.....	33
5.3 Análise de infravermelho.....	34
5.4 Toxicidade pelo teste de letalidade de <i>A. salina</i>	36

5.5 Concentração mínima inibitória.....	37
5.6 Avaliação da formação de biofilme.....	38
5.7 Impacto da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos.....	41
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O risco de infecções durante o uso prolongado de biomateriais, como cateteres endovenosos, próteses, válvulas cardíacas ou até mesmo lentes de contato oculares é considerado alto. A formação de biofilmes por patógenos sejam eles bactérias ou fungos é o principal fator para a instalação desses micro-organismos na superfície desses biomateriais e ponto de partida para infecções persistentes. O biofilme constitui o estado metabólico sésil dos micro-organismos, que conferindo uma alta resistência aos antimicrobianos e mecanismos do sistema imune (KATSIKOIANNI, MISSIRLIS, 2004).

A formação de biofilmes bacterianos e sua adesão à superfície dos materiais apresentam um papel determinante no aparecimento de doenças infecciosas (CULLER, 2010; MAGALHÃES, 2011). Em um ambiente hospitalar a presença de micro-organismos é fonte de agentes patogênicos devido a presença de indivíduos imunocomprometidos ou que passam por longos períodos de internação (LINDSAY, VON HOLY, 2006). Ponderando-se, ainda, que em biofilmes ocorre uma dificuldade do contato dos fármacos antibacterianos clássicos e agentes de desinfecção com as bactérias presentes (PHILLIPS, *et al.*, 2010).

Inserido neste contexto, a carboximetilquitosana é um derivado hidrofílico da quitosana e um biopolímero que tem despertado interesse pela sua atividade antimicrobiana que pode ser empregada na inibição de biofilmes. O uso da carboximetilquitosana pode ser destacado por fatores como baixa alergenicidade, patogenicidade e não provocar reações tóxicas em contato com a corrente sanguínea (MILIOLI, 2011; NETO, *et al.*, 2008).

De tal modo, o uso de metais tem se mostrado uma alternativa para o controle de micro-organismos patogênicos. Esses metais podem ser usados de forma isolada ou em combinação com fármacos antibacterianos, vários estudos recentes têm comprovado uma maior eficiência dos metais isolados em comparação com a droga livre e alguns comprovam o potencial terapêutico de

complexos com medicamentos antimicrobianos (ROCHA, *et al.*, 2011; WARNES, KEEVIL, 2011).

A possibilidade da utilização da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos na inibição da formação de biofilmes constitui-se num instigante campo de investigação. Tal estudo compreende a avaliação da capacidade de formação de biofilme das cepas estudadas sendo que algumas serão tratadas e outras não tratadas com carboximetilquitosana através da determinação do índice de formação de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno. Espera-se que com o presente estudo seja possível avaliar a inibição parcial ou total da formação de biofilme bacteriano e então prosseguir com a realização de estudos mais específicos possibilitando viabilizar a carboximetilquitosana junto à área farmacêutica e biomédica

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a toxicidade e a ação da carboximetilquitosana isolada e em combinação com nitrato de prata anidro, sulfato de cobre penta-hidratado e sulfato de zinco anidro contra a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas.

2.2 Objetivos específicos

Sintetizar e caracterizar a carboximetilquitosana pelo grau de substituição espectroscopia de infravermelho;

Avaliar toxicidade da carboximetilquitosana, dos sais e das combinações pelo método de letalidade de *A. salina*.

Determinar a concentração mínima inibitória dos compostos contra as bactérias Gram-positivas.

Avaliar a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Kocuria rhizophila*.

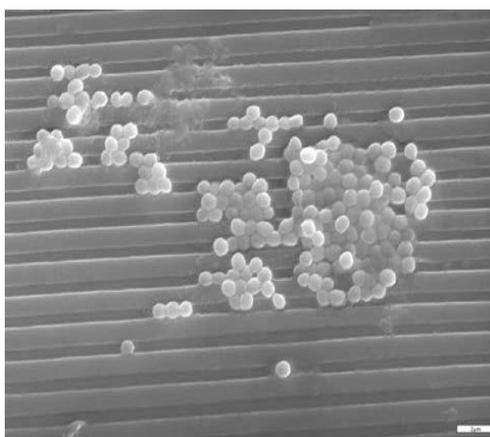
Verificar a ação de concentrações subinibitórias dos compostos contra a formação de biofilmes pelas cepas bacterianas estudadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biofilmes

Os biofilmes se caracterizam por serem formas de vida microbiana que conferem proteção aos micro-organismos presentes devido à presença de uma densa e viscosa matriz polimérica com a presença de polissacarídeos, proteínas e também ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular. Os micro-organismos presentes no biofilme estão firmemente aderidos à determinada superfície em questão que pode ser biótica ou abiótica (Figura 01). Os biofilmes podem ser caracterizados por somente uma espécie de micro-organismos ou polimicrobiano (PHILLIPS, *et al.*, 2010).

Figura 01 – Imagem de microscopia de varredura da adesão de *Staphylococcus epidermidis* a um material sulcado. 3×10^8 ufc mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias por mililitro) em condições estáticas



Fonte: KATSIKOIANNI, MISSIRLIS, 2004

O processo de formação de biofilmes (Figura 02) em determinada superfície é condicionado por alguns fatores como a presença e disponibilidade de nutrientes para o micro-organismo, atrações eletrostáticas e interações físico-químicas entre a parede do micro-organismo e a superfície do material e como se caracteriza a superfície do material. Após a instalação a superfície, inicia-se a colonização através da proliferação dos micro-organismos e a formação da matriz protetora que permite a interação dos micro-organismos presentes, futuramente pode ocorrer à liberação de cepas em condições de alta resistência a antimicrobianos devido a processos de conjugação bacteriana (SARDI, *et al.* 2013).

Outro fator de destaque que impede uma boa interação dos antimicrobianos clássicos com as cepas bacterianas presentes além do polissacarídeo protetor é a sua baixa taxa de metabolismo no ambiente do biofilme, considerando esses micro-organismos como num estado sésil (SILVA, 2012).

Figura 02 – Formação de um biofilme bacteriano



Fonte: KATSIKOIANNI, MISSIRLIS, 2004.

Estudos realizados por Felföldi, *et al.* (2015) sobre micro-organismos no tratamento de águas residuais demonstraram que a maturação do biofilme formado por aeróbios ocorre após 7 dias e com 45 dias é notada a presença de sulfato-redutores e fermentadores.

As infecções hospitalares são consideradas um dos problemas mais sérios no ambiente hospitalar e um dos principais casos de mortalidade, sendo que as causadas por linhagens multirresistentes na corrente sanguínea mais frequentes e essas cepas podem ser oriundas de um biofilme bacteriano. (DIAS, ZUCCOLI, 2012).

Um dos biomateriais mais utilizados no ambiente hospitalar são os cateteres venosos centrais. Esses dispositivos são extremamente importantes em terapias endovenosas para administração de medicamentos, nutrição parenteral e hemodiálise, procedimentos esses realizados na maior parte das vezes no ambiente de unidade de terapia intensiva. Alguns dos principais fatores para a formação de biofilme é a duração do cateterismo, o local onde o mesmo é inserido, o tipo de material de constituição, a repetição do cateterismo, o tipo de curativo usado, a manipulação do cateter e os micro-organismos envolvidos na formação do biofilme (SILVA, 2012).

Atualmente têm se direcionado o uso de biofilmes como reatores para biorremediação, tratamento de esgotos e água contaminada com metais pesados devido à resistência dos micro-organismos presentes, possibilidade de adaptação e por se encontrarem protegidos no interior da matriz polimérica (SILVA, SOUZA, 2014).

Os estudos para controle de biofilme procuram uma forma de interagir com o *Quorum sensing*, que é um sistema de comunicação intercelular que controla a formação do biofilme nos processos infecciosos e patogênicos. A inibição do *Quorum sensing* se constitui um importante alvo farmacológico por não oferecer resistência nos estudos realizados (TA *et al*, 2014).

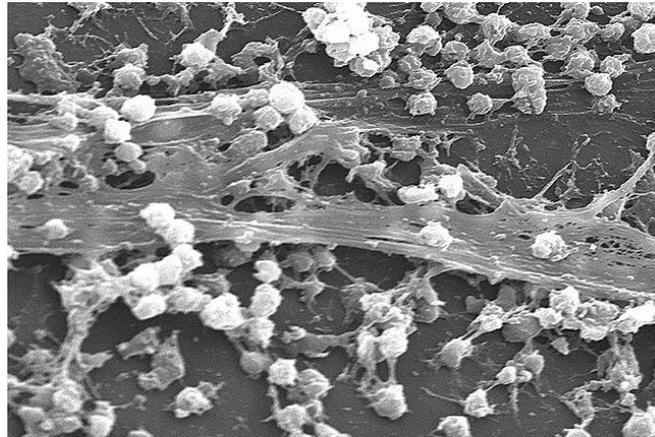
3.2 Cepas bacterianas

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, geralmente associada a infecções de pele, podendo causar severas infecções quando invadem o organismo, sendo um dos maiores causadores de infecções hospitalares, devido multirresistência a diversos tipos de antibióticos (ALMEIDA *et al.*, 2013; KLEVENS, *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus é um organismo muito adaptável e essa cepa bacteriana é capaz de formar biofilmes (Figura 03), que são constituídos por bactérias aderidas a superfícies envolvidas por uma matriz de polimérica, denominada biomassa. As bactérias presentes no biofilme apresentam características de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos, quando comparados com as planctônicas, tornando-as mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro. Outra característica das células no ambiente do biofilme é a sua resistência à ação de agentes físico-químicos empregados nos processos de higienização e assepsia (SANDBERG, *et al.*, 2009; NADER, *et al.*, 2014).

Figura 03 – Imagem de microscopia de varredura de um biofilme formado por *Staphylococcus aureus*



Fonte: Donlan e Carr, 2005

Entre as principais patologias causadas por esse micro-organismo presente na microbiota humana, podemos citar furúnculos, pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia. Essa foi uma das primeiras cepas a ser controlada com o uso de antibacterianos, mas devido a fatores de resistência se tornou uma das cepas que mais causam doenças (SANTOS, *et al.*, 2007).

3.2.2 *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é uma cepa Gram-positiva presente na microbiota natural da pele humana, sendo de grande importância para a homeostase local por mecanismos ainda não totalmente elucidados por completo (GRICE, SEGRE, 2011).

Essa cepa pode ser considerada um patógeno oportunista e geralmente causa doenças em pacientes debilitados, sejam eles recém-nascidos prematuros ou com deformações congênitas no sistema imunológico, infecção por HIV, transplantados, neutropenia durante a quimioterapia, entre outros. Também é um grande causador de infecções hospitalares associadas a cateteres (BUTTNER, MACK, RHODE, 2015).

O *Staphylococcus epidermidis* é uma cepa com alta capacidade de formação de biofilme, mas não é tão associada a infecções uma vez que é considerado apenas um agente infeccioso oportunista, não sendo tão nocivo quanto o *S. aureus* (BUTTNER, MACK, RHODE, 2015).

3.2.3 *Kocuria rhizophila*

A *Kocuria rhizophila*, antes conhecida como *Micrococcus luteus*, é uma cepa Gram-positiva não muito associada a casos de infecções, agem mais como patógenos oportunistas em situações que o organismo hospedeiro está em estado de baixa imunidade, apesar de tudo, poucos casos são relatados. O tratamento geralmente é realizado com base em antibióticos beta-lactâmicos, vancomicina e gentamicina (BECKER, *et al.*, 2008).

3.3 Bioensaio com *Artemia salina*

A. salina é fonte de alimentos para diversos animais de vida marinha, sendo caracterizada por um ciclo de vida curto, facilidade de adaptação a condições adversas, pouca massa corporal e facilidade de reprodução. Devido a essas características é um organismo muito utilizado em testes toxicológicos (GAMBARDELLA, *et al.*, 2014; KOKKALI, KATRAMADOS, NEWMAN, 2011)

O bioensaio de toxicidade aguda de *Artemia salina* constitui-se num teste rápido, prático, de baixo custo e com boa correlação com outros testes. A facilidade do emprego desse teste, o fato de não necessitar de equipamentos complexos, favorece sua utilização rotineira em laboratórios para triagem da atividade de produtos naturais (ARCANJO, *et al.*, 2012; KRISHNARAJU, *et al.*, 2005; LUNA, *et al.*, 2005; MOLINA-SALINA, SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

Aliado à capacidade de gerar informações precisas e de grande utilidade de forma rápida e com reprodutibilidade, este ensaio vem sendo agregado em diferentes áreas tais como, toxicologia ambiental, atividade antimicrobiana e atividade antitumoral de moléculas bioativas. Em conclusão, associa-se o teste a produtos naturais ou sintéticos que apresentem potencial tóxico frente ao microcrustáceo, apresentem potencial para as atividades citadas (ARCANJO, *et*

al., 2012; COSTA, *et al.*, 2003; DANTAS, *et al.*, 2003; GAMBARDELLA, *et al.*, 2014; MAGALHÃES, *et al.*, 2007; SILVA, 2002).

3.4 Quitosana

Alternativas para o controle de micro-organismos patogênicos e o desenvolvimento de drogas modificadas a partir dos compostos de origem natural complementares ao arsenal terapêutico de drogas convencionais, são considerados um dos campos de estudo mais promissores na atualidade (DASH, *et al.*, 2011; BROWN, PALMER, WHITELEY, 2008).

A quitosana é um polissacarídeo, policatiônico natural, atóxico ao meio ambiente, biodegradável e biocompatível. Este polímero é de grande importância econômica e ambiental e têm sido extensivamente estudados em diversas aplicações industriais e tecnológicas, tais como liberação de drogas, purificação de água, processamento de alimentos, quelação de íons metálicos, produtos cosméticos e farmacêuticos, além do potencial antimicrobiano contra diversos micro-organismos (DASH, *et al.*, 2011; LUO, *et al.*, 2010; MU, *et al.*, 2014; UYGUN, *et al.*, 2011).

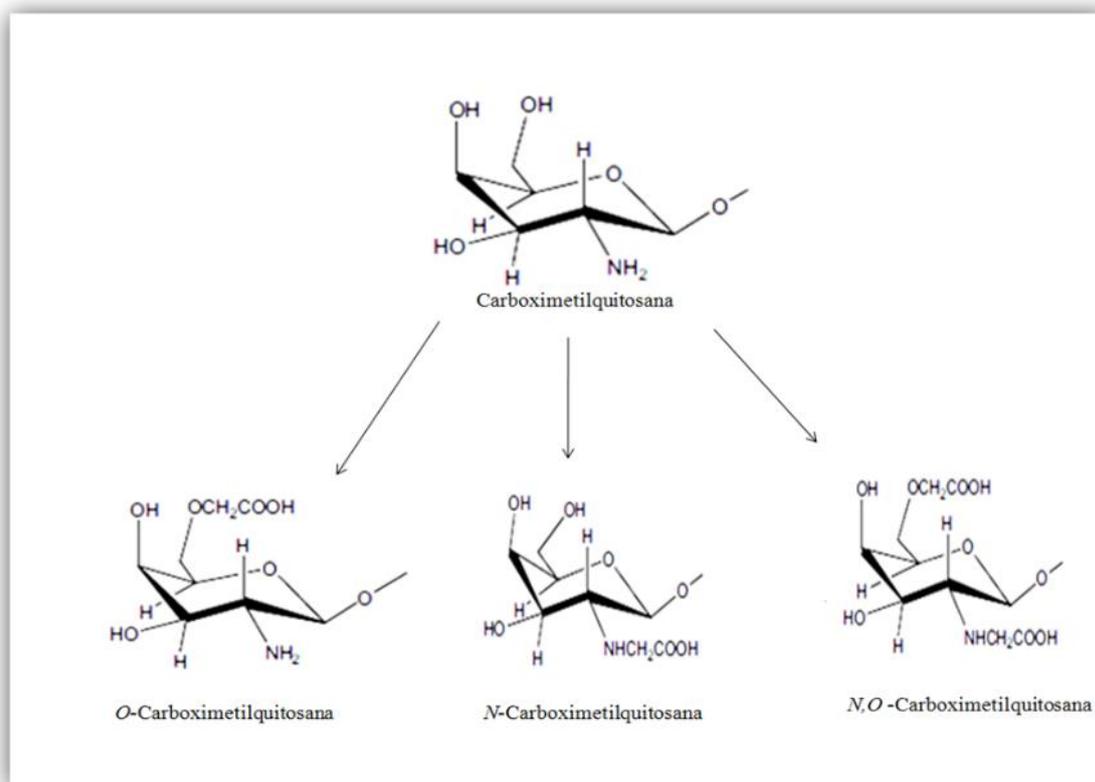
A atividade antimicrobiana da quitosana é suposta por três diferentes mecanismos sendo os quais, (i) os grupamentos aminos livres positivamente carregados podem interagir com as membranas celulares dos micro-organismos que são carregadas negativamente resultando no vazamento dos componentes citoplasmáticos; (ii) outro fator pode ser a ligação da quitosana com o DNA microbiano impedindo a transcrição do DNA em RNA mensageiro interrompendo síntese proteica; (iii) também pode ser citada a formação de uma barreira externa, provocando a supressão da entrada de nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimentos dos micro-organismos (MENG, *et al.*, 2012).

Outros fatores que podem influenciar na sua atividade antibacteriana, podem ser o tipo, grau de polimerização, massa molecular, grau de desacetilação, concentração de quitosana utilizada, dentre outras propriedades físico-químicas da mesma (MENG, *et al.*, 2012; MOURYAA, INAMDARA, TIWARI, 2010).

3.5 Carboximetilquitosana

O uso da quitosana é limitado pela sua solubilidade em meio ácido. Para que o problema de solubilidade seja superado e que com o composto possa ser utilizado na forma solúvel, tanto em meios alcalinos e neutros – que são de grande importância fisiológica – modificações na molécula tais como a carboximetilação (Figura 04) são alternativas interessantes. A carboximetilquitosana constitui-se como opção para aplicações médicas e farmacêuticas ampliando seu potencial de utilização (CAMPANA-FILHO, SIGNINI, CARDOSO, 2007).

Figura 04 – Diferentes formas da carboximetilquitosana



Fonte: BUCKZEM et al., 2013

Segundo Tan *et al* (2011) a carboximetilquitosana tem atividade inibitória comprovada em relação a inibição da formação de biofilmes bacterianos principalmente por bactérias Gram-negativas quando comparada com as Gram-positivas. Este fato deve-se, provavelmente pelas propriedades físico-químicas de parede bacteriana e o impedimento da adesão celular entre as bactérias. Em

testes experimentais com nanopartículas a *N,O*-carboximetilquitosana foi a que apresentou uma melhor característica antibacteriana comparada aos outros derivados da quitosana testados, que foram *O*-carboximetilquitosana e *N*-carboximetilquitosana (ANITHA, *et al.* 2009).

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 (NH_2) protonados (NH_3^+) 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. 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, TIWARI, 2010).

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 $-\text{NH}_2$ também aumente (MOURYA, INAMDAR, TIWARI, 2010).

3.6 Atividade antimicrobiana de sais metálicos

Metais são muito utilizados como antimicrobianos, prata, cobre e zinco são alguns exemplos e possuem atividade antimicrobiana experimentada e comprovada sendo bastante empregados em medicamentos e produtos de higiene (CLEMO, 2005). Existe uma tendência atual para que nanopartículas desses metais citados sejam utilizadas devido a propriedades específicas como tamanho distribuição e estrutura. Apesar de que sais metálicos são muito utilizados em complexos com drogas antimicrobianas (ROCHA *et al.*, 2010).

Segundo Kim *et al.* (2007) a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata contra as bactérias verificou-se 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 observando reduções significativas do crescimento das cepas. A atividade da prata pode ser evidenciada devido sua capacidade de interferir no metabolismo bacteriano, rompendo a parede bacteriana, impedindo assim a replicação e a capacidade de desenvolver resistência. No estado elementar é necessário que haja processos de oxidação para que íons prata sejam liberados e proporcionar à ação desejada, a vantagem da forma elementar é um maior reservatório do metal.

As atividades antimicrobianas do cobre são observadas principalmente em superfícies feitas com este material, tais quais se mostram capazes de inibir ou reduzir o desenvolvimento microbiano e reduzir de maneira significativa a carga microbiana. As superfícies produzidas com cobre podem ser utilizadas para aquelas expostas ao contato humano e nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados em contato com alimentos contribuindo para redução de patógenos (MICHELS, *et al.*, 2005).

Faiz *et al.* (2011) estudou a atividade antimicrobiana do sulfato de zinco. Foi observado que o sulfato de zinco é capaz de inibir o crescimento microbiano de algumas cepas Gram-negativas, em concentrações que variaram de 0,06 mg mL⁻¹ a 0,5 mg mL⁻¹. Outro estudo que avaliou a atividade antimicrobiana do zinco realizado por Oladipo, Adeoye e Adeyemo (2013) apresentou atividade

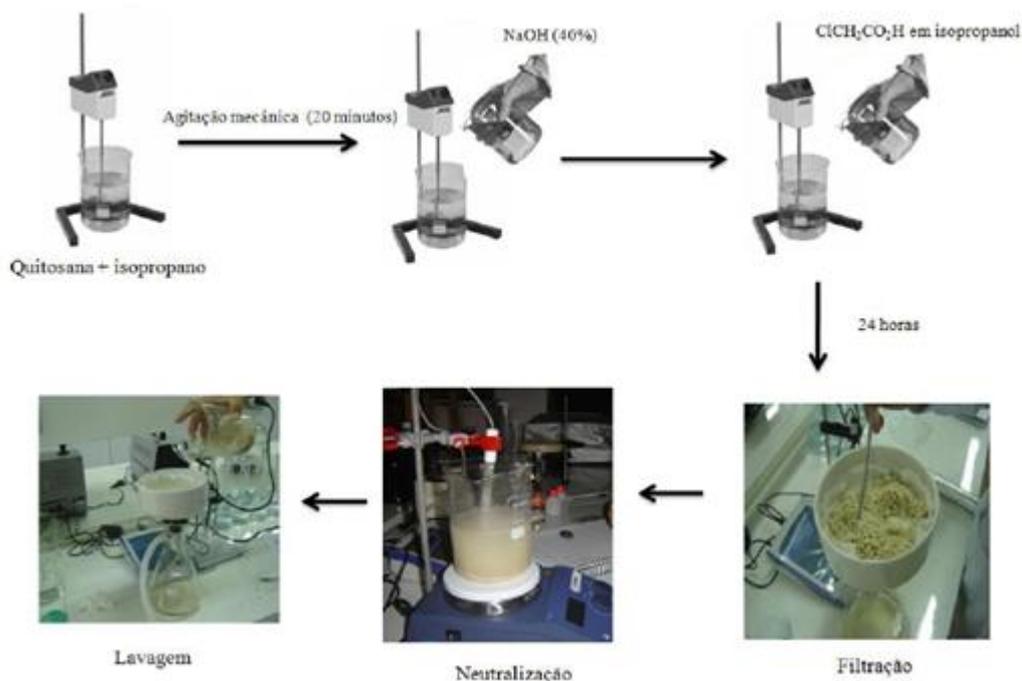
antibacteriana contra diversas cepas incluindo *Staphylococcus aureus* e apresentando CMI de 0,5 mg mL⁻¹.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese da carboximetilquitosana

A síntese da carboximetilquitosana (Figura 05) foi realizada segundo Abreu e Campana Filho (2009). Foram suspensos 6g de quitosana (Sigma-Aldrich, Lote: BCBH3811V, Alemanha) em 130mL de isopropanol. A suspensão foi deixada a temperatura ambiente sob agitação mecânica por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 40,8g da solução aquosa a 40% de NaOH. Após a adição da solução de NaOH, foram adicionados 28,8g da solução de ácido monocloroacético em isopropanol (1:1 m/m), deixando a reação ocorrer a temperatura ambiente por 24 horas. Após a reação, o resíduo sólido foi filtrado e suspenso em 300mL de metanol 80%, sendo em seguida neutralizado com ácido acético glacial. O resíduo sólido foi novamente filtrado e lavado várias vezes com etanol 80% e por fim com etanol absoluto, sendo em seguida seco a temperatura ambiente.

Figura 05 – Esquema da síntese da carboximetilquitosana



Para o cálculo do rendimento considerou-se a razão da massa da carboximetilquitosana pela massa da quitosana e o valor obtido multiplicou-se por cem (equação 01).

$$R = \frac{\text{massa da carboximetilquitosana}}{\text{massa da quitosana}} * 100 \quad (01)$$

4.2 Caracterização pelo grau de substituição

O grau de substituição é um dos procedimentos mais importantes na caracterização da carboximetilquitosana, sendo um dos fatores que comprovam o sucesso da síntese. Segundo Anitha *et al.* (2009) quanto mais alto o grau de substituição da carboximetilquitosana, possivelmente o seu potencial antimicrobiano será maior. O grau de substituição analisa a carboximetilação ocorrida durante a reação de síntese determinando a substituição 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 o biopolímero obtido da quitosana (ABREU, CAMPANA-FILHO, 2005).

A carboximetilquitosana foi caracterizada pelo grau de substituição e análise de infravermelho, esses testes serviram para comprovar as mudanças ocorridas na molécula da quitosana, evidenciando a formação do biopolímero.

O grau de substituição (GS) da carboximetilquitosana foi determinado através do método potenciométrico, sendo que 0,25 g de carboximetilquitosana foram dispersas em 100mL de água deionizada. A solução foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 24 horas, para que fosse obtida uma solubilização completa da carboximetilquitosana. Durante o procedimento o pH foi ajustado por volta 2,2 com o emprego de uma solução de ácido clorídrico. O meio ácido indica que os grupamentos amina ($-\text{NH}_2$) e ácido carboxílico ($-\text{COOH}$) da cadeia polimérica estavam protonados. Após essa etapa foi utilizada uma solução alcalina hidróxido de sódio padronizada ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como titulante, através de um titulador potenciométrico, modelo 877 Titrino Plus da Metroh, a neutralização do ácido clorídrico ocasionou a desprotonação dos grupos funcionais da carboximetilquitosana (ABREU, 2006).

Em seguida o grau de substituição foi calculado a partir da equação 02, proposta por Ge e Lou (2005):

$$GS = \frac{161 * C_{NaOH} * V_{NaOH}}{M_{CMQ} - 58 C_{NaOH} * V_{NaOH}} \quad (02)$$

Considerando essa equação C_{NaOH} corresponde à concentração da solução de hidróxido de sódio empregado na titulação, V_{NaOH} (L) é a quantidade de volume gasto para a desprotonação dos grupos funcionais e M_{CMQ} corresponde a massa da carboximetilquitosana (g). Os valores 161 e 58 satisfazem, respectivamente, a massa molar da glucosamina e do grupo carboximetila responsável pela modificação molecular caracterizando a formação do biopolímero.

4.3 Caracterização por infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um aparelho espectrofotômetro *Perkin-57 Elmer* modelo *Spectrum Frontier FT-IR/NIR* (*Perkin-Elmer Corporation*, EUA). O procedimento se realizou utilizando 1mg de carboximetilquitosana e 100mg de KBr, ambos previamente secos em estufa por 12h a 60 °C e foram preparadas pastilhas das amostras de quitosana e carboximetilquitosana para a análise de infravermelho.

4.4 Toxicidade pelo ensaio de letalidade de *Artemia salina*

O teste foi realizado segundo Molina-Salinas e Said-Fernandez (2006) com adaptações, os compostos isolados e em combinação foram testados no ensaio de letalidade de *A. salina* em microplacas de poliestireno de 96 poços com concentrações de 2400, 1200, 600, 300 e 150µg mL⁻¹ da carboximetilquitosana e de 1000, 500, 250, 125 e 62,5µg mL⁻¹ dos sais metálicos. O impacto do biopolímero na toxicidade dos sais foi avaliado com a combinação de 1000µg mL⁻¹ do com as mesmas concentrações dos sais metálicos isolados (nitrato de prata anidro, sulfato de cobre penta-hidratado e sulfato de zinco anidro). Foram incluídos controles sem os compostos e da técnica com 100, 50, 25, 12,5 e 6,2µg mL⁻¹ de K₂Cr₂O₇ (Tabela 01).

Tabela 01 – Concentrações dos compostos testados no teste de letalidade de *A. salina*.

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carboximetilquitosana	2400, 1200, 600, 300 e 150
Nitrato de Prata	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Sulfato de Cobre	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Sulfato de Zinco	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Nitrato de Prata	1000 + 1000, 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Sulfato de Cobre	1000 + 1000, 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Sulfato de Zinco	1000 + 1000, 500, 250, 125 e 62,5
Dicromato de potássio	100, 50, 25, 12,5 e 6,2

Os cistos de *A. salina* foram alocados em água marinha artificial com pH 8,5 e suplementada com extrato de levedura para suprimento das larvas. Após 36 horas as larvas foram pescadas e nutridas com meio fresco para que entrassem em contato com os compostos que foram testados (figura 07), 24 horas depois foi feita a contagem das larvas mortas.

Os resultados permitiram o cálculo da CL_{50} (concentração letal 50%) pelo método Probit, no programa *Statplus 2009 professional (AnalystSoft)*. 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 e o impacto dos compostos em suas toxicidades.

4.5 Micro-organismos utilizados nos ensaios

Nos ensaios para a atividade antimicrobiana foram utilizados os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

4.6 Conservação e reativação dos micro-organismos utilizados

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008) com adaptações. O repique foi realizado pela técnica de esgotamento por estrias, com a finalidade de colônias isoladas serem obtidas. As cepas foram repicadas em meio sólido ágar *Mueller Hinton*, e as placas foram incubadas a 35,5°C por 24 horas. Logo em seguida, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL de BHI + 20% de glicerol, seguidas de homogeneização em um agitador de tubos, após este procedimento os tubos foram incubados por 12 horas a 35,5°C. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 1 mL para microtubos do 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 de esgotamento em estrias. As placas foram semeadas com auxílio de alças de platina e em seguida foram incubadas a 35,5°C por 24 horas.

4.7 Solubilização dos compostos

Os compostos foram dissolvidos e solubilizados em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) nas seguintes concentrações finais: Carboximetilquitosana de 1000, 500, 250, 125 a 62,5µg mL⁻¹. O nitrato de prata anidro, sulfato de cobre pentahidratado e sulfato de zinco anidro nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 a 62,5µg mL⁻¹. A concentração da carboximetilquitosana foi fixada em 1000µg mL⁻¹ nos ensaios com a combinação do biopolímero com as mesmas concentrações dos sais metálicos.

4.8 Determinação da concentração mínima inibitória

Os ensaios se deram segundo protocolos de microdiluição em caldo padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI M7-A6, 2008) com adaptações e foram utilizados para determinação da concentração mínima inibitória dos compostos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228 e *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, respectivamente.

As suspensões de células bacterianas foram preparadas a partir de culturas recentes em ágar *Mueller Hinton*, sendo repicadas em alíquotas de solução fisiológica 5µL e ajustadas 1×10^7 UFC mL⁻¹, em seguida foram transferidos para os poços da microplaca de poliestireno contendo os compostos nas concentrações testadas dissolvidos em caldo TSB. Após incubação das placas a 35°C a 24 horas a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano foi determinada de forma visual, observando-se a turvação do meio de cultura.

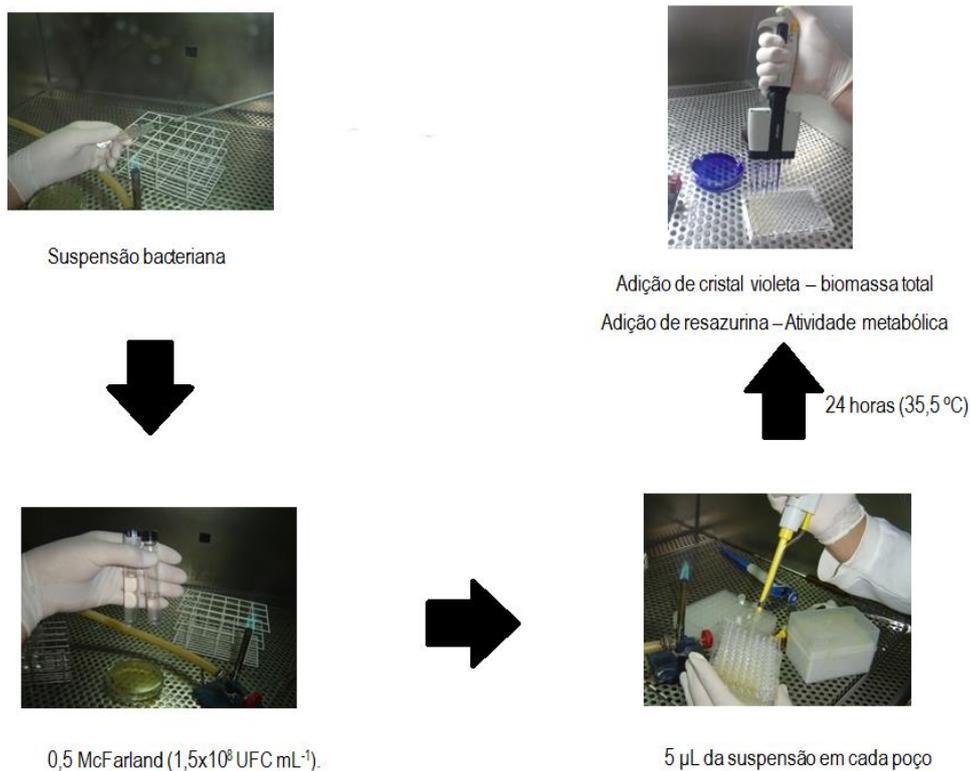
A técnica foi validada segundo Pantanella *et al.* (2013), com a utilização de ampicilina como controle de técnica com as concentrações variando de 8, 4, 2, 1 e 0,5µg mL⁻¹ contra a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

4.9 Avaliação da formação de biofilme pelas cepas estudadas

Nos ensaios de avaliação na formação de biofilme (Figura 06), as microplacas foram incubadas a 35,5°C por 24 horas e após este período procedeu-se a leitura visual da turvação. Após a leitura visual, as placas foram processadas pelas técnicas do cristal violeta para os ensaios de biomassa total e da resazurina para os estudos da atividade metabólica.

Na técnica do cristal violeta, as placas foram tratadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.* (2008), com a remoção do caldo crescido com as formas planctônicas e posterior coloração das amostras com cristal violeta a 1%, o corante foi desprezado e as placas lavadas com água destilada. Após esse período as densidades ópticas (DO) foram lidas a 492nm dos poços com bactérias aderidas (BA) e os poços controle não inoculados (PC).

Figura 06 – Esquema do ensaio de formação do biofilme



Na detecção da atividade metabólica das células associadas aos biofilmes, as placas foram incubadas da mesma maneira que para a detecção da biomassa, com 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 resultados das leituras permitiram o cálculo das médias e o desvio padrão, permitindo que as cepas fossem agrupadas em quartis classificando as cepas quanto a formação de biofilme como fortes, moderadas, débeis e não formadoras.

4.10 Ação inibitória dos compostos contra a formação de biofilme

A atividade inibitória da formação de biofilme por concentrações subinibitórias dos compostos isolados e em combinação foi verificada seguindo as metodologias descritas nos ensaios de formação de biofilme, tendo como referência a CMI dos compostos definida previamente (Tabela 02).

O teste t de Student pareado foi empregado para verificar a significância das diferenças entre a atividade inibitória dos sais em combinação com a carboximetilquitosana e isolados.

Tabela 02 – Concentrações subinibitórias dos compostos testados na determinação da atividade inibitória da formação de biofilme.

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Carboximetilquitosana	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Nitrato de Prata	500, 250, 125 e 62,5
Sulfato de Cobre	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Sulfato de Zinco	1000, 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Nitrato de Prata	1000 + 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Sulfato de Cobre	1000 + 1000, 500, 250, 125 e 62,5
Carboximetilquitosana + Sulfato de Zinco	1000 + 1000, 500, 250, 125 e 62,5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese da carboximetilquitosana

O rendimento da reação de carboximetilação da quitosana foi de 190% calculado pela equação 01. O rendimento superior a 100% foi devido a substituição do hidrogênio dos grupamentos hidroxilas ($-OH$) presentes na cadeia de quitosana pelos grupamentos CH_2COOH carboximetila para a formação da carboximetilquitosana. Assim, a tendência é que o produto carboximetilado apresente uma massa superior a quitosana. Esse rendimento superior sugere que a reação de carboximetilação ocorreu. A Figura 07 apresenta uma foto da amostra de carboximetilquitosana.

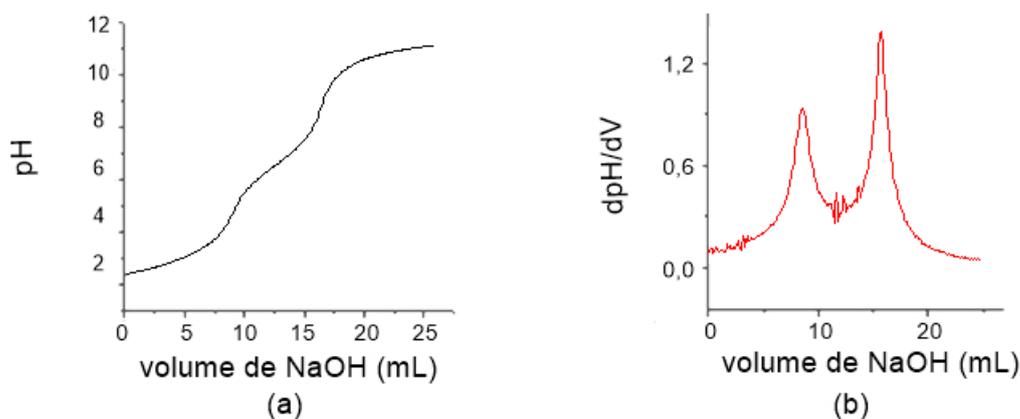
Figura 07 – Amostra de carboximetilquitosana durante o processo de secagem



5.2 Grau de substituição

A partir dos resultados obtidos na titulação potenciométrica da amostra de carboximetilquitosana com hidróxido de sódio e conforme a equação 01 foi calculado o grau de substituição (GS). A curva potenciométrica da titulação está mostrada na Figura 09. A partir da figura 09 observa-se duas reações de equilíbrio. A primeira inflexão é representada no primeiro ponto da curva, sendo que ela refere-se ao consumo de NaOH necessário para a desprotonação do grupo funcional ácido carboxílico ($-COOH$). Isto ocorre devido ao grupamento apresentar um menor valor de pKa e por ser mais ácido. A outra inflexão representa o segundo ponto de inflexão da curva correspondendo a desprotonação do grupamento amino.

Figura 08 – (a) Curva potenciométrica da carboximetilquitosana e (b) derivada de primeira ordem da curva.



Neste estudo o grau de substituição foi de 1,87. Ge e Luo (2005) que sintetizou a carboximetilquitosana com ácido cloroacético, 10mL de NaOH aquoso e utilizou acetona para precipitar o biopolímero conseguiu valores de grau de substituição de 0,258 e 0,89, Chen e Park (2003) sintetizaram o biopolímero utilizando 13,5g de NaOH, e variaram a proporção de água para isopropanol, a temperatura durante a síntese e o tempo de reação foi de 4h conseguiram valores entre 0,2 a 1,0 de grau de substituição, Silva (2014) que utilizou condições de síntese semelhantes ao do presente estudo, mas variando o tempo de reação conseguiu valores de grau de substituição de 0,37 a 1,69.

Silva (2011) expõe que o grau de substituição é influenciado para um valor maior pela concentração de NaOH e por um menor tempo de reação, o que discrepa do presente estudo que com um tempo de 24h conseguiu um alto valor de grau de substituição. Martins (2010) afirma que mesmo com a busca de condições reacionárias semelhantes no processo de obtenção da carboximetilquitosana, existe uma dificuldade de padronização nesse processo, levando a valores diferentes do grau de substituição.

5.3 Análise de infravermelho

A partir dos espectros de infravermelho da quitosana (Figura 09) e da carboximetilquitosana (Figura 10), é possível notar as modificações químicas da quitosana após a reação de carboximetilação. Observa-se que, no espectro da

amostra de quitosana, há bandas nos picos de cerca de 3400 cm^{-1} , característica de estiramento axial de O-H e N-H; 2912 cm^{-1} , de estiramento de C-H; em 1623 cm^{-1} , pico característico da banda de estiramento de C=O (banda de amida I). Após o processo de carboximetilação da quitosana (Figura 09) observa o aparecimento de uma banda intensa em torno de 1610 cm^{-1} e de uma banda menos intensa em torno de 1420 cm^{-1} as quais são atribuídas as deformações simétricas e assimétricas de COO^- , respectivamente.

Figura 09 – Espectro da análise de infravermelho da quitosana

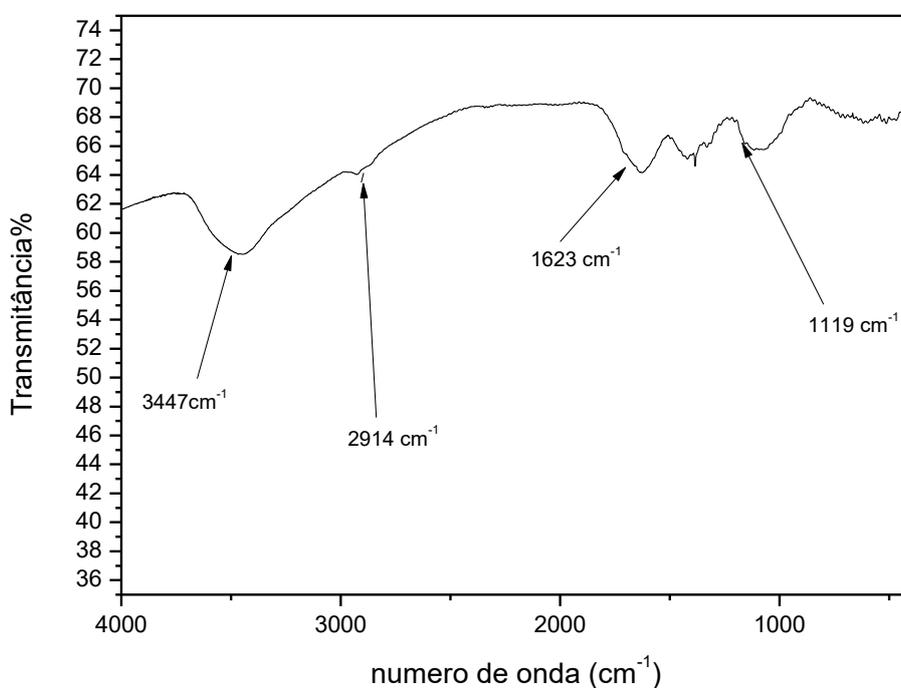
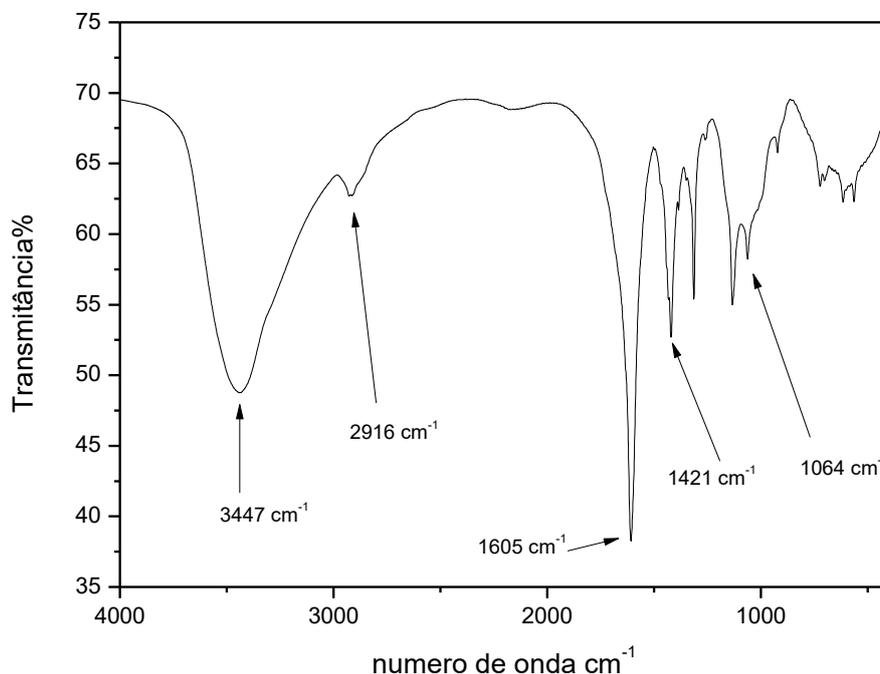


Figura 10 – Espectro da análise de infravermelho da carboximetilquitosana



5.4 Toxicidade pelo teste de letalidade de *A. salina*

A carboximetilquitosana não apresentou concentração letal a 50% (CL_{50}) nas concentrações testadas. As CL_{50} dos sais isolados foram de $424,64\mu\text{g mL}^{-1}$ para o nitrato de prata, $260,87\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sulfato de cobre e $311,55\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sulfato de zinco. Quando testados em combinação com a carboximetilquitosana os valores foram de $1108,81\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sulfato de zinco, $520,30\mu\text{g mL}^{-1}$ para o sulfato de cobre e $654,24\mu\text{g mL}^{-1}$ para o nitrato de prata.

Foram observadas reduções significativas ($p < 0,0001$) da toxicidade dos sais combinados com carboximetilquitosana em relação aos sais isolados (Tabela 03), o que pode indicar um possível efeito protetor da carboximetilquitosana para *A. salina*. Segundo Yin *et al.*, (2007) o biopolímero em questão aumenta a viscosidade de meios aquosos impedindo uma melhor

interação dos sais com as larvas, outro fato, esse citado por Leite *et al.*, (2005) considera a capacidade da quelação de metais pela carboximetilquitosana, uma vez que os sais metálicos apresentados no estudo se dissociam no meio liberando íons e estes podem ser capturados pela carboximetilquitosana.

Tabela 03 – CL₅₀ dos compostos testados

Compostos	CL₅₀ (µg mL⁻¹)
Carboximetilquitosana	>2400
Nitrato de prata	424,64
Sulfato de cobre	260,87
Sulfato de zinco	311,55
Carboximetilquitosana + Nitrato de prata	654,24
Carboximetilquitosana + Sulfato de cobre	520,30
Carboximetilquitosana + Sulfato de zinco	1108,81

O controle de viabilidade do crescimento apresentou 100% de sobrevivência das larvas de *A. salina* e o controle da técnica no qual foi utilizado o dicromato de potássio a CL₅₀ foi de 11,49µg mL⁻¹ valor que se apresenta dentro dos padrões citados na literatura que comprovam um ensaio bem sucedido (MOLINAS-SALINAS, SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

5.5 Concentração mínima inibitória

Nos ensaios de atividade antimicrobiana a CMI (Tabela 04) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visual das cepas estudadas nos poços da microplaca.

A carboximetilquitosana isolada não apresentou CMI. Dos compostos testados apenas o nitrato de prata e a combinação do nitrato de prata com a carboximetilquitosana apresentaram CMI na concentração de 1000µg mL⁻¹, para todos os outros compostos a CMI foi definida como >1000µg mL⁻¹. Estudos de Martins (2010) relatam a CMI para o biopolímero valores que variaram de 300 a 2000µg mL⁻¹ contra a cepa *S. aureus*. Essa variação pode ser explicada pelo tipo de carboximetilquitosana obtida após a síntese (O-carboximetilquitosana, N-

carboximetilquitosana ou *N,O*-carboximetilquitosana), considerando que no presente trabalho só foi testada CMI até 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 04 – Concentração mínima inibitória dos compostos

Compostos	Micro-organismos utilizados e valor de CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>K. rhizophila</i> ATCC
	ATCC 6538	ATCC 1228	9341
Carboximetilquitosana	>1000	>1000	>1000
Nitrato de prata	1000	1000	1000
Sulfato de cobre	>1000	>1000	>1000
Sulfato de zinco	>1000	>1000	>1000
Carboximetilquitosana	1000	1000	1000
+ nitrato de prata			
Carboximetilquitosana	>1000	>1000	>1000
+ sulfato de cobre			
Carboximetilquitosana	>1000	>1000	>1000
+ sulfato de zinco			

Estudos com nanopartículas de prata contra *S. aureus* ATCC6538 realizados por Li et al., (2010) definiram a CMI no valor de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As nanopartículas determinam uma melhor interação dos compostos testados com os micro-organismos, uma vez que apresentam uma maior área superficial de contato (QUINA, 2004). Uma ressalva seria o fato de muitas patologias serem tratadas com antimicrobianos à base de prata e a susceptibilidade dos mesmos ao composto se deve a fatores ainda não totalmente compreendidos. Algumas teorias citam o bloqueio de algumas enzimas essenciais, da divisão celular ou aumento da permeabilidade celular (MORONES-RAMIREZ, et al., 2013).

No presente ensaio, os sais de cobre e zinco utilizados não apresentaram CMI, apesar de possuírem atividade antimicrobiana comprovada e que existe atualmente uma tendência para o estudo de suas propriedades antimicrobianas (OLADIPO, ADEOYE, ADEYEMO, 2013).

5.6 Avaliação da formação de biofilme

As cepas *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 1228, apresentaram comportamentos semelhantes considerando a biomassa total e o metabolismo de ambos micro-organismos no ambiente do biofilme. Ambos micro-organismos variaram os valores separados em quartis do moderado ao forte considerando as duas técnicas de estudo empregadas (Tabela 05 e Tabela 06). A cepa *K. rhizophila* ATCC 9341 não apresentou valores tão significativos quanto a formação de biofilme em ambas as técnicas.

Tabela 05 – Biomassa total dos biofilmes bacterianos

Biomassa total (BA-PC)	
Categoria	Cepa(MED±SD)
Forte ($\geq 0,257$)	Sa6538 (0,261 \pm 0,002)
Moderado (0,244 – 0,256)	Se1228 (0,247 \pm 0,004)
Débil (0,143 – 0,243)	Kr9341 (0,149 \pm 0,001)
Não Formador ($\leq 0,142$)	-

Legenda:

Sa6538: *Staphylococcus aureus* ATCC
6538

Se1228: *Staphylococcus epidermidis* ATCC
1228

Kr9341: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

BA: Bactérias aderidas aos poços

PC: Poços controle não inoculados

Tabela 06 – Metabolismo das células associadas aos biofilmes

Metabolismo (DO₄₉₂ – (DO₆₃₀*R))*100	
Categoria	Cepa(MED±SD)
Forte (≥ 36,00)	Se1228 (36,37 ± 0,006)
Moderado (34,00 – 35,99)	Sa6538 (35,32 ± 0,005)
Débil (20,00 – 33,99)	Kr9341 (20,02 ± 0,001)
Não Formador (≤ 19,99)	-

Legenda:

Sa6538: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Se1228: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228

Kr9341: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

BA: Bactérias aderidas aos poços

PC: Poços controle não inoculados

Petters, Hans e Coenye (2008) realizaram ensaios comparando técnicas que avaliam a formação de biofilme observaram que a cepa *S. aureus* 6538 é uma forte formadora de biofilme considerando tanto a biomassa pelo ensaio do cristal violeta, quanto o metabolismo pelo ensaio da resazurina.

O *S. epidermidis* é uma cepa que pode ser considerada uma boa formadora de biofilme por fatores como a alta expressão de polissacarídeo de adesão intercelular e com as superfícies, o mesmo ocorre com a cepa *S. aureus* (BÜTTNER, MACK, RHODE, 2015) isso explica o comportamento semelhante das cepas nos testes realizados.

A cepa *K. rhizophila* apresentou resultados discretos e segundo a literatura é uma bactéria normalmente avirulenta, sendo mais relacionada a infecções endodônticas (QUEIROZ, *et al.*, 2009), um estudo mais aprofundado sobre o micro-organismo e o uso de algum meio de cultura enriquecido poderá em estudos futuros podem estimular a formação de biofilme pelo micro-organismo.

5.7 Impacto da carboximetilquitosana isolada e em combinação com sais metálicos

A formação de biomassa no biofilme na presença dos compostos foi alterada em todas as concentrações utilizadas, os resultados mais significativos são aqueles nos quais a biomassa remanescente foi inferior a 50% comparada a biomassa dos poços controle na ausência dos compostos testados (Tabela 07).

Tabela 07 – Porcentagem do biofilme formado na presença dos compostos testados.

	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Biomassa remanescente (%)		
		Sa6538	Se1228	Kr9341
Carboximetilquitosana	1000	18,40*	20,87*	10,68*
	500	29,58*	35,92*	24,64*
	250	41,39*	55,49	49,66*
	125	55,39	67,57	70,64
	62,5	75,30	86,73	87,78
Nitrato de prata	500	45,88*	42,22*	50,72
	250	50,95	60,02	75,36
	125	66,42	79,80	80,17
	62,5	90,04	91,31	85,37
Sulfato de zinco	1000	32,65*	35,71*	77,09
	500	39,34*	53,20	87,30
	250	51,39	67,00	90,95
	125	69,84	85,01	95,28
	62,5	98,10	95,63	96,54
Sulfato de cobre	1000	25,77*	24,00*	47,35*
	500	33,87*	33,78*	59,67
	250	40,70*	40,55*	70,07
	125	51,29	63,92	74,98
	62,5	71,01	78,97	85,47
Carboximetilquitosana + Nitrato de prata	500	12,88*\$	20,15*\$	23,29*\$
	250	21,33*\$	34,41*\$	34,17*\$
	125	29,92*\$	43,83*\$	51,49\$

	62,5	39,48* [§]	50,81 [§]	63,04 [§]
	1000	38,75*	36,75*	65,64
	500	44,17*	47,06*	78,63
Carboximetilquitosana +	250	56,37	56,43	89,80
Sulfato de zinco	125	62,08	74,86	90,09
	62,5	73,40	84,49	96,82
	1000	20,89*	27,12*	44,47*
	500	27,04*	31,08*	59,10
Carboximetilquitosana +	250	35,33*	38,47*	68,53
Sulfato de cobre	125	45,92*	62,88	73,82
	62,5	67,59	77,41	83,54

* Formação de biofilmes na presença dos compostos, indicando inibição da biomassa superior a 50%

§ Diferenças significativas entre a inibição da formação de biofilme pelos sais combinados com a carboximetilquitosana e pelos sais isolados.

Legenda:

Sa6538: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Se1228: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228

Kr9341: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

A carboximetilquitosana inibiu a formação de biofilme com significativa redução da biomassa nas três cepas estudadas, apresentando resultados dose dependentes. Contra as cepas *S. aureus* ATCC 6538 e *K. rhizophila* ATCC 9073 a concentração de 250µg mL⁻¹ foi capaz de inibir mais de 50% da biomassa total. Contra a cepa *S. epidermidis* ATCC 1228 sua ação foi menos intensa, sendo que 500µg mL⁻¹ foi a concentração alcançada para inibir a formação de biofilme pela cepa.

As diferenças detectadas entre o nitrato de prata em combinação com a carboximetilquitosana e o mesmo sal isolado, foram significativas, apontando um sinergismo da combinação em relação ao nitrato de prata isolado.

A taxa de metabolismo nos biofilmes formados na presença dos compostos pode ser vista na tabela 08.

Tabela 08 – Porcentagem do biofilme formado na presença dos compostos detectado pelo método de determinação do metabolismo com o corante vital resazurina.

	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Metabolismo remanescente (%)		
		Sa6538	Se1228	Kr9341
Carboximetilquitosana	1000	24,71*	24,71*	65,71
	500	62,58	72,18	82,98
	250	69,83	77,80	91,04
	125	83,31	90,70	96,08
	62,5	97,90	93,01	99,81
Nitrato de prata	500	65,59	71,82	77,59
	250	71,48	87,33	95,50
	125	77,82	93,57	98,82
	62,5	90,59	93,81	99,95
Sulfato de cobre	1000	69,36	62,05	57,65
	500	93,22	81,90	69,55
	250	94,11	86,76	72,25
	125	95,57	90,82	82,13
	62,5	96,38	97,06	98,19
Sulfato de zinco	1000	73,12	67,36	57,75
	500	78,91	72,24	62,32
	250	84,86	77,95	64,80
	125	88,43	86,59	87,77
	62,5	96,94	94,41	97,05
Carboximetilquitosana + Nitrato de prata	500	40,63*\$	28,09*\$	16,72*\$
	250	43,00*\$	30,88*\$	34,02*\$
	125	59,09\$	34,01*\$	34,03*\$
	62,5	63,85\$	44,59*\$	51,77\$
Carboximetilquitosana + Sulfato de cobre	1000	67,76	57,80	48,37*
	500	86,27	80,04	59,79
	250	92,14	82,88	75,84
	125	93,99	93,23	87,58
	62,5	96,56	95,87	95,43
Carboximetilquitosana + Sulfato de zinco	1000	73,12	67,36	57,75
	500	78,91	72,24	62,32
	250	84,86	77,95	64,80
	125	88,43	86,59	87,77

	62,5	96,94	94,41	97,05
--	------	-------	-------	-------

*** Metabolismo remanescente das células associadas ao biofilmes na presença dos compostos, indicando inibição superior a 50%**

\$ Diferenças significativas entre a inibição da formação de biofilme pelos sais combinados com a carboximetilquitosana e pelos sais isolados.

Legenda:

Sa6538: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Se1228: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1228

Kr9341: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

A avaliação da influência dos compostos no metabolismo remanescente não foi tão impactante quanto a biomassa. A carboximetilquitosana foi eficiente para inibir mais de 50% do metabolismo, na concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ as cepas *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 1228. Contra a cepa *K. rhizophila* ATCC 9037 a carboximetilquitosana não foi tão eficiente.

A carboximetilquitosana inibiu o metabolismo das células associadas ao biofilmes de *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis* ATCC 1228, somente na concentração mais alta testada ($1000\mu\text{g mL}^{-1}$). Nenhum dos sais isolados foram capazes de inibir o metabolismo. Entretanto, o nitrato de prata combinado com a carboximetilquitosana foi capaz de inibir o metabolismo das três bactérias testadas. O sulfato de cobre apresentou o mesmo fenômeno na concentração mais alta testada ($1000\mu\text{g mL}^{-1}$).

As diferenças detectadas entre a inibição do metabolismo pelo nitrato de prata em combinação com a carboximetilquitosana e o mesmo sal isolado, foram significativas, apontando um sinergismo da combinação em relação ao nitrato de prata isolado.

Tan *et al.*, (2011) realizou estudos contra a formação de biofilme e utilizou a carboximetilquitosana contra a formação de biofilmes. Nos seus resultados conseguiu inibição de 74,6% da biomassa com a carboximetilquitosana na concentração de $2500\mu\text{g mL}^{-1}$ contra as cepas Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Comparando com os resultados do presente estudo observa-se que uma concentração menor do biopolímero conseguiu uma inibição maior da

biomassa, isso se deve a características da carboximetilquitosana com um alto valor de grau de substituição.

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.
- Nas faixas testadas pelo teste de letalidade de *A. salina* os sais isolados apresentaram toxicidade na faixa da bioatividade, em combinação apenas o sulfato de zinco saiu da zona de bioatividade.
- Pelo teste de letalidade de *A. salina* a carboximetilquitosana demonstrou ser atóxica.
- A redução do efeito tóxico dos sais metálicos para *A. 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.
- *S. aureus* e *S. epidermidis* demonstraram uma forte capacidade de formação de biofilme. *K. rhizophila* não demonstrou ser uma boa formadora de biofilme nas condições experimentais deste estudo.
- Entre os sais, o nitrato de prata foi o único que apresentou atividade antimicrobiana, tanto isolado, quanto em combinação com a carboximetilquitosana.
- 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.
- A combinação entre o nitrato de prata e carboximetilquitosana apresentou um incremento da atividade inibitória da formação de biofilme em relação ao sal e ao polímero isolados. Denotando uma possível ação sinérgica entre os dois compostos.

- A combinação entre nitrato de prata e carboximetilquitosana foi capaz de reduzir o metabolismo das células associadas ao biofilme em mais de 50 % na concentração de $250\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *S. aureus* e $62,5\mu\text{g mL}^{-1}$ *S. epidermidis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F. R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), 2006.

ABREU, F. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 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.

ALMEIDA, G. D.; GODOI, E. P.; SANTOS, E. C.; LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, M. E. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, p. 487-492, 2013.

ANITHA, A.; DIYVIA RANI, V.V.; KRISNA, R.; SREEJA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 672-677, 2009.

ARCANJO, D. D. R.; ALBUQUERQUE, A. C. M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L. C. L. R.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Braz. J. Biol.** v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

BECKER, K.; RUTSCH, F.; UEKÖTTER, A.; KIPP, F.; KÖNIG, J. MARQUARDT, T.; PETERS, G.; VON EIFF, C. *Kocuria rhizophila* Adds to the Emerging Spectrum of Micrococcal Species Involved in Human Infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 3537-3539, 2008.

BROWN, S. A.; PALMER, K.L.; WHITELEY, M. Revisiting the host as a growth medium. **Nature**, v. 6, p. 657-666, 2008.

BROWN, S. A.; PALMER, K.L.; WHITELEY, M. Revisiting the host as a growth medium. **Nature**, v.6, p.657-666, 2008.

BÜTTNER, H.; MACK, D.; ROHDE, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 5, p. 1 – 44, 2015.

CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M.B. Propriedades e aplicações de quitosana. **Revista Processos Químicos**, n.2, p. 9-20, 2007.

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.

CLEMO, B. A nova geração antimicrobiana baseada na nanotecnologia da prata. **Química Têxtil**, n.80, p. 14-18, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7–A6. Wayne, PA: **CLSI**; 2008.

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.

CULLER, Hebert Fabricio. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênciã atípica**. Dissertação de Pós graduação em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan, São Paulo, 2010.

DANTAS, T. L. P., JOSÉ, H. J., MOREIRA, R. DE 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.

DIAS, Ricardo Souza; ZUCCOLI, Paola Couto. Infecção hospitalar por *Staphylococcus aureus* e fatores de risco para o desenvolvimento da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) – Artigo de Revisão. **Periódico científico do núcleo de biociências do Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix**, v. 02, n. 03, p. 27-37, 2012.

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.

FELFÖLDI, T.; JURESCKA, L.; VAJNA, B.; BARKÁCS, K.; MAKK, J.; CEBE, G.; SZABÓ, A.; ZÁRAY, G.; MÁRIALIGETI, K. Texture and type of polymer fiber carrier determine bacterial colonization and biofilm properties in wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**. v. 264, p. 824-834, 2015.

GAMBARDELLA, C; MESARIČ, T.; MILIVOJEVIĆ, T.; SEPČIĆ, K.; GALLUS, L.; CARBONE, S.; FERRANDO, S.; FAIMALI, M. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. **Environ Monit Assess**. v. 186, p. 4249-4259, 2014.

GE, H. C.; LUO, D. K., Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1351-1356, 2005.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nat. Rev. Microbiol**. v. 9, p. 244 –253, 2011.

GUIMARÃES, D. O. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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.

KATSOGIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of the techniques used in estimating bacteria material interactions. **European cells and materials**, v. 8, p 37-57, 2004.

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.

KLEVENS, R. M.; MORRISSON, M. A.; NADLE, J.; PETIT, S.; GERSHMAN, K.; RAY, S.; HARRISON, L. S.; LYINFIELD, R.; DUMYATI, G.; TOWNES, J. M.; CRAIG, A. S.; ZELL, E. R.; FOSHEIM, G. E.; McDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; FRIDKIM, R. K. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United State. **American Medical Association**, v. 208, n. 50, p. 1763 – 1771, 2007.

KOKKALI, V.; KATRAMADOS, I.; NEWMAN, J. D. Monitoring the effect of metal ions on the mobility of *Artemia salina* nauplii. **Biosensors**. v. 1, p. 36-45, 2011.

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE M.; TSAY, H.S.; SUBBARAJU, G. V. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 3, n.2, p. 125-134, 2005.

LEITE, F.; MODESTO, C.M.D.; NASCIMENTO, R.F. do; DIAS, F.S. Adsorção de Cd (II) de soluções aquosas com microesferas de N-carboximetilquitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. v. 6, n. 3, 2005.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2; p. 158-163, 2006.

LI, Wen-Ru; XIE, Xiao-Bae; SHI, Qing-Shan; DUAN, Shun-Shan; OUYANG, You-Sheng; CHEN, Yi-Bem. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Biometals**. v. 24, p. 135-141, 2010.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **Journal of hospital infection**. v. 64, p. 313-325, 2006.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; Sant'Ana, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacology**. v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

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.

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.

MAGALHÃES, Joana Nunes de Moura Pinheiro de. **Importância da formação de biofilmes nas infecções associadas a próteses ortopédicas**. Tese de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2011.

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.

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 Biologican Macromolecules**. v. 50, n. 4, p. 918 - 24, 2012.

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: 14-01-2015.

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

MOURYAA, V. K.; INAMDARA, N. N.; TIWARIB, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v. 1, n. 1, p. 11-33, 2010.

MU, H.; ZHANG, A.; ZHANG, L.; NIU, H.; DUAN, J. Inhibitory effects of chitosan in combination with antibiotics on *Listeria monocytogenes* biofilm. **Food Control**. v. 38, p. 215-220, 2014.

NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; AMARAL, L. A.; PEREIRA, A. M. S. Atividade antibiofilme de diterpeno isolado de *Croton antisiphiliticus* frente *Staphylococcus aureus*. **ARS veterinária**. v. 30, n. 01, p. 32 – 37, 2014.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DHABI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbiology Pathogen**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NETO, R.S.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.de; MARCANTONIO, R.A.C.; JUNIOR, E.M. Biomateriais a Base de Quitosana com Aplicação Medica e Odontológica: Revisao de Literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n .2, p. 155-161, 2008.

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.

PANTANELLA, F.; VALENTI, P.; NATALIZI, T.; PASSERI, D.; BERLUTTI, F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. **Ann Ig**. v. 25, p. 31-42, 2013.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 72, p. 157–165, 2008.

PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; KEAN, M.J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G. R.; TAN, R.; FRANKS, K.S.; HORTON, M.L.; Microplate Alamar Blue Assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 49, p. 2612-2617, 2005.

PHILLIPS, P. L.; WOLCOTT, R. D.; FLETCHER, J.; SCHULTZ, G. S. Biofilms made easy. **Wounds international**. Disponível em: <http://www.woundsinternational.com/made-easy/biofilms-made-easy>, acessado em: 18 de março de 2013.

QUEIROZ, A. M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; ASSED, S.; SILVA, R. A. B.; ITO, I. Y. Antibacterial Activity of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth: Zinc Oxide and Eugenol Cement, Calen Paste Thickened with Zinc Oxide, Sealapex and EndoREZ. **Brasilian Dental Journal**. v. 20, p 290-296, 2008.

QUINA, F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**. v. 27, n. 26, p. 1028-1029, 2004.

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.

ROSA, T.R.O. **Síntese de derivados anfílicos da O-carboximetilquitosana e aplicações de solubilidade de fármaco pouco solúvel (triancinolona)**. 2008.134f. Dissertação (Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas-Universidade do Vale do Itajaí), Itajaí, 2008.

ROSS, Claudia; QUESADA, Regina M. B.; GIRARDELLO, Raquel; ROGERI, Ligia M.; CALIXTO, Leandro A.; PELAYO, Jacinta s. **Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais proveniente de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina**. Ver. Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 27, n.2, p. 117-123. 2006.

SANDBERG, M. E.; SCHELMANN, D.; BRUNHOFER, G.; ERKER, T.; BUSYGIN, I.; LEINO, R.; VUORELA, P. M.; FALLARERO, A. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. **Journal of Microbiological Methods**. v. 78, p 104-106, 2009.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**. v. 43, n 06, p. 413-423, 2007.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANINNI, M. J. S. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SILVA, A. B. S. **Estudo De Adsorção De Íons Cobre (II) Em Carboximetilquitosana: Cinética De Adsorção, Isotermas E Parâmetros Termodinâmicos**. Trabalho de Conclusão (Graduação), Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, 2014.

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, C. F.; SOUZA, C. B. Construção de protótipo de reator com sistema rotacional para isolar micro-organismo com potencial para biorremediação de águas contaminadas por metais pesados. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, p. 66-67, 2015.

SILVA, D. M. **Infeções associadas a biofilmes em clínicas de hemodiálise**. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica. Universidade do Minho, 2012.

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.

SUN, L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN, X.; YANG, J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethylchitosan and application as pulp-cap. **Polymer**, v. 47, p. 1796-1804, 2006.

TA, C. A.; FREUNDORFER, M. MAH, T.; OTÁROLA-ROJAS, M., GARCIA, M.; SANCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; MASCHEK, A.; BAKER, B. J.; ADONIZIO, A. L.; DOWNUM, K.; DURST, T.; ARNASON, J. T. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation by Extracts of Neotropical Rainforest Plants. **Planta Medica**. v. 80, p. 343-350, 2014.

TAN, Yulong; HAN, Feng; MA, Su; YU, Wengong. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p 1365-1370, 2011.

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.

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.

YIN, L.; FEI, L.; CUI, F.; TANG, C.; YIN, C.; Superporous hydrogels containing poly(acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. **Biomaterials**. v. 28, p. 1258-1266, 2007.

ZHAO, L.; ZHU, B.; JIA, Y.; HOU, W.; SU, C. Preparation of biocompatible carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of antibiotic drug. **BioMed Research International**, 2013.