

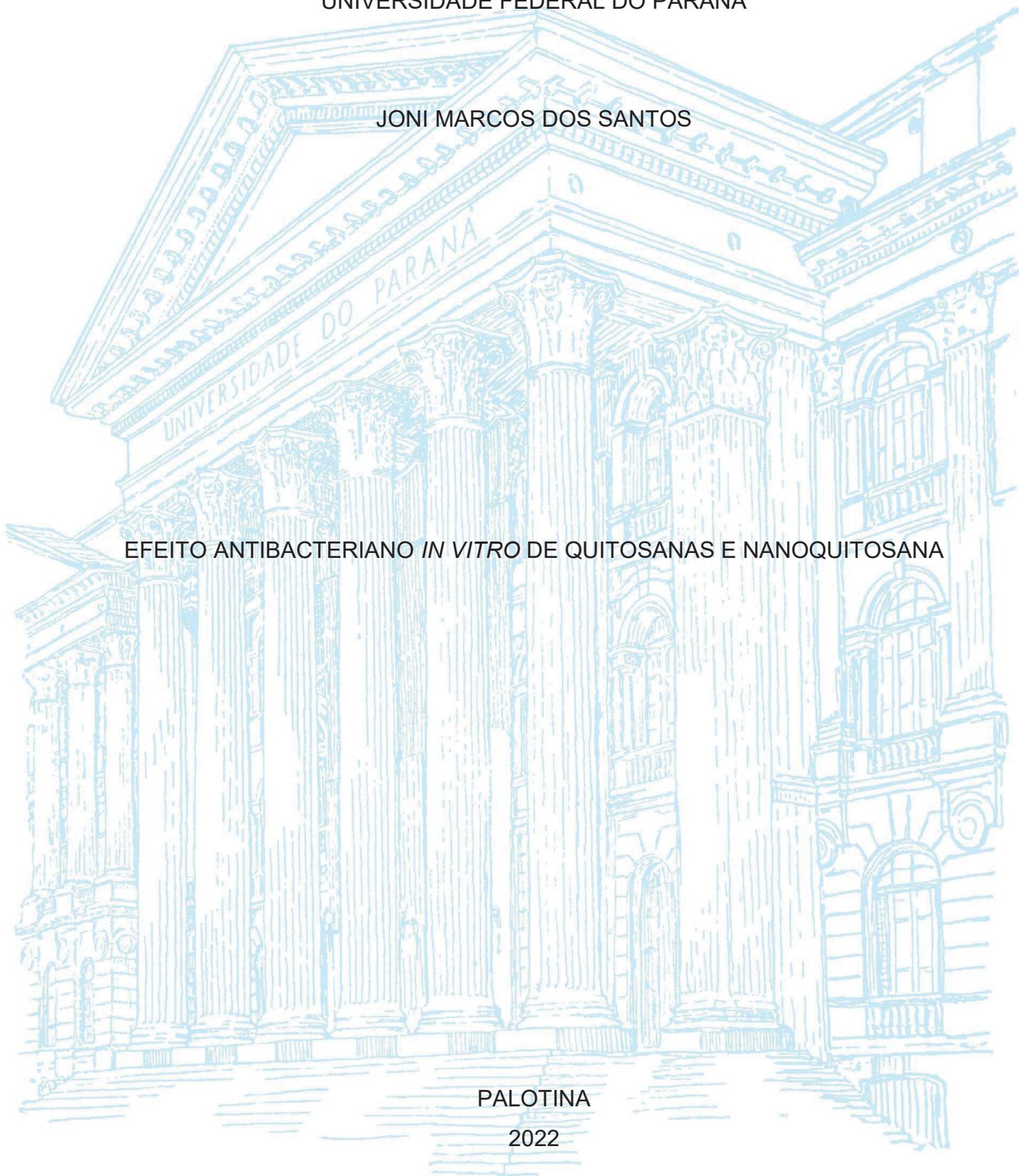
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JONI MARCOS DOS SANTOS

EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE QUITOSANAS E NANOQUITOSANA

PALOTINA

2022



JONI MARCOS DOS SANTOS

EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE QUITOSANAS E NANOQUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katherinne M. Spencoski

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

S237 Santos, Joni Marcos dos  
Efeito antibacteriano *in vitro* de quitosanas e nanoquitosana  
/ Joni Marcos dos Santos. – Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katherinne M. Spencoski.

1. Antimicrobianos. 2. Biomateriais. 3. Quitosana.  
I. Spencoski, Katherinne M. II. Universidade Federal do.  
Paraná. III. Título.

CDU 606

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

## **ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

No dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e dois às 14:00 horas, na sala Online, Plataforma Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **JONI MARCOS DOS SANTOS**, intitulada: **EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE QUITOSANAS E NANOQUITOSANA**, sob orientação da Profa. Dra. KATHERINNE MARIA SPERCOSKI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: KATHERINNE MARIA SPERCOSKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FÁBIO ROGÉRIO ROSADO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, KATHERINNE MARIA SPERCOSKI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 16:02:00.0

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 14:59:30.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 00:09:57.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JONI MARCOS DOS SANTOS** intitulada: **EFEITO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE QUITOSANAS E NANOQUITOSANA**, sob orientação da Profa. Dra. KATHERINNE MARIA SPERCOSKI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 16:02:00.0

KATHERINNE MARIA SPERCOSKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/03/2022 14:59:30.0

ERICA CRISTINA BUENO DO PRADO GUIRRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/03/2022 00:09:57.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RUA PIONEIRO, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8500 - E-mail: [mestradioteciufpr@gmail.com](mailto:mestradioteciufpr@gmail.com)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 157326

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 157326

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Universidade Federal do Paraná – UFPR, universidade onde iniciei minha trajetória e na qual tive o prazer de escrever mais um capítulo juntamente ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Setor Palotina.

Agradecer antes de tudo é um ato de reconhecimento de todas as pessoas que estiveram ao meu lado e que acreditaram e me ajudaram a ter confiança em desenvolver este trabalho. Por toda minha trajetória busquei sempre respeitar, escutar e executar tudo o que foi proposto, posso ter errado muito, mas no final o saldo foi positivo porque aqui eu cheguei...

Bom gostaria de iniciar agradecendo a minha esposa Carla Gonzaga de Oliveira dos Santos que teve paciência e soube entender que todo o esforço era necessário, te amo...

Agradecer a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katherinne Maria Spercoski que teve paciência e lutou junto comigo por esse momento, muito obrigado...

Agradecer a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fiorini a qual me ajudou com conhecimento e conselhos de grande importância, um grande abraço...

Agradecer a mestranda Gabriela Cristina Alves da Silva a quem foi uma grande colega de laboratório por vezes dividindo a carga, Gabi obrigado.

Agradecer também as pessoas a seguir Rafaela Bueno, Karla Simandon, Yara Zanin, Alexandre Pereira, Tiago Sousa, Anderson Marson, Alex Silva, Letícia Ripi, Géssica Manduca, Jothson Ribeiro, Fernando Carvalho, Silvana A. Arrilhar, e todos aqueles que não vou conseguir citar vocês ajudaram em algum momento de alguma forma.

Também agradecer aos membros da banca, Profa. Dra. Erica Cristina Bueno do Prado Guirro e Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado que aceitou me escutar e ajudar nesse momento. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, por disponibilizar o NEMA para a realização dos experimentos.

## RESUMO

As quitosanas são reconhecidas por apresentarem boa biodegradação, excelente biocompatibilidade, não toxicidade e atividade antimicrobiana. O uso das quitosanas como fonte alternativa de combate microbiano tem sido alvo de estudo em todo o mundo, visando combater a crescente resistência de cepas patogênicas a antimicrobianos sintéticos comerciais. A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina, que pode ser obtida de várias fontes como esqueleto externo de insetos e crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta e também fungos. Este presente trabalho testou a atividade antibacteriana *in vitro* de duas nanoquitosanas obtidas de camarão, sendo uma nanoquitosana de baixa massa molecular (Nano) e uma de média massa molecular (0121), e duas quitosanas comerciais, uma de média (SM) e outra de alta massa molecular (SH), à cepas bacterianas. Testou-se a suscetibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, perante a esses biomateriais, sendo cepas ATCC (*American Type Collection Culture*) de *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella Typhimurium* 14028, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538 e *Klebsiella pneumoniae* 13883. As soluções foram preparadas dissolvendo 0,1 g das quitosanas em pó em 10 ml de ácido acético 1% (10 mg/ml) e mantidas sob agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente. O teste de susceptibilidade das bactérias às quitosanas foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo e foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das quitosanas. A bactéria que apresentou maior resistência para todas as quitosanas testadas foi *S. Typhimurium* (Gram-negativa) e a mais sensível foi *B. cereus* (Gram-positiva). Ao se comparar as quatro quitosanas, a SH foi a menos eficiente, sendo necessária uma maior concentração para inibir o crescimento bacteriano. Para *E. coli* O157:H7 e *K. pneumoniae*, ambas Gram-negativas, as menores CIMs foram observadas para as quitosanas Nano e 0121, indicando que são mais eficientes em inibir o crescimento dessas enterobactérias. *P. aeruginosa* apresentou o mesmo perfil de sensibilidade às quatro quitosanas. As quitosanas SM e SH apresentaram o mesmo efeito na inibição de *S. aureus*. No entanto o resultado foi variável e não houve uma tendência das diferentes quitosanas testadas em inibir um determinado tipo de bactéria.

Palavras-chave: Quitina, quitosana, susceptibilidade, antimicrobianos, biomateriais, nanoquitosanas.

## ABSTRACT

Chitosans are recognized for their good biodegradation, excellent biocompatibility, non-toxicity and antimicrobial activity. The use of chitosans as an alternative source of microbial control has been studied around the world, in order to avoid resistance of pathogenic strains to commercial synthetic antimicrobials. Chitosan is obtained through the deacetylation of chitin, which can be obtained from various external skeleton sources of insects and crustaceans such as shrimp, crab and lobster, as well as fungi. This present work tested the *in vitro* antibacterial activity of two nanochitosans obtained from shrimp, one of low molecular mass (Nano) and other of medium molecular mass (0121) and two commercial chitosans with medium (SM) and high (SH) molecular mass. The susceptibility of some Gram-positive and Gram-negative bacterial strains to these biomaterials was tested, using the ATCC (American Type Collection Culture) strains of *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella Typhimurium* 14028, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538 and *Klebsiella pneumoniae* 13883. For the tests with the microorganisms, the solutions were prepared by dissolving 0.1 g of the powdered chitosans in 10 ml of 1% acetic acid (10 mg/ml) and kept under magnetic stirring by 24 hours at room temperature. The susceptibility test of bacteria to chitosans was performed by the broth microdilution technique and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the chitosans. The bacterium with the highest resistance to all chitosans tested by *S. Typhimurium* (Gram-negative) and the most sensitive was *B. cereus* (Gram-positive). When comparing the four chitosans, SH was the least efficient, requiring a higher concentration to inhibit bacterial growth. For *E. coli* O157:H7 and *K. pneumoniae*, both Gram-negative, the lowest MICs were observed for chitosans Nano and 0121, which indicate that they are more efficient in inhibiting the growth of these enterobacteria. *P. aeruginosa* showed the same sensitivity profile to the four chitosans. Chitosans SM and SH had the same effect on the inhibition of *S. aureus*.

Keywords: Chitin, chitosan, susceptibility, antimicrobials, biomaterials, nanochitosan

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DAS 2-AMINO-2-DESOXI-D-GLICOPIRANOSE (GlcN) E 2-ACETAMINO-2-DESOXI-D-GLICOPIRANOSE (GlcNAc). FONTE: FIAMINGO (2016).....5
- Figura 2 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA DE RESÍDUOS MARINHOS.FONTE: YADAV et al. (2019). .....6
- Figura 3 – FLUXOGRAMA DE DESCRIÇÃO DAS ETAPAS UTILIZADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS. FONTE: O AUTOR (2022) ..... 10
- Figura 4 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA, EM MEIO TSA DAS CEPAS UTILIZADAS. A. SALMONELLA TYPHIMURIUM 14028, B. BACILLUS CEREUS 10876, C. PSEUDOMONAS AERUGINOSA 27853, D. KLEBSIELLA PNEUMONIAE 13883, E. ESCHERICHIA COLI O157:H7 43888, F. STAPHYLOCOCCUS AUREUS 643. FONTE O AUTOR (2022) 11
- Figura 5 - ANÁLISE VISUAL DA AÇÃO INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO BACTERIANO APÓS CONTATO COM AS DIFERENTES QUITOSANAS, PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO. SEGUINDO NA VERTICAL NO SENTIDO DE CIMA PARA BAIXO AS SEGUINTE QUITOSANA: SM, SH, Nano e 0121 PARA CADA BACTÉRIA TESTADA. FONTE AUTOR (2022).....17
- Figura 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS BACTÉRIAS FRENTE ÀS DIFERENTES QUITOSANAS TESTADAS PARA CADA BACTÉRIA. FONTE: O AUTOR (2022).....18
- Figura 7– CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) DE SEIS TIPOS DE BACTÉRIAS TESTADAS. FONTE: O AUTOR (2022). .....24
- Figura 8 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) PARA CADA BACTÉRIA TESTADA. FONTE: O AUTOR (2022).25

Figura 9 - COMPARATIVO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL). Letras iguais indicam que não houve diferença entre os grupos ( $p>0.05$ ). FONTE: O AUTOR (2022). .....	26
Figura 10 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) ENTRE BACTÉRIAS CLASSIFICADAS COMO GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS. FONTE: O AUTOR (2022). ...	26
Figura 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS QUITOSANAS TESTADAS PARA CADA BACTÉRIA UTILIZADA. Os asteriscos mostram as diferenças ( $p<0,001$ ; Two-Way ANOVA, SEGUIDO DE Tukey's Multiple Comparisons test). FONTE: O AUTOR (2022). .....	30
Figura 12 - IMAGEM OBTIDA DO PLAQUEAMENTO DOS DISCOS DIFUSÃO PARA CADA QUITOSANA TESTADA. FONTE: O AUTOR (2022). .....	32
Figura 13 - POÇOS DO ENSAIO DE BIOFILME CORADOS COM CRISTAL VIOLETA, NA SEGUINTE CONFORMAÇÃO: COLUNA 1 – CONTROLE NEGATIVO: QUITOSANA SH + BHI (1:1); COLUNAS 2 A 10 – DILUIÇÃO SERIADA DA QUITOSANA + SUSPENSÃO DE E. coli, EM QUE COLUNA 2 POSSUI 1,25 mg/ml E A COLUNA 10 POSSUI 0,009 mg/ml; COLUNA 11 - CONTROLE POSITIVO COM SUSPENSÃO DA BACTÉRIA; COLUNA 12 – CONTROLE NEGATIVO DO CALDO BHI.....	33
Figura 14 - PLAQUEAMENTO, EM ÁGAR MH, DO MATERIAL ADERIDO APÓS ENSAIO DE BIOFILME DE K. pneumoniae, EM DIFERENTES POÇOS DO ENSAIO, COM AS QUITOSANAS 0121 E NANO. O CRESCIMENTO DA BACTÉRIA PODE SER OBSERVADO PELO APARECIMENTO DAS COLÔNIAS. ....	35
Figura 15 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE S. aureus SEM TRATAMENTO COM QUITOSANAS. AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X. ....	36

Figura 16- MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *S. aureus* NA PRESENÇA DAS QUITOSANAS NANO E 0121, NA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM: 2,5 MG/ML) E NA CONCENTRAÇÃO INTERMEDIÁRIA ENTRE A CIM E SUB-CIM (1,88 MG/ML). AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X.....39

Figura 17- MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *K. pneumoniae* NA PRESENÇA DAS QUITOSANAS NANO E 0121, NA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM: 0,625 MG/ML) E NA CONCENTRAÇÃO INTERMEDIÁRIA ENTRE A CIM E SUB-CIM (0,47 MG/ML). AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X.....40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - APLICAÇÕES DA QUITOSANA. FONTE: O autor (2022).....	7
Tabela 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS DIFERENTES QUITOSANAS EXPRESSA EM CIM (mg/ml) DETERMINADA PELO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA. FONTE: O AUTOR (2022). .....	22
Tabela 3 - DIÂMETRO DOS HALOS EM MM PARA CADA QUITOSANA EM RELAÇÃO A CADA BACTÉRIA. FONTE: O AUTOR (2022). .....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. RESÍDUOS DE CAMARÃO E CARANGUEJO .....	4
2.2. QUITINA E QUITOSANA.....	4
2.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO .....	6
2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA QUITOSANA .....	7
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
4.1. LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUIS .....	10
4.2. CEPAS BACTERIANAS .....	10
4.3. FONTE E PREPARO DAS QUITOSANAS .....	11
4.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS ÀS QUITOSANAS.....	12
4.5. DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA).....	13

4.6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO .....	14
4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	14
4.8. EFEITO DAS QUITOSANAS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO PRODUZIDO EM MICROPLACA .....	15
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
5.1 EFEITO ANTIBACTERIANO DAS QUITOSANAS SOBRE AS BACTÉRIAS TESTADAS.....	16
5.1.1. <i>Análise visual do efeito antibacteriano das biomoléculas de quitosanas .....</i>	<i>16</i>
5.1.2. <i>Determinação da CIM e da CBM das diferentes quitosanas frente às bactérias .....</i>	<i>19</i>
5.1.3. <i>Verificação dos resultados de disco difusão em relação as cepas de estudo.....</i>	<i>29</i>
5.1.4. <i>Ensaio das quitosanas sobre a formação de biofilme bacteriano ....</i>	<i>33</i>
5.1.5. <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de K. pneumoniae e S. aureus, após contato com as quitosanas Nano e 0121 .....</i>	<i>35</i>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As biomoléculas da classe das quitosanas são polímeros de carboidratos (glicanos) naturais que podem ser derivados de quitinas por processos de desacetilação. As quitinas também são glicanos, lineares, de unidades dissacarídeas repetidas: 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose; e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, insolúveis em água e córneas que ocorrem naturalmente em diversos organismos, sendo o principal componente da parede celular dos fungos e do exoesqueleto dos artrópodes (FIRDOUS e CHAKRABORTY, 2017).

As quitosanas apresentam algumas propriedades exclusivas como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, o que justifica o seu amplo interesse nas pesquisas, em diferentes campos. Devido à solubilidade das quitosanas em meio aquoso ácido, essas biomoléculas podem ter várias aplicações na área industrial. Essa solubilidade pode ser alterada dependendo do grau de acetilação, peso molecular e distribuição dos grupos acetila e amino ao longo de sua cadeia (KANDILE et al., 2018).

A atividade antimicrobiana de diferentes formulações de quitosanas tem sido estudada por vários pesquisadores em todo o mundo (CHEN et al., 2015; HANPANICH et al., 2017; SHIH et al., 2019; LO et al., 2020; RIVERA AGUAYO et al., 2020). No Brasil, o uso de quitosanas como uma alternativa no combate à proliferação de microrganismos está presente em diversos estudos de Programas de Pós-Graduações e Especializações (Embrapa, 2012).

O principal cerne destas pesquisas é buscar alternativas naturais para o controle de cepas de microrganismos resistentes a antimicrobianos sintéticos e comerciais. Infelizmente na atualidade presencia-se um crescente aumento no surgimento de cepas bacterianas resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis, o que confere um grande problema para saúde animal e humana. Postula-se que o uso indiscriminado de fármacos desta classe está intimamente relacionado com o surgimento e desenvolvimento destas cepas (BALOUIRI et al., 2016).

A produção de quitosanas a partir de fontes naturais é relativamente barata e também está ligada à redução de alguns problemas ambientais, em especial

envolvidos com o descarte de resíduos da produção animal, por exemplo, da produção de camarões.

Nos últimos anos, com a expansão da carcinicultura no Brasil, o comércio de camarões, além do forte impacto socioeconômico que apresenta, gera grande quantidade de resíduos, em especial o exoesqueleto dos animais abatidos, comumente chamado de carapaça. Esse material, considerado resíduo da indústria de abate de camarões, é uma matéria-prima rica em quitinas, que servem como precursoras das quitosanas (ALVES et al., 2017).

Sendo assim, estudar e compreender melhor a ação destas biomoléculas pode viabilizar, além de futuras fontes de renda, o necessário desenvolvimento sustentável destes sistemas de produção animal. Considerando isso, é importante não apenas a viabilização de métodos que visem da produção de quitosanas a partir desses resíduos (ALMEIDA et al., 2015), mas também estudos do potencial destas biomoléculas em diversas áreas, tais como saúde, indústria, etc. Nesse sentido, diversos autores já têm descrito o uso de quitosanas obtidas de carapaça de camarões (GOPALAKANNAN et al., 2000; PERCOT et al., 2003; BENHABILES et al., 2013; YOUNES e RINAUDO, 2015; PAKIZEH et al., 2021).

O município de Palotina – PR é importante produtor na carcinicultura, produção animal que tem crescido consideravelmente na região. Entretanto, na mesma proporção em que esse sistema cresce, também cresce a produção dos resíduos de exoesqueleto dos animais abatidos, que não tem uso para os frigoríficos locais. Pesquisadores do Laboratório de Materiais e Energias Renováveis (LABMATER) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, têm unido esforços para purificação das quitinas e produção de quitosanas usando esses resíduos (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2021; POLINARSKI et al., 2021).

Das quitosanas produzidas pelo LABMATER, uma apresenta baixíssimo peso molecular (PM) e é considerada uma nanopartícula (nanoquitosana, patenteada pelos pesquisadores do laboratório). Devido a ser uma nanopartícula, a nanoquitosana tem um potencial enorme na área da saúde humana e animal, pois pode ser utilizada como veículo de fármacos, veículos vacinais, atuar como agentes antimicrobianos.

É conhecido que algumas quitosanas comerciais, de médio e alto PM, com diferentes graus de acetilação e, conseqüentemente, solubilidade em meio aquoso, apresentam atividade antimicrobiana; entretanto, até o momento, quitosanas de baixo

e baixíssimo PM, comerciais e produzidas em laboratório, foram menos estudadas para verificação deste potencial.

A nanoquitosana produzida e patenteada pelo LABMATER ainda não foi avaliada para seu potencial antimicrobiano, sendo um trabalho inédito para o grupo de pesquisa, do qual somos colaboradores.

Neste cenário, este estudo foi planejado com o objetivo de analisar a atividade antibacteriana, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de duas formulações de quitosana (uma de médio PM, identificada como 0121; e a nanoquitosana) do LABMATER, produzidas a partir de resíduos do sistema de abate de duas espécies de camarões sendo uma da região de Palotina – PR (*Macrobrachium rosenbergii*) e outra (*Litopenaeus vannamei*) espécie de origem marinha.

Para essas análises realizaram-se por meio da técnica de microdiluição em caldo, análise de disco difusão, observação em microscopia eletrônica de varredura e verificação de atividade antimicrobiana em biofilme produzido em microplaca.

Para melhor comparar os resultados, foram também utilizadas duas quitosanas comerciais da Indústria Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil), de diferentes PM (médio e alto), com atividade antimicrobiana já conhecida.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. RESÍDUOS DE CAMARÃO E CARANGUEJO

O aumento na geração de resíduos está relacionado ao aumento na produção, o que por sua vez está vinculado com o aumento populacional humano. Com isso o grande vilão do meio ambiente precisa ser destinado de forma correta para que não ocorram problemas (YADAV, et al., 2019). Assim, se faz cada vez mais presente e necessário o desenvolvimento de meios que possam aproveitar, se não toda, grande parte dos resíduos gerados, por reutilização ou para extração/produção de produtos para fins comerciais.

Nas indústrias onde ocorrem o processamento de alimentos, geram-se resíduos com potenciais de reutilização, como, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar das usinas sucro-alcooleiras que geralmente é utilizado como fonte energética para alimentar as caldeiras de cogeração de energia; retroalimentando a indústria e eliminando um potencial poluente ambiental. Um outro resíduo oriundo da indústria de processamento de pescados e frutos do mar com grande potencial biotecnológico são os exoesqueletos crustáceos.

Os frutos do mar têm se tornado uma fonte de proteína altamente consumida. Este tipo de alimento precisa ser processado de forma rápida, pois é perecível (ERASMUS et al., 2021). O grande volume de resíduos precisa ser tratado de forma correta; e diversos resíduos de processamento podem também ser destinados para utilização como subproduto.

As carapaças de camarão e caranguejos são resíduos quitinosos, ou seja, ricos em quitina, tornando-se um produto comercial com ampla aplicação deixando de ser um problema e para gerar renda.

### 2.2. QUITINA E QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante, perdendo apenas para a celulose, entretanto é o mais abundante no ecossistema marinho. Existem diferentes fontes de quitina na natureza sendo elas: moluscos, insetos, fungos e crustáceos. Possui uma característica de ser insolúvel em água e pode ser encontrada em duas formas polimórficas, sendo elas:  $\alpha$  e  $\beta$ . A  $\alpha$ -quitina é comumente encontrada em

parede celular de fungos e leveduras e no exoesqueleto de artrópodes. Já a  $\beta$ -quitina não é encontrada tão facilmente, mas pode ser obtida através de gládios de moluscos (AAM et al., 2010)

A quitina e a quitosana são glicanos constituídos por 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose (GlcNAc), conforme observado na figura 1.

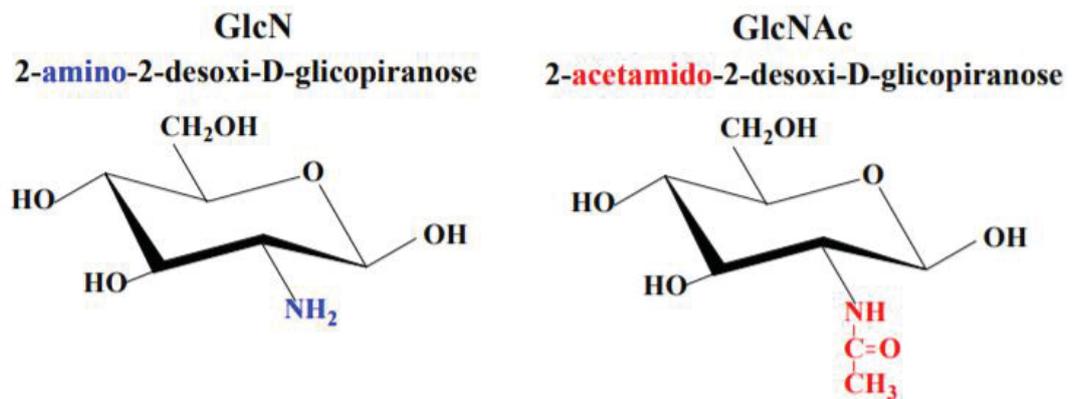


Figura 1 - ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DAS 2-AMINO-2-DESOXI-D-GLICOPIRANOSE (GlcN) E 2-ACETAMINO-2-DESOXI-D-GLICOPIRANOSE (GlcNAc). FONTE: FIAMINGO (2016).

A quitina é extraída principalmente de carapaças de camarão e caranguejos. Este processo requer etapas minuciosas para obtenção de uma quitina de qualidade, sendo que o mesmo pode acontecer por via química ou biológica descrita na figura 2.

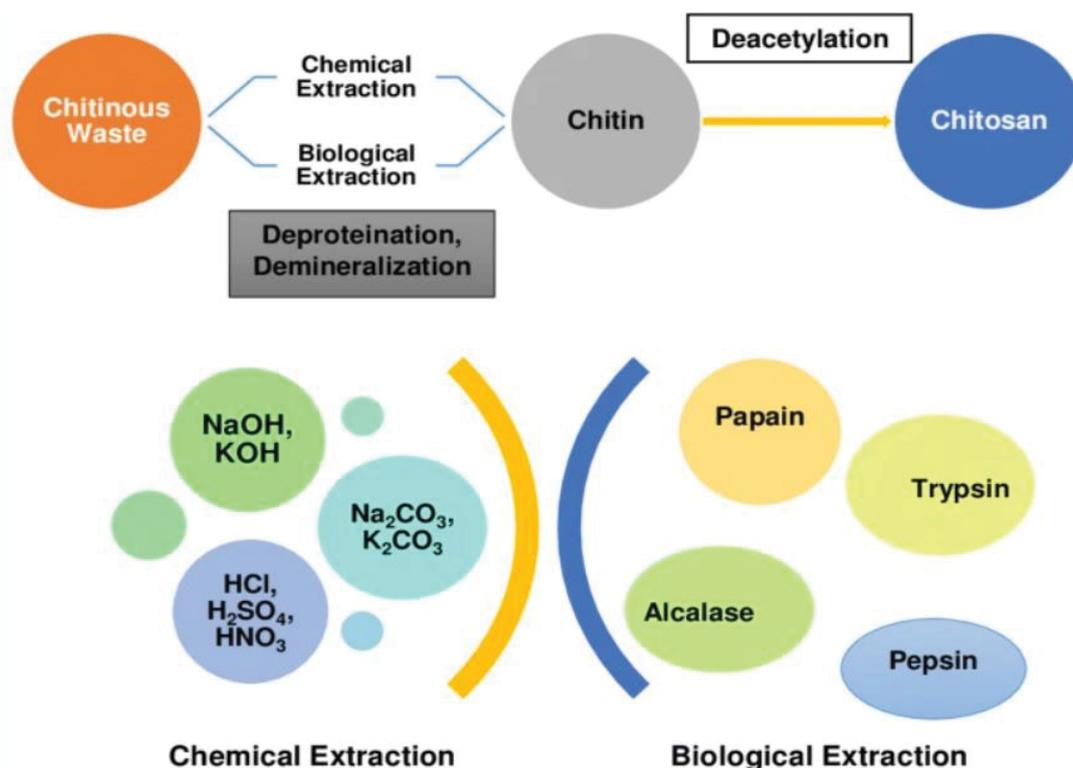


Figura 2 - MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA DE RESÍDUOS MARINHOS.FONTE: YADAV et al. (2019).

Durante o processo de desacetilação da quitina, ela passa por uma reação de protonação do grupo amino, sendo que ao atingir um grau de desacetilação (porcentagem de monômeros de glucosamina) próximo a 50% a quitina se torna solúvel em solução aquosa ácida, mudando então a sua estrutura para quitosana (CASADIDIO et al., 2019).

CASADIDIO et al. (2019) apresentam que a quitosana pode ter diferentes graus de desacetilação e pode ser realizada por várias técnicas. A molécula ainda apresenta que o peso molecular final irá depender da fonte de origem e do método de clarificação utilizado.

### 2.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Com a sua alta compatibilidade ao se trabalhar com quitosana, diferentes estudos vêm sendo realizados com o passar dos anos. O mesmo acontece em todas as possíveis áreas de utilização como descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - APLICAÇÕES DA QUITOSANA. FONTE: O autor (2022)

Título	Área de utilização	Autor
Tratamento de águas residuárias oriundas da purificação do biodiesel por coagulação empregando sulfato de alumínio e quitosana: avaliação preliminar	Indústria	GUIMARÃES (2013)
Avaliação de elemento filtrante à base de quitosana na aquicultura	Agricultura	ZADINELO (2018)
Efeito da massa molar da quitosana em membranas utilizadas em células a combustível	Indústria	GASPARRINI (2018)
Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (cos): a review.	Alimentos	Kim e Rajapakse (2005)
Potential applications of chitosan in veterinary medicine.	Saúde	Senel e McClure (2004)
Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers.	Saúde	Muzzarelli (2008)

#### 2.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA QUITOSANA

Em estudos sobre a atividade antimicrobiana da quitosana normalmente ela é citada com o um agente bactericida (mata as bactérias vivas ou alguma fração delas) ou bacteriostática (impede o crescimento das bactérias, mas não implica se as bactérias são ou não mortas), muitas vezes sem distinção entre as atividades. Alguns autores tendem a caracterizar a quitosana como bacteriostática ao invés de bactericida (COMA et al., 2002), embora o mecanismo exato não seja totalmente compreendido e vários outros fatores possam contribuir para a ação antibacteriana (RAAFAT et al., 2008).

Três modelos foram propostos para explicar a ação da quitosana sobre a estrutura bacteriana, sendo o mais aceito a ocorrência de uma interação entre moléculas de quitina/quitosana carregadas positivamente e membranas celulares microbianas carregadas negativamente. Neste modelo a interação é mediada pelas

forças eletrostáticas entre os grupos  $\text{NH}^3$  protonados e os resíduos negativos (TSAI et al., 1999), presumivelmente por competir com o  $\text{Ca}^{2+}$  por sítios eletronegativos na superfície da membrana. Essa interação eletrostática pode promover alterações nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, provocando desequilíbrios osmóticos internos e conseqüentemente inibindo o crescimento de microrganismos (HADWIGER et al., 1981) e também provocar hidrólise dos peptidoglicanos presente na parede celular das bactérias, levando ao extravasamento de eletrólitos intracelulares, como íons de potássio e outros constituintes proteicos como proteínas, ácidos nucleicos, glicose e lactato desidrogenase (PAPINEAU et al., 1991).

Alguns resultados de pesquisa também mostram que a quitosana pode afetar a expressão de genes, ao se ligar à molécula de DNA (XU et al., 2007; PARK et al., 2011; MÁRQUEZ et al., 2013).

Em relação ao efeito da concentração da quitosana, quando em baixa concentração, ela se combina com a superfície das células bacterianas que apresentam carga negativa, rompendo a membrana celular e induzindo ao vazamento de componentes celulares, o que leva à morte das bactérias. Por outro lado, quando a concentração é maior, a quitosana protonada pode ser envolvida na superfície das células bacterianas para evitar o vazamento de componentes celulares e as células bacterianas carregadas positivamente se repelem para evitar a aglutinação (LIN e HUDSON, 2004; LI e ZHUANG, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo principal verificar a atividade antibacteriana de duas formulações de biomoléculas da classe das quitosanas, sendo uma delas nanopartícula; purificadas, produzidas e patenteadas pelo Laboratório de Materiais e Energias Renováveis (LABMATER) - UFPR / Setor Palotina, a partir de resíduos de camarões das espécies *Macrobrachium rosenbergii* e *Litopenaeus vannamei*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade antibacteriana *in vitro* por meio de microdiluição em caldo, teste de disco difusão, análise em microscopia eletrônica de varredura e efeito em biofilme produzido em microplaca;
- Determinar a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Verificar se as diferentes formulações apresentam efeitos diferentes sobre a ação antibacteriana;
- Comparar o possível efeito antibacteriano com quitosanas comerciais, de médio e alto PM;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

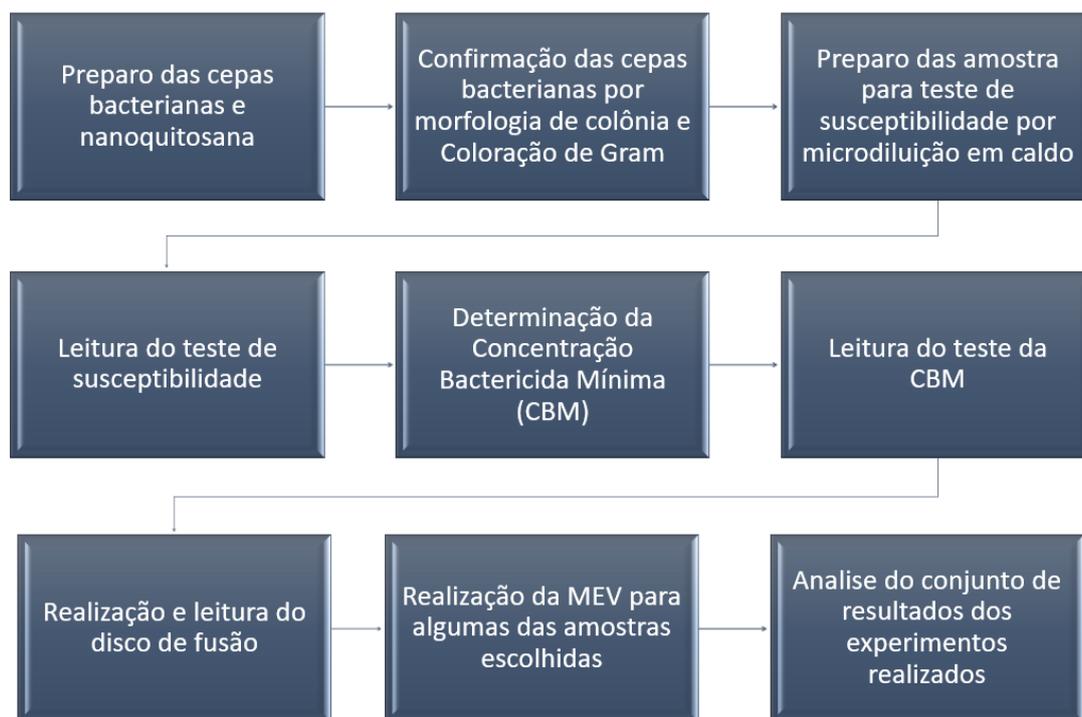


Figura 3 – FLUXOGRAMA DE DESCRIÇÃO DAS ETAPAS UTILIZADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS. FONTE: O AUTOR (2022)

### 4.1. LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Os experimentos foram realizados no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina.

### 4.2. CEPAS BACTERIANAS

As bactérias utilizadas para analisar o efeito das quitosanas foram as cepas ATCC (*American Type Collection Culture*) de *Bacillus cereus* 10876, *Salmonella Typhimurium* 14028, *Escherichia coli* O157:H7 43888, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus* 6538 e *Klebsiella pneumoniae* 13883.

As bactérias, estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram inicialmente reativadas em BHI líquido (Brain Heart Infusion) e cultivadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar),

incubadas a 36 °C por 24 horas. Após a reativação das cepas, conferiu-se a morfologia de colônia para a confirmação das bactérias (Figura 4), os resultados confirmaram cada gênero/espécie, compatíveis com os apresentados na literatura.

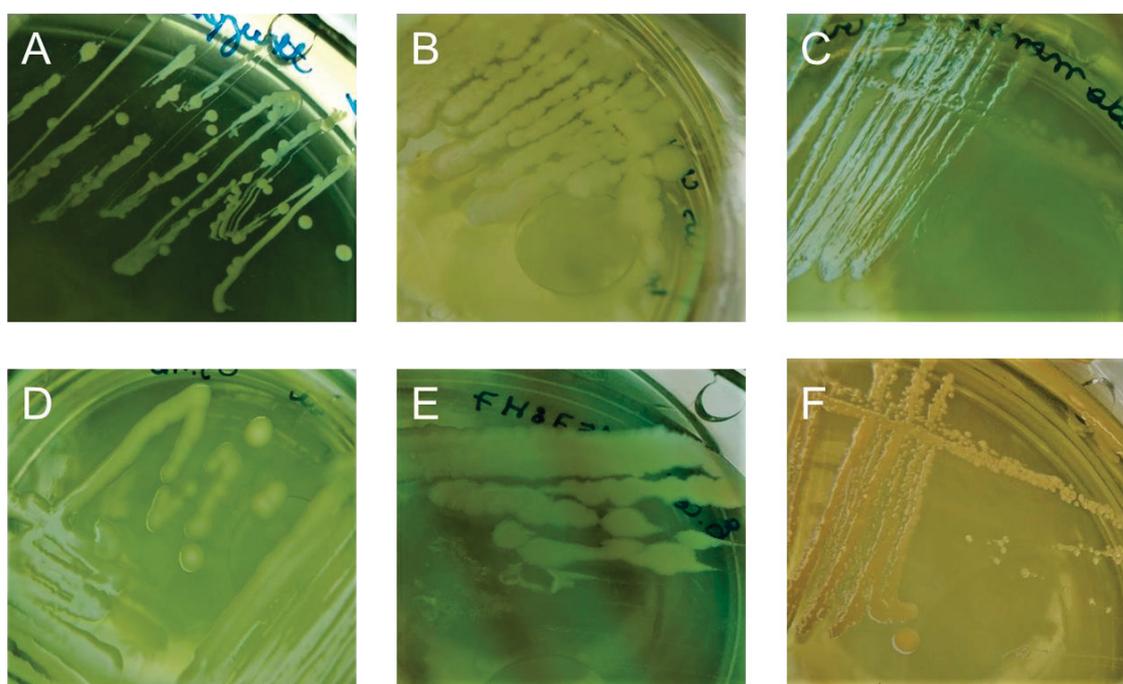


Figura 4 - MORFOLOGIA DA COLÔNIA, EM MEIO TSA DAS CEPAS UTILIZADAS. A. SALMONELLA TYPHIMURIUM 14028, B. BACILLUS CEREUS 10876, C. PSEUDOMONAS AERUGINOSA 27853, D. KLEBSIELLA PNEUMONIAE 13883, E. ESCHERICHIA COLI O157:H7 43888, F. STAPHYLOCOCCUS AUREUS 643. FONTE O AUTOR (2022)

#### 4.3. FONTE E PREPARO DAS QUITOSANAS

Neste trabalho foram utilizadas quatro formulações biomoléculas da classe das quitosanas. Duas comerciais (Sigma-Aldrich®, São Paulo - Brasil) e duas purificadas, produzidas e patenteadas pelo Laboratório de Materiais e Energias Renováveis (LABMATER) – UFPR / Setor Palotina.

As duas quitosanas comerciais são classificadas de acordo com seu peso molecular (PM) em médio PM, de 170 a 310 KDa (cat. N° 448877), identificadas neste trabalho como SM; e outra de alto PM, de 310 a 375 KDa (cat. N° 419419), identificada como SH neste trabalho.

As quitosanas produzidas pelo LABMATER também são classificadas da mesma forma, em médio PM, identificadas neste trabalho como 0121; e em baixo PM, 13KDa, sendo esta uma nanopartícula, identificada neste trabalho como nanoquitosana.

As quitosanas 0121 e nanoquitosana foram caracterizadas pela equipe do LABMATER de acordo com Gasparrini (2018). O Grau de desacetilação das mesmas foi avaliado por meio de titulação condutimétrica e o resultado obtido foi de 94%, já o PM foi verificado por meio da viscosidade intrínseca de soluções de quitosana.

Para os testes com os microrganismos, as soluções foram preparadas dissolvendo 0,1 g das quitosanas em 10 ml de ácido acético 1% (10 mg/ml) e mantidas sob agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente. Antes da realização da atividade antimicrobiana, os frascos foram esterilizados por luz ultravioleta UVC, em cabine de fluxo laminar, por 20 minutos.

#### 4.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE, POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO, DAS BACTÉRIAS ÀS QUITOSANAS

O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com a NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*, 2003, M7-A6) intitulado: “*Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.” A finalidade desta norma é fornecer informações sobre o teste de sensibilidade, sendo indicado para qualquer microrganismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana.

A preparação do inóculo inicial realizou-se a partir de colônias isoladas dissolvidas em solução salina (NaCl 0,85%) através da medida da absorbância (ABS) a 625nm, variando entre 0,08 e 0,1, o que é equivalente a 0,5 da escala de MacFarland. Realizaram-se diluições seriadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) para que o inóculo atingisse a concentração de  $1,0 \times 10^4$  UFC/ml.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno contendo 96 poços, com linhas de A-H e colunas de 1-12. Na coluna 1 foram adicionados

200 µL de quitosana na concentração de 10 mg/mL. Nas colunas de 2-11 foram adicionados 100 µl de BHI. Em seguida, realizaram-se uma diluição seriada de 1:2 a partir da coluna 1, da qual foram transferidos 100 µl para a coluna 2, seguido de homogeneização e transferência de 100 µl da coluna 2 para coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna 10, da qual 100 µl foram descartados. Por fim, foram adicionados 100 µl do inóculo bacteriano ( $1,0 \times 10^4$  UFC/ml) nas colunas de 1-10, obtendo-se concentrações das quitosanas entre 5 mg/mL a 0,00975 mg/mL na placa. Em todos os poços a concentração de bactérias foi  $1,0 \times 10^3$  UFC/ml/poço. O controle positivo do experimento foi na coluna 11 (100 µl do BHI e 100 µl do inóculo, sem quitosana) e o negativo na coluna 12 (200 µl de BHI apenas).

Para cada bactéria, o teste foi feito em triplicata. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em uma estufa de crescimento.

Por fim, a leitura do teste baseou-se em relação a concentração inibitória mínima (CIM), definida no primeiro poço que não houve crescimento microbiano, determinando qual foi a menor concentração do extrato capaz de causar a morte dos microrganismos.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DA CBM (CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA)

O meio de cultura utilizado para este teste foi o ágar MH (Müller-Hinton) distribuído em Placas de Petri, determinando a CBM para bactérias que foram inibidas pelas quitosanas. Esse teste foi necessário para a confirmação da ação bactericida das quitosanas, pois apresentaram turbidez em contato com o BHI, o que dificultou a análise visual confirmatória. Através da CIM realizada nas microplacas, foi retirada uma alíquota de 5 uL de cada poço e depositado sobre o meio de cultura, com auxílio de uma micropipeta. As placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37 °C durante 24 horas a fim de analisar novamente se houve ou não o crescimento bacteriano, para confirmação da análise de microdiluição em caldo.

#### 4.6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIBACTERIANA POR DISCO-DIFUSÃO

O método de disco-difusão foi utilizado para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana das bactérias às quatro quitosanas, de acordo com o CLSI (2015, M02-A12 - *Clinical & Laboratory Standards Institute*). As bactérias foram cultivadas em caldo Müeller-Hinton (MH) durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, a densidade óptica foi ajustada para 0,08 valor de absorbância em 625 nm e 100 µl do inóculo foram espalhados com auxílio de um *swab* em placas com meio MH. Em seguida, discos de celulose de 6 mm, impregnados com 10 µl das quitosanas (10 mg/mL), foram fixados sobre o meio e as placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. A dimensão dos halos formados ao redor dos discos foi medida para determinar o efeito dos extratos sobre as bactérias. O teste foi feito em triplicata.

#### 4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram selecionadas uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma Gram negativa (*Klebsiella pneumoniae*). Obteve-se uma cultura de aproximadamente 16 horas de crescimento, a partir de uma colônia pura. A densidade óptica da cultura foi ajustada inicialmente para 0,08 a 0,1 valores de absorbância, em caldo BHI, equivalente a aproximadamente 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

A partir dessa suspensão inicial foi realizada uma diluição seriada em solução de BHI, obtendo-se o inóculo final desejado de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de poliestireno contendo 24 poços. Foi adicionado em cada poço do ensaio 1 lamínula de vidro circular estéril (13 mm de diâmetro), que foi depositada sobre algumas pérolas de vidro, para suporte.

Preparam-se as seguintes amostras: controle negativo (1000 µL de BHI; controle positivo: 500 µL de bactérias a  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL e 500 µL de BHI; poço CIM: 500 µL de bactérias a  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL e 500 µL BHI contendo a

concentração inibitória mínima da quitosana para cada bactéria testada e poço sub-sub CIM: 500  $\mu\text{L}$  de bactérias a  $1,0 \times 10^4 \text{UFC/mL}$  e 500  $\mu\text{L}$  BHI contendo uma concentração intermediária entre a CIM e a sub-CIM das quitosanas.

As placas foram incubadas por 48 horas à 37 °C. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as lamínulas lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Em todos os ensaios, a quantidade final de células foi de  $1,0 \times 10^3 \text{UFC/mL}$ . Na sequência, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100% (esta última por 2 vezes) durante 10 minutos cada. O ponto crítico foi realizado em equipamento Leica EM CPD300 *Critical Point Dryer* durante aproximadamente 20 minutos e as imagens de MEV foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 SEM com aumentos de 5.000 e 15.000 vezes.

#### 4.8. EFEITO DAS QUITOSANAS NA FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO PRODUZIDO EM MICROPLACA

O ensaio de formação de biofilme realizou-se para todas as bactérias. Colônias isoladas foram cultivadas em 5 ml de caldo de infusão de cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37 °C para indução da capacidade de formação de biofilme.

O ensaio de biofilme realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em triplicata. No primeiro poço da placa foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  das quitosanas (10 mg/ml). Nos poços 2 a 10 foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de BHI e diluições seriadas das quitosanas foram realizadas na proporção 1:1, a partir do poço 1, que foi o controle negativo do ensaio (somente quitosana diluída 1:1 em BHI). Posteriormente adicionou-se nesses poços 100  $\mu\text{L}$  das bactérias na de  $1 \times 10^6 \text{UFC/mL}$ . O poço 11 serviu como controle positivo (somente bactéria diluída em BHI na proporção 1:1) e o poço 12 continha apenas meio de cultura BHI. As placas foram incubadas por 48 horas à 37 °C.

Após a etapa de desenvolvimento do biofilme, removeu-se o sobrenadante com auxílio de uma micropipeta, os poços lavados três vezes com

solução salina (NaCl 0,85%), e as placas foram secas invertidas em estufa à 60 °C, por uma hora. Para a coloração do biofilme, adicionaram-se em cada poço 200 µL de solução de cristal violeta a 1 % e a placa mantida por 20 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de coloração a solução foi removida e os poços lavados 3 vezes com água destilada e secas por 30 minutos, na posição invertida.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EFEITO ANTIBACTERIANO DAS QUITOSANAS SOBRE AS BACTÉRIAS TESTADAS

#### 5.1.1. *Análise visual do efeito antibacteriano das biomoléculas de quitosanas*

A análise visual realizada nas microplacas (96 poços) indicou que todas as quitosanas testadas apresentaram inibição do crescimento bacteriano, observada pela ausência de turbidez bacteriana nos poços (Figura 5).

Como as quitosanas apresentavam diferentes graus de viscosidade e turbidez, que poderiam mascarar o resultado visual, alíquotas dos seguintes poços foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton para verificar crescimento bacteriano.

Após o período de incubação das placas, observou-se a concentração (placa contendo a alíquota do poço de origem) onde não se visualiza mais crescimento bacteriano, conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). Além disso, verificou-se que todas as quitosanas apresentaram atividade bactericida, conhecida como Concentração Bactericida Mínima (CBM) e não bacteriostática sobre as bactérias (Figura 6). Na atividade bacteriostática, quando o microrganismo é removido do contato com o agente antibacteriano e transferido para um meio de cultivo livre desse agente, poderá apresentar crescimento, o que não foi observado neste trabalho.

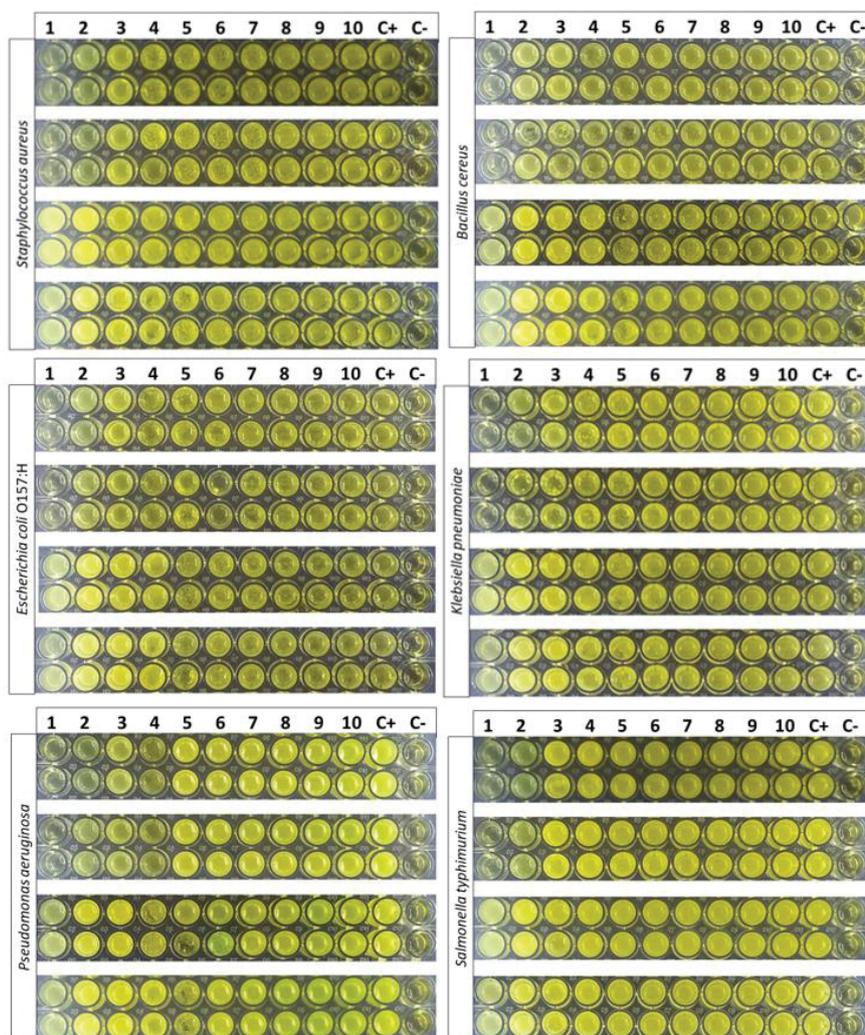


Figura 5 - ANÁLISE VISUAL DA AÇÃO INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO BACTERIANO APÓS CONTATO COM AS DIFERENTES QUITOSANAS, PELA TÉCNICA DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO. SEGUINDO NA VERTICAL NO SENTIDO DE CIMA PARA BAIXO AS SEGUINTE QUITOSANA: SM, SH, Nano e 0121 PARA CADA BACTÉRIA TESTADA. FONTE AUTOR (2022)

A figura 5 exemplifica como realizou-se as leituras através de comparação visual entre os poços e posterior confirmação daquele na qual se tinha como o de CIM, com isso se era possível afirmar que realmente a inibição ocorreu no poço destacado para cada qualidade de quitosana.

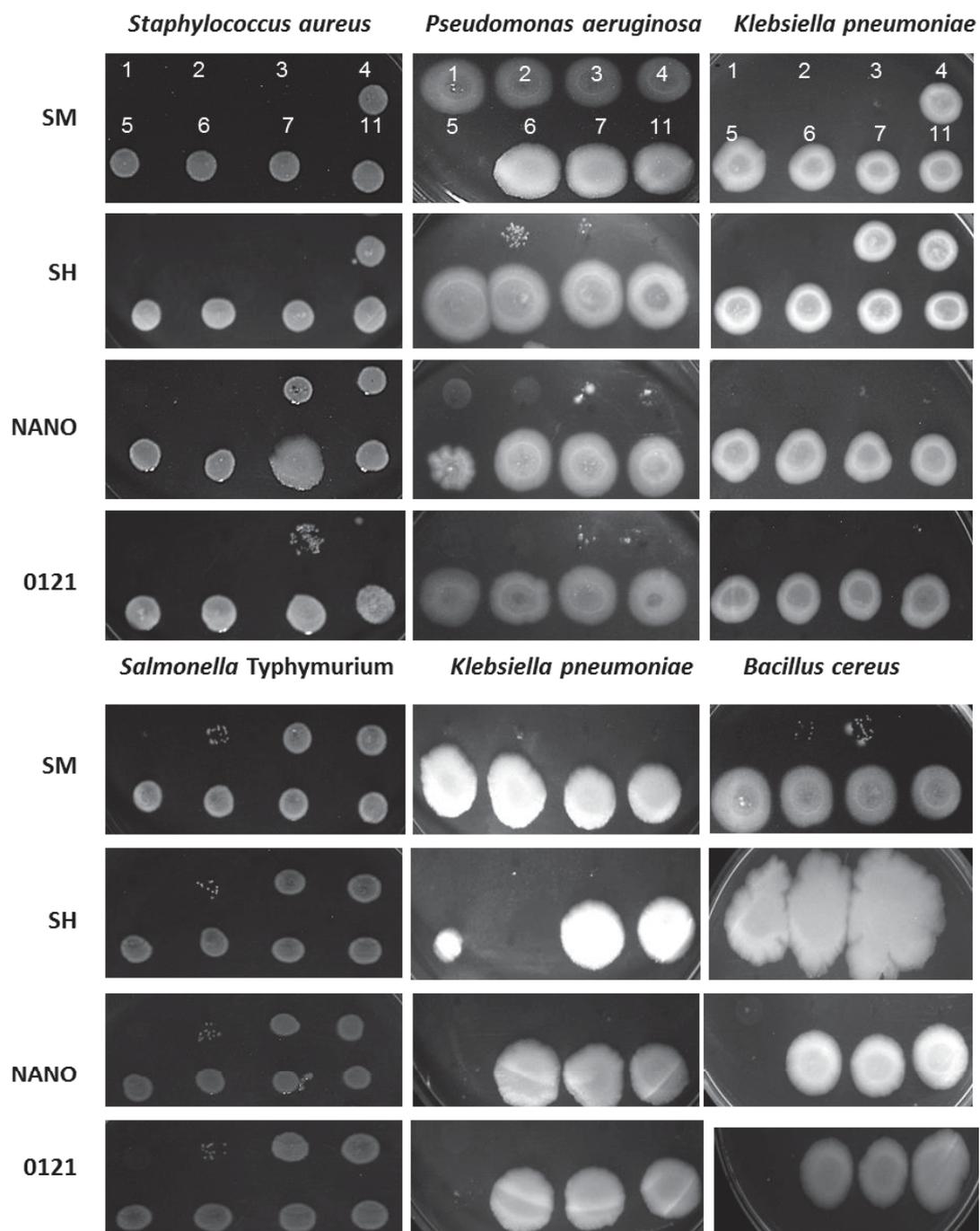


Figura 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DAS BACTÉRIAS FRENTE ÀS DIFERENTES QUITOSANAS TESTADAS PARA CADA BACTÉRIA. FONTE: O AUTOR (2022)

### 5.1.2. Determinação da CIM e da CBM das diferentes quitosanas frente às bactérias

Considerando-se que os poços 1 a 10 da microplaca do ensaio de microdiluição em caldo contém concentrações decrescentes das quitosanas (5 a 0,00975 mg/ml), foi possível determinar a CIM das quitosanas testadas para cada bactéria e confirmar a CBM.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos. A bactéria *P. aeruginosa* apresentou inibição no poço 4, correspondente à concentração de 0,625 mg/ml para todas as quatro quitosanas. *P. aeruginosa* é uma bactéria aeróbia com características morfotintoriais em forma de bastonetes móveis Gram-negativos, não formadores de esporos. Podem ser responsáveis por infecções do trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados, sendo muito associada ao aumento da mortalidade nesses casos (YANG et al., 2019). Dentro do gênero *Pseudomonas*, diferentes espécies vêm apresentando resistência à diversos medicamentos (DING et al., 2016).

Quanto à *S. aureus*, o resultado foi variável, apresentando inibição no poço 3 (1,25 mg/ml) para as quitosanas comerciais SM e SH, poço 2 (2,5 mg/ml) para a nanoquitosana e no poço 5 (0,312 mg/ml) para a quitosana 0121. *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, com arranjo em cachos (estafilococo) encontrada normalmente na pele e mucosa de seres humanos e animais. É considerado um patógeno oportunista responsável por diversas infecções. De acordo com Weiner e colaboradores (2016), uma das principais causas por bacteremia em pacientes hospitalares é pela contaminação de *S. aureus*, representando um problema de saúde global. A bacteremia está associada a diversas infecções metastáticas, como endocardite infecciosa, artrite séptica e complicações, como choque séptico e sepse (MONTARELO et al., 2018).

*S. Typhimurium* apresentou também apresentou inibição no crescimento para a mesma concentração de todas as quitosanas testadas, poço 2 (2,5 mg/ml). *Salmonella spp.* é uma enterobactéria na forma de bacilo Gram negativo que apresenta apenas 2 espécies. No entanto, existem diferentes sorovares, sendo *S. Typhimurium* um dos sorovares de maior prevalência, considerada um

importante patógeno de origem alimentar. A salmonelose ocorre através de uma infecção alimentar ocasionada por alimentos crus ou mal processados, gerando no indivíduo gastroenterite, febre entérica e septicemia. Dentre todos os sorovares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* têm a maior prevalência principalmente em casos de septicemia (TIWARI et al., 2017).

A bactéria Gram positiva *B. cereus*, na forma de bacilos apresentou uma maior sensibilidade às quitosanas, tendo inibição no poço 5 (0,312 mg/ml) para todas. Esse resultado é importante, visto que essa espécie é formadora de endósporos, o que a torna mais resistente. Este microrganismo pode ser encontrado facilmente em alimentos secos como temperos, ingredientes farináceos e leite em pó, na forma de esporos, sendo considerados resistentes ao calor. Os endósporos sobrevivem ao processo de cocção de alimentos. O fator de virulência varia de acordo com as linhagens. Dessa forma, *B. cereus* pode estar associado com a produção de toxinas, dentre elas: diarreica e emética (BOTTONE, 2020).

*E. coli* O157:H7 apresentou grande variação de perfil de susceptibilidade às quitosanas, sendo inibida no poço 4 (0,625 mg/ml) e 6 (0,156 mg/ml) para as quitosanas comerciais SM e SH, respectivamente; e poço 5 (0,312 mg/ml) para nanoquitosana e 0121. O gênero *Escherichia* pertence à bactérias bacilares Gram-negativas anaeróbias facultativas, sendo *E. coli* a principal espécie. Um dos principais habitats é o intestino humano. Atualmente, existem seis grupos de *E. coli* diferenciados de acordo com a virulência e toxinas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC). *E. coli* O157:H7 é classificada dentro do grupo EHEC causando colite hemorrágica devido a produção de citotoxinas (toxinas Shiga) (GOMES et al., 2016).

Assim como *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae* apresentou variação quanto ao perfil de sensibilidade às quitosanas, sendo inibida no poço 3 (1,25 mg/ml) e 2 (2,5 mg/ml) para as quitosanas comerciais SM e SH, respectivamente; e poço 4 (0,625 mg/ml) para nanoquitosana e 0121. Essa bactéria também é uma enterobactéria bacilar Gram-negativa. Diversos estudos vêm demonstrando a

resistência dessa bactéria em relação a diversos antibióticos. Considerado um patógeno oportunista, implica em diferentes infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados ou indivíduos imunocomprometidos. Além disso, é capaz de gerar pneumonia e infecções sanguíneas ou em feridas cirúrgicas (JASIM et al., 2020).

Tabela 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS DIFERENTES QUITOSANAS EXPRESSA EM CIM (mg/ml) DETERMINADA PELO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO E ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA. FONTE: O AUTOR (2022).

Bactéria		Poço da placa e CIM em mg/ml, de cada quitosana				
Espécie	Arranjo celular e Gram	Quitosana SM	Quitosana SH	Nanoquitosana	Quitosana 0121	
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilo Gram negativo	4 (0,625 mg/ml)	4 (0,625 mg/ml)	4 (0,625 mg/ml)	4 (0,625 mg/ml)	
<i>S. aureus</i>	Estafilococos Gram positivo	3 (1,25 mg/ml)	3 (1,25 mg/ml)	2 (2,5 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	
<i>S. typhimurium</i>	Bacilo Gram negativo	2 (2,5 mg/ml)	2 (2,5 mg/ml)	2 (2,5 mg/ml)	2 (2,5 mg/ml)	
<i>B. cereus</i>	Bacilo Gram positivo	5 (0,312 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	
<i>E. coli</i> O157:H7	Bacilo Gram negativo	4 (0,625 mg/ml)	6 (0,156 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	5 (0,312 mg/ml)	
<i>K. pneumoniae</i>	Bacilo Gram negativo	3 (1,25 mg/ml)	2 (2,5 mg/ml)	4 (0,625 mg/ml)	4 (0,625 mg/ml)	

Conforme observou-se na figura 7, a bactéria que necessitou de maior concentração para alcançar a CIM para todas as quitosanas testadas foi *S. Typhimurium* (Gram-negativa) e a mais sensível, ou seja, inibida em menor concentração necessária para CIM foi *B. cereus* (Gram-positiva). Para fins de melhor visualização dos resultados inserimos a figura 8, que mostra a CIM das quitosanas testadas frente a cada bactéria.

Ao se comparar as quatro quitosanas, unindo todas as cepas testadas (Figura 9), não há diferenças ( $p > 0,05$ ).

Considerando-se todas as cepas testadas em seus dois grandes grupos classificatórios: Gram-positivas e Gram-negativas, mesmo esse não sendo um foco do trabalho e sim uma informação complementar que poderá ser explorada em outros estudos futuros, notou-se que não houve a princípio diferença na sensibilidade destas cepas frente aos quatro tipos de quitosanas testadas (Figura 10). Apesar desse resultado ser apenas um resultado mais comprobatório do que comprovatório, isso se torna importante do ponto de vista do mecanismo de ação possível para ação das quitosanas. Caso ocorresse alguma diferença, poder-se-ia discutir com outros autores algum tipo de ligação ou interação intermolecular do tipo fraca entre a quitosana e determinados componentes das paredes celulares desses dois grupos.

Há vários estudos de revisão que analisam a atividade antibacteriana da quitosana e o modo de ação contra as bactérias (KONG et al., 2010; KUMIRSKA et al., 2011; WU et al., 2016; LI e ZHUANG, 2020; QIN e GUO, 2020;). Como reportado por Li e Zhuang (2020), há muitos fatores que afetam as propriedades antibacterianas da quitosana, como o tipo de bactéria, o peso molecular, o pH e a concentração da quitosana, fonte da quitosana, temperatura do ensaio, fase do crescimento microbiano, interação com outras substâncias, modificações químicas, etc, tornando difícil compreender o exato mecanismo antibacteriano desse polímero.

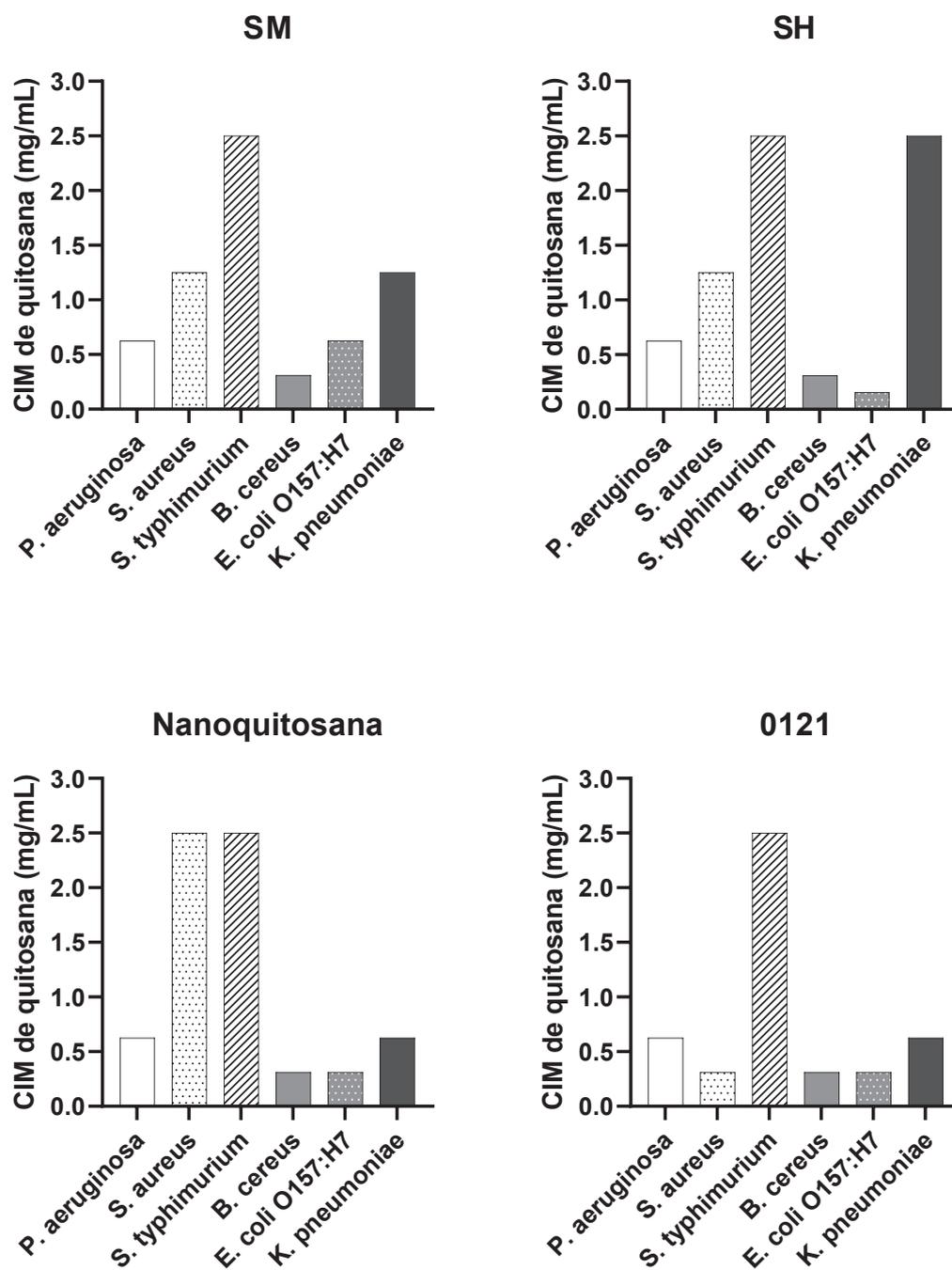


Figura 7– CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) DE SEIS TIPOS DE BACTÉRIAS TESTADAS. FONTE: O AUTOR (2022).

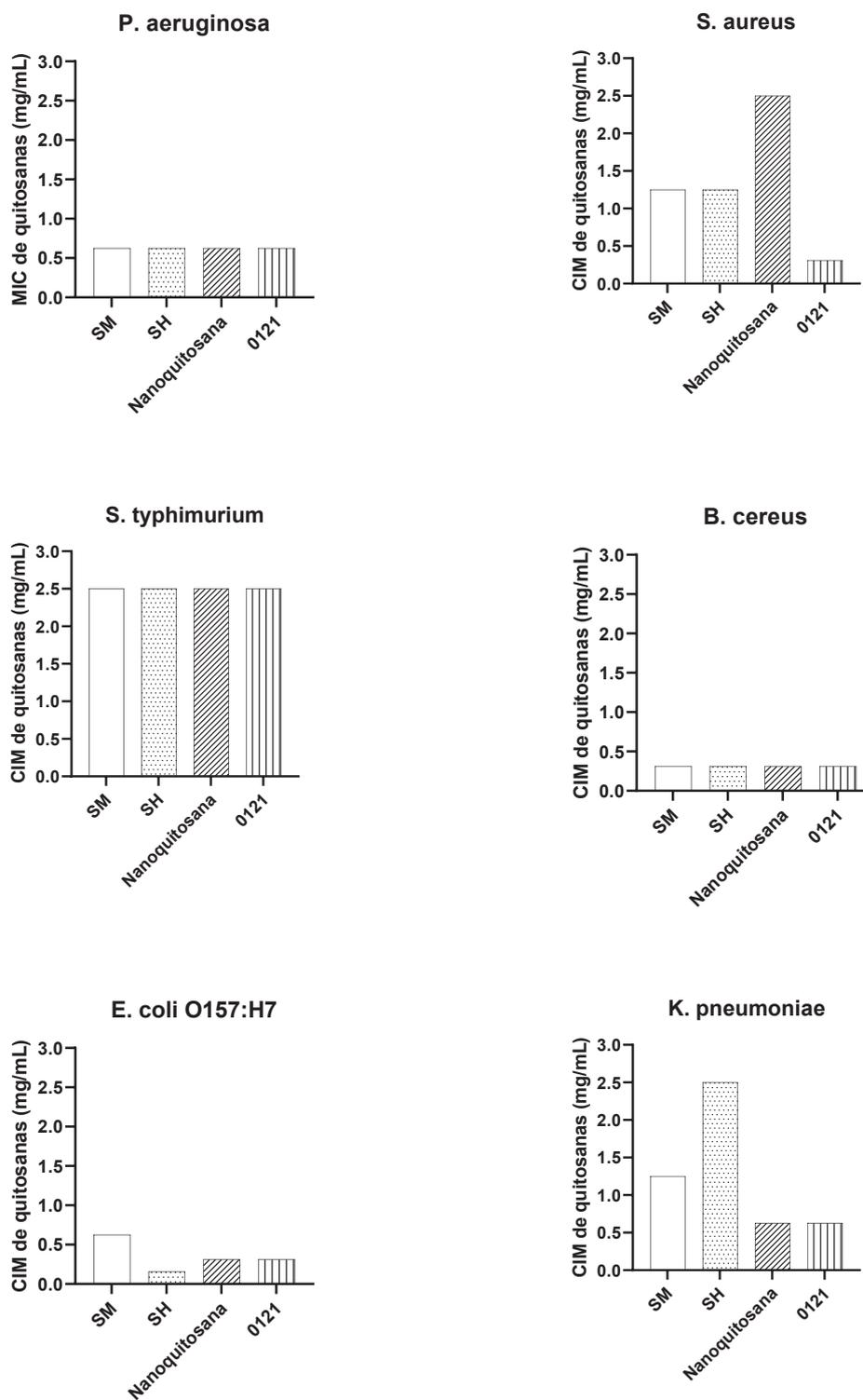


Figura 8 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) PARA CADA BACTÉRIA TESTADA. FONTE: O AUTOR (2022).

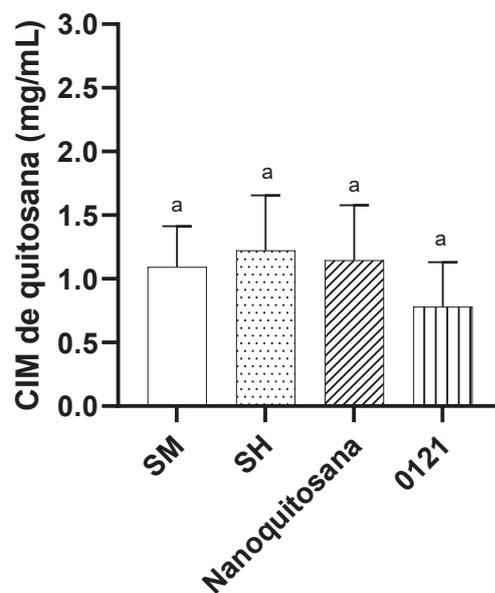


Figura 9 - COMPARATIVO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL). Letras iguais indicam que não houve diferença entre os grupos ( $p > 0.05$ ). FONTE: O AUTOR (2022).

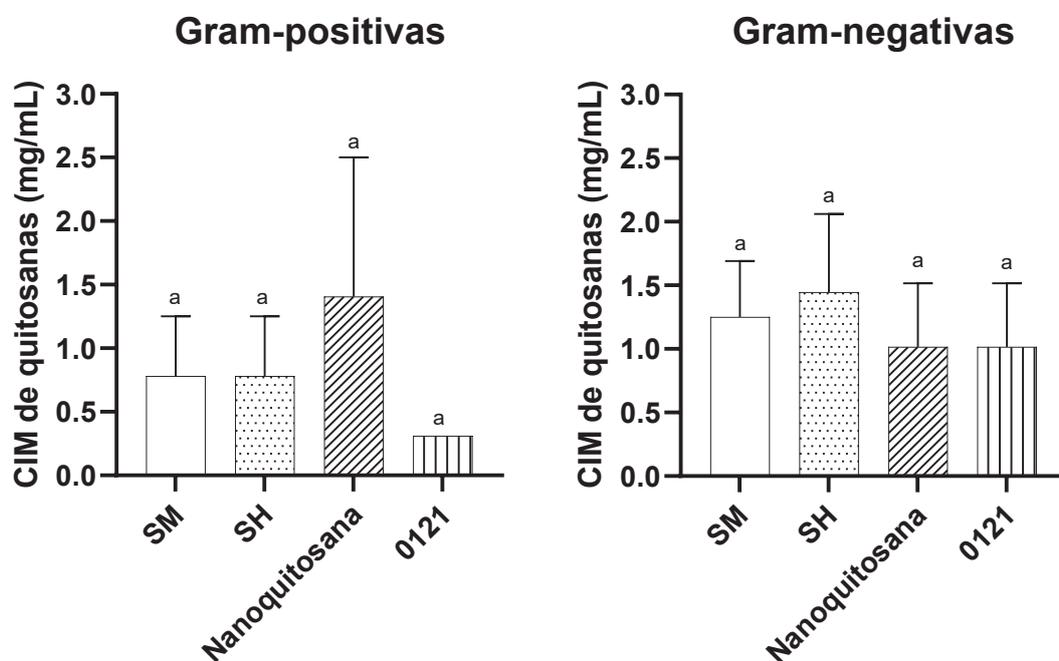


Figura 10 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE QUITOSANAS (mg/mL) ENTRE BACTÉRIAS CLASSIFICADAS COMO GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS. FONTE: O AUTOR (2022).

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas exibem diferenças na estrutura da parede celular de suas células. As Gram-positivas apresentam uma camada mais espessa de peptidoglicanos e as Gram-negativas apresentam uma camada mais delgada e enriquecida em lipopolissacarídeo (LPS) (ROHDE, 2019; PASQUINA-LEMONCHE et al., 2020). Segundo Ke e colaboradores (2021), diferenças na estrutura da superfície desses tipos de bactérias também podem levar a suscetibilidades distintas à quitosana.

Porém apesar de não ter sido testado um número igual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o resultado não indicou uma tendência das diferentes quitosanas testadas em inibir um determinado grupo de bactérias.

Analisando cada bactéria isoladamente, em relação ao efeito das quitosanas aqui testadas sobre *B. cereus*, os resultados são similares aos encontrados por Tsai e colaboradores (2006), que avaliaram o efeito antimicrobiano de uma nanoquitosana própria, de baixa massa molecular, sobre esta bactéria. A partir de seus resultados, os pesquisadores propuseram uma aplicação biotecnológica para preservação de arroz cozido, já que um dos maiores problemas de contaminação desse alimento é a resistência dessa bactéria ao cozimento.

Para *K. pneumoniae*, bactéria Gram-negativa, as menores CIMs foram observadas para as quitosanas produzidas pelo LABMATER, tanto a 0121 quanto a nanoquitosana, sugerindo que são mais eficientes em inibir o crescimento dessa enterobactéria. A quitosana comercial SH apresentou efeito inibitório sobre essa bactéria em concentrações mais altas, comparado com as outras formulações.

Para *E. coli* O157:H7, também uma bactéria Gram-negativa, todas as quitosanas apresentaram CIMs próximas, entretanto a que apresentou a menor CIM foi a quitosana comercial SH; e a que apresentou a maior CIM foi a quitosana comercial SM.

*P. aeruginosa* apresentou o mesmo perfil de sensibilidade às quatro quitosanas. No entanto, podemos considerar que apesar da conhecida patogenicidade, virulência e resistência dessa espécie de bactéria, a

concentração de 0,625 mg/ml das quitosanas é considerada satisfatória em inibir esse microrganismo.

As quitosanas comerciais SM e SH apresentaram o mesmo efeito na inibição de *S. aureus*. Essa bactéria apresenta uma espessa camada de peptidoglicano, sendo uma bactéria Gram-positiva. Apesar de nesse trabalho ter utilizado-se uma cepa padrão, é interessante também que novas pesquisas sejam conduzidas com diferentes isolados, para testar o efeito das quitosanas sobre MRSA's (*Staphylococcus aureus* Metilicina Resistente), que são cepas que apresentam resistência a todos os antibióticos da classe dos beta-lactâmicos.

Goy et al. (2009) relatam que a eficácia bacteriana da quitosana em bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas é controversa. Alguns autores afirmaram que a quitosana geralmente apresenta efeitos mais pronunciados contra bactérias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaris*, etc.) do que para bactérias Gram-negativas como *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, etc.) (LIU et al., 2006; CHIU et al., 2007; MENG et al., 2012).

No presente trabalho foi possível observar que as quitosanas Nano e 0121 apresentaram um perfil similar na atividade antimicrobiana, para todas as bactérias, exceto para *S. aureus*. Quanto às quitosanas comerciais, a de menor PM (SM) foi mais eficiente como agente bactericida. No entanto, é necessário que um número maior de bactérias seja incluído para comprovar esses efeitos.

Em relação à influência do PM da quitosana sobre suas propriedades antibacterianas, até o presente momento não há relatos precisos sobre essa relação e as conclusões são contraditórias (LI e ZHUANG, 2020).

No estudo conduzido por Fernandez-Saiz et al. (2009), ao medir o desempenho bactericida de filmes de acetato de quitosônio contra o crescimento de *Salmonella* spp. foi verificado que bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, foram mais sensíveis à quitosana, devido à sua parede celular ser composta por uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos teóicos.

A estrutura do ácido teicóico é altamente carregada pelo grupo fosfato com carga negativa, que pode estabelecer uma interação eletrostática com

compostos antibacterianos catiônicos, como o sal de quitosana, levando a bactérias Gram-positivas serem mais sensíveis do que bactérias Gram-negativas.

Comparando os resultados obtidos do efeito das quitosanas SM e SH, houve maior inibição de *S. aureus* (Gram-positiva) que *S. Typhimurium* (Gram-negativa). Ao contrário, um outro estudo revelou que bactérias Gram-negativas parecem ser mais sensíveis à quitosana do que as bactérias Gram-positivas (DEVLIEGHERE et al., 2004).

### *5.1.3. Verificação dos resultados de disco difusão em relação as cepas de estudo.*

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para o teste de disco-difusão. Pode-se observar que todas as quitosanas tiveram efeito inibitório (formação de halos), com diâmetros variados conforme a quitosana aplicada nos discos. Foram feitos plaqueamentos de cada espécie de bactéria para cada quitosana.

Os diâmetros foram comparados usando Two-Way ANOVA, seguido de Tukey's multiple comparisons test entre as quitosanas testadas para cada bactéria utilizada. Houve diferenças entre as quitosanas para cada bactéria ( $p < 0.001$ ) (Figura 11).

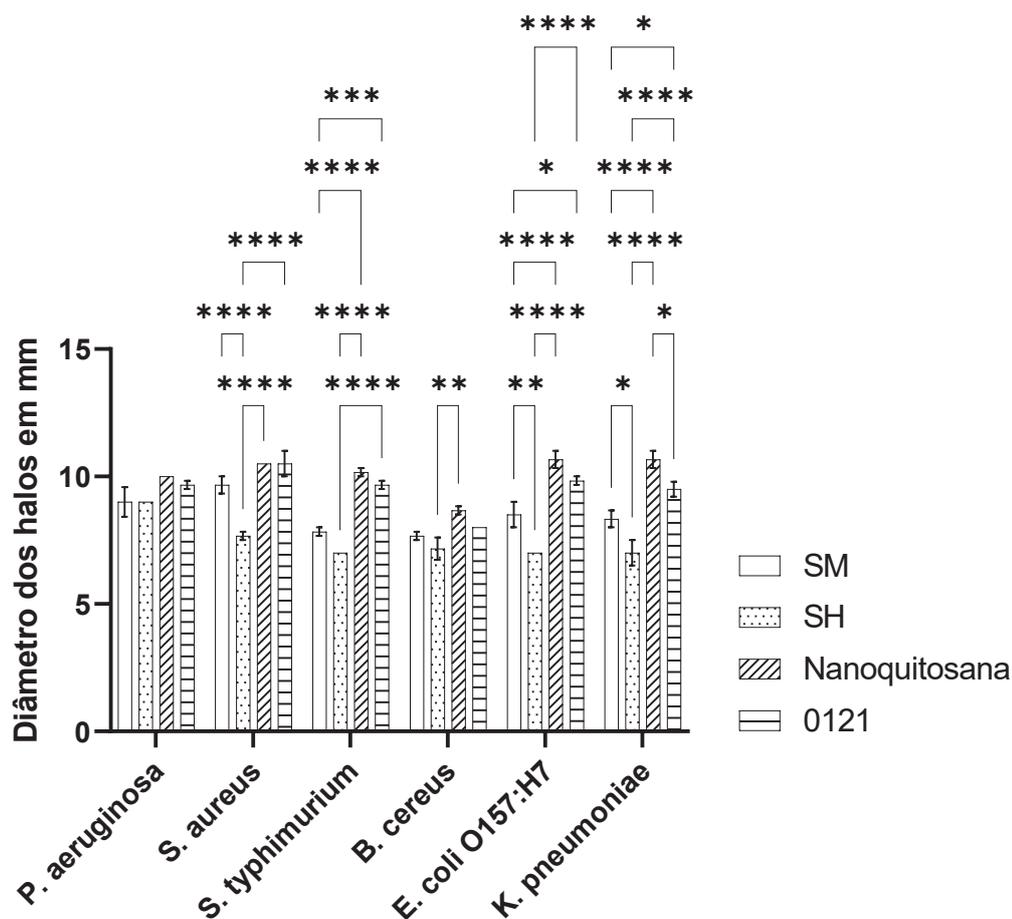


Figura 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS QUITOSANAS TESTADAS PARA CADA BACTÉRIA UTILIZADA. Os asteriscos mostram as diferenças ( $p < 0,001$ ; Two-Way ANOVA, SEGUIDO DE Tukey's Multiple Comparisons test). FONTE: O AUTOR (2022).

A figura 12 mostra a formação de halos nas regiões onde foram inseridos os discos com as quitosanas testadas. Estes halos foram medidos de ponta a ponta do diâmetro incluso o do disco com isso gerou-se as médias de tamanhos dos campos de inibição. Pode-se entender assim que existe o efeito esperado de controle antibacteriano por parte dessa molécula.

Tabela 3 - DIÂMETRO DOS HALOS EM MM PARA CADA QUITOSANA EM RELAÇÃO A CADA BACTÉRIA. FONTE: O AUTOR (2022).

Espécies	SM (mm)			SH (mm)			NANO (mm)			0121 (mm)		
	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 1	Disco 2	Disco 3	Disco 1	Disco 2	Disco 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	8	9	9	9	9	10	10	10	9,5	9,5	10
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	9,5	8	8	7	7	7	10	11	11	9,5	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	9	8	7,5	7,5	10,5	10,5	10,5	10	10	11,5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	8	8	7,5	7	7	7	10	10	10,5	10	9,5	9,5
<i>Bacillus cereus</i>	8	7,5	7,5	6,5	8	7	9	8,5	8,5	8	8	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	8	8	7,5	7,5	6	11	10	11	10	9,5	9

Com os resultados dos halos obtidos no disco difusão na qual a concentração foi a mesma da solução estoque de 10 mg/mL não sendo avaliada em função da CIM, pode-se observar que em média os maiores valores de halos (mm), foram vistos em quitosanas de peso molecular menor no caso a nanoquitosana e quitosana 0121, podendo-se avaliar em testes futuros diferentes fatores como pH, temperatura. L Jiang et al (2012), obtiveram resultados semelhantes com quitosanas de peso molecular entre 43 kDa e 67 kDa, para grupos de bactérias gram-positivas e gram-negativas, porém em seu estudo essas eram as CIM e foram testadas um grupo amostral “n” maior. Para efeito de comparação as quitosanas 0121 130kDa e nanoquitosana 13 kDa conforme o catálogo repassado pelos pesquisadores do LABMATER.

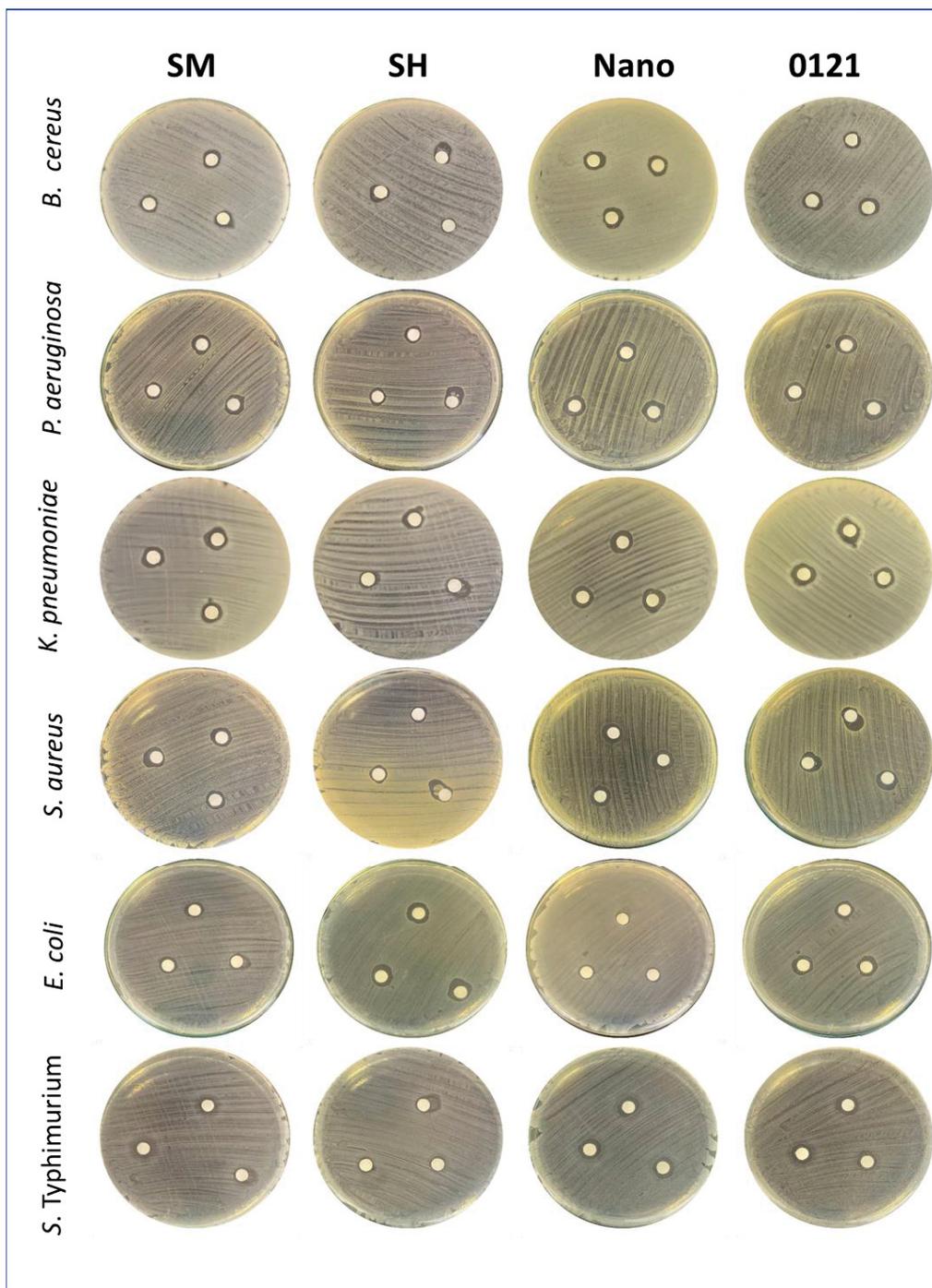


Figura 12 - IMAGEM OBTIDA DO PLAQUEAMENTO DOS DISCOS DIFUSÃO PARA CADA QUITOSANA TESTADA. FONTE: O AUTOR (2022).

#### 5.1.4. Ensaio das quitosanas sobre a formação de biofilme bacteriano

O ensaio de biofilme foi realizado para todas as bactérias testadas nesse trabalho, frente às diferentes concentrações das quatro quitosanas. No entanto, o resultado não foi conclusivo, sendo interrompido antes da adição de etanol e leitura em leitor de ELISA. Observou-se que, após a adição do corante cristal violeta, houve um aumento da coloração nos primeiros poços contendo as quitosanas (poços 2 a 4), quando em maiores concentrações, e a bactéria em estudo, porém o poço contendo apenas a quitosana não apresentou essa característica, poço 1. A figura 13 mostra o resultado para o ensaio com *E. coli*, com a quitosana SH, após coloração com cristal violeta. Apesar dos resultados terem sido variáveis entre as diferentes bactérias e quitosanas, foi possível presumir que a técnica de cristal violeta não é adequada para a análise de biofilme bacteriano utilizando quitosanas como agente inibidor, pois não discrimina entre bactérias vivas e mortas.

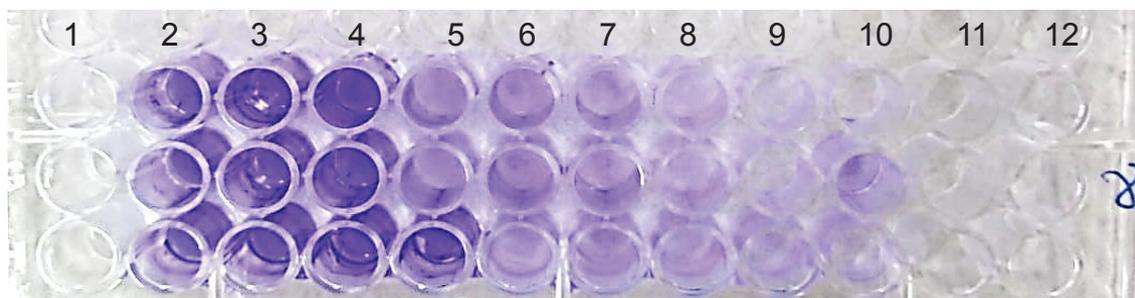


Figura 13 - POÇOS DO ENSAIO DE BIOFILME CORADOS COM CRISTAL VIOLETA, NA SEGUINTE CONFORMAÇÃO: COLUNA 1 – CONTROLE NEGATIVO: QUITOSANA SH + BHI (1:1); COLUNAS 2 A 10 – DILUIÇÃO SERIADA DA QUITOSANA + SUSPENSÃO DE *E. coli*, EM QUE COLUNA 2 POSSUI 1,25 mg/ml E A COLUNA 10 POSSUI 0,009 mg/ml; COLUNA 11 - CONTROLE POSITIVO COM SUSPENSÃO DA BACTÉRIA; COLUNA 12 – CONTROLE NEGATIVO DO CALDO BHI.

Para verificar se as células possivelmente aderidas estavam vivas ou mortas, após observação do aumento da coloração dos poços com as maiores concentrações de quitosana, o conteúdo do fundo do poço 1 (somente quitosana), poço 3 (concentração de 1,25 mg/ml da quitosana), poço 10 (0,009 mg/ml da quitosana) e poço 11 (somente bactéria), para *K. pneumoniae* e quitosanas Nano e 0121, foi ressuspensionado com solução salina (NaCl 0,85%) e o material também foi analisado microscopicamente, após coloração de Gram.

Após ressuspensão com solução salina, foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  e 100  $\mu$ l das suspensões foi semeado, com alça de Drigalski, na superfície de ágar MH. As placas foram observadas após incubação por 24 horas a 37°C (Figura 14).

A coloração de Gram confirmou que para *K. pneumoniae* foram observadas algumas células bacterianas no material aderido, no ensaio para a quitosana 0121, no poço 3, indicando a princípio que essa quitosana poderia ter contribuído para adesão das células e esse efeito foi diminuído em concentrações menores. Porém não foi possível concluir se eram células vivas ou mortas. Para isso foi realizado o plaqueamento do material em ágar MH, e foi possível observar o aparecimento de poucas colônias (de seis a sete), tanto no material referente ao poço 3 quanto poço 10, indicando que as células aderidas nos poços com maiores concentrações de quitosana eram inviáveis e que provavelmente a quitosana tenha contribuído para a agregação das células no fundo do poço, durante seu efeito antibacteriano. Zhang, A. et al (2013), em estudo semelhante no qual utilizou-se um conjugado de quitosana e estreptomicina na qual foram testados grupos de bactérias gram-positivas tal como *S.aureus*, tiveram resultados de maior infiltração do agente (estreptomicina) em relação ao mesmo sem estar conjugado, um dos possíveis mecanismos é a natureza policatiónica que serviu como um cavalo de tróia para os biofilmes testados.

Resultado diferente foi observado para a Nanoquitosana. O aumento no número de colônias de *K. pneumoniae* no poço 3 indica que essa quitosana não foi eficiente para inibição dessa bactéria.

O mesmo resultado foi observado para *S. aureus*, crescimento na presença da concentração inibitória mínima para a Nanoquitosana e inibição total do crescimento com a 0121 (dados não mostrados).

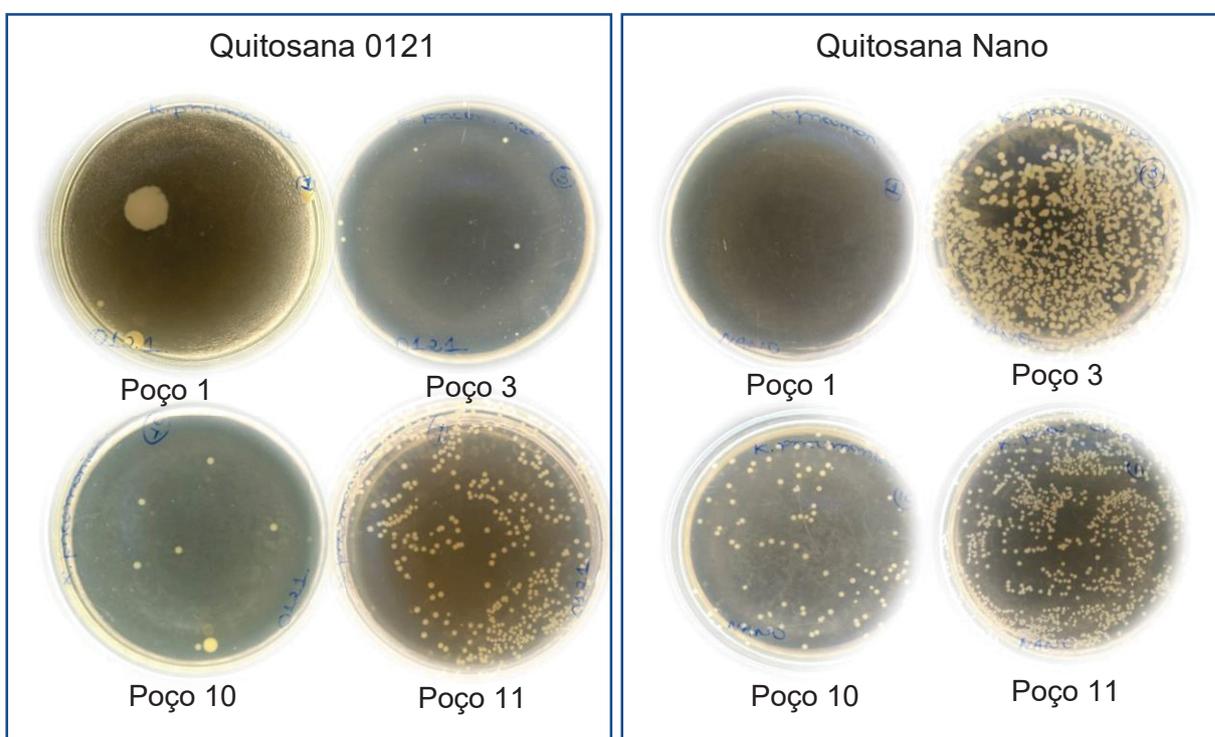


Figura 14 - PLAQUEAMENTO, EM ÁGAR MH, DO MATERIAL ADERIDO APÓS ENSAIO DE BIOFILME DE *K. pneumoniae*, EM DIFERENTES POÇOS DO ENSAIO, COM AS QUITOSANAS 0121 E NANO. O CRESCIMENTO DA BACTÉRIA PODE SER OBSERVADO PELO APARECIMENTO DAS COLÔNIAS.

#### 5.1.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *K. pneumoniae* e *S. aureus*, após contato com as quitosanas Nano e 0121

Para tentar observar o mecanismo de interação das moléculas das quitosanas produzidas pelo LABMATER, a nanoquitosana e a 0121, foram feitas

uma série de ensaios de MEV, com isso esperou-se observar alteração nas estruturas morfológicas e/ou rompimento de membranas seja por mecanismo de interação eletrostática. Silva et al (2006), citam que um dos prováveis mecanismos de ação de quitosana, seria a interação de grupos protonados ( $\text{NH}^{3+}$ ) da molécula em contato com grupos aniônicos das membranas de microorganismos.

Para a análise do efeito das quitosanas Nano e 0121, foram analisadas uma bactéria Gram positiva (*S. aureus*), e uma Gram negativa (*K. pneumoniae*). Essas bactérias também foram escolhidas para comparar com os resultados de plaqueamento, após o ensaio de biofilme. Para análise, as bactérias foram escolhidas por sua capacidade apreciada de forma biofilme e aderir, que foi utilizado como suporte para as células a serem analisadas por MEV.

A figura 15 mostra as células de *S. aureus*, sem a presença das quitosanas, com arranjo de cocos em cachos, característico da espécie.

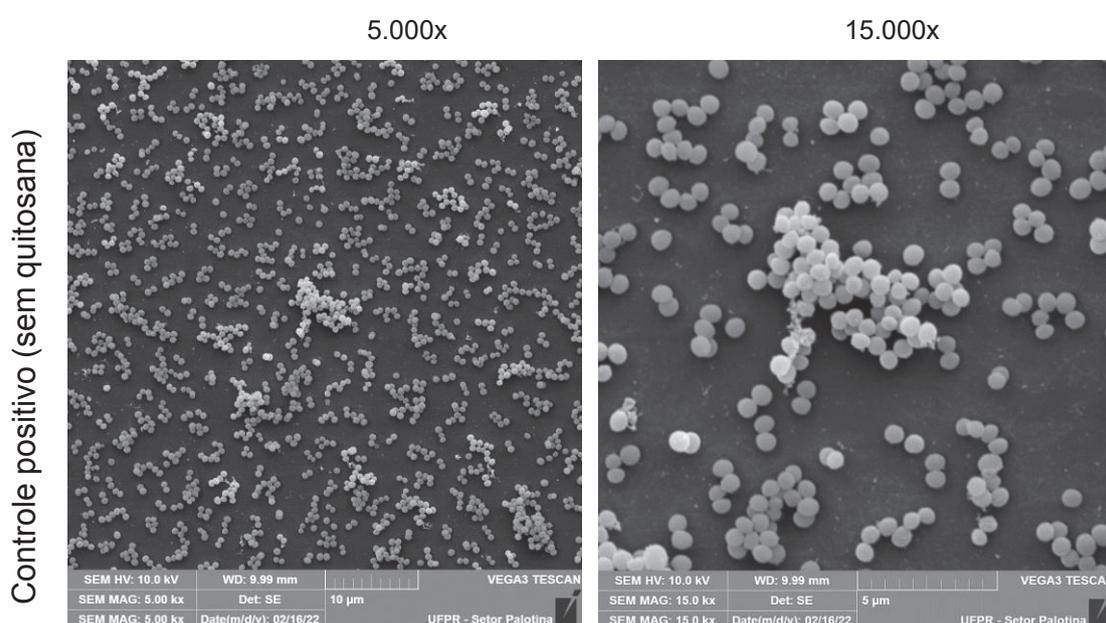


Figura 15 - MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *S. aureus* SEM TRATAMENTO COM QUITOSANAS. AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X.

A figura 16 apresenta as imagens obtidas do material aderido às lamínulas circulares, de *S. aureus* na presença das quitosanas Nano e 0121, na

concentração inibitória mínima (CIM: 2,5 mg/ml) e na concentração intermediária entre a CIM e sub-CIM (1,88 mg/ml) da Nanoquitosana, tendo como base os valores observados com o ensaio de microdiluição em caldo. Nessa última concentração, esperava-se ver um leve crescimento pois em teoria a concentração de quitosana estaria numa concentração intermediária de inibição.

No caso da nanoquitosana observa-se que a forma predominante da molécula são arranjos de grumos dismórficos de alta concentração, isso pode ser devido a estrutura molecular da mesma que são de baixíssimo PM. Já para a 0121 também se observa resultados semelhantes, porém muda o arranjo da molécula ela tende a ser mais espaçada e em forma mais filamentosa densa, com o resultado semelhante em relação as células da bactéria.

Apesar da dificuldade em diferenciar estruturas em cocos de *S. aureus* na matriz de quitosanas, que apresentam também unidades esféricas e formação de estruturas polimórficas, é possível observar presença abundante de *S. aureus* na presença da CIM da Nanoquitosana (setas), no aumento de 15Kx, em comparação com a quitosana 0121. O ensaio foi realizado em duplicada e uma das amostras contendo a CIM de ambas quitosanas teve o material aderido à lamínula raspado utilizando 100 µl de PBS 0,1 M pH 7,2 e semeado em placas com MH. Houve crescimento intenso de células na placa correspondente à CIM da Nanoquitosana e nenhum crescimento na placa CIM da 0121 (dados não mostrados).

A figura 17 apresenta as imagens obtidas do material aderido às lamínulas circulares, de *K. pneumoniae* na presença das quitosanas Nano e 0121, na concentração inibitória mínima (CIM: 2,5 mg/ml) e na concentração intermediária entre a CIM e sub-CIM (1,88 mg/ml) da Nanoquitosana, tendo como base os valores observados com o ensaio de microdiluição em caldo.

*K. pneumoniae* não apresentou aderência nas lamínulas e não foi possível obter imagens do controle negativo (sem as quitosanas). Porém, na presença tanto da Nanoquitosana quanto da 0121, na concentração de 0,47 mg/ml (intermediária entre a CIM e a sub-CIM) verificada no ensaio de microdiluição em caldo foi possível observar bacilos, característicos da espécie, porém apresentando alterações na morfologia (Figura 17 - destaque). Houve poucas células o que pode ser efeito de aderência, ou seja, as células podem ter se

ligado por interações com ambas as moléculas de nanoquitosana e 0121 por interações eletrostáticas, porém podendo ter perdido sua viabilidade. Zheng e Zhu (2003) apresentam que em bactérias gram-positivas a atividade antibacteriana aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, e que no caso de gram-negativas quanto menor a massa molecular maior a atividade sobre o microorganismo. Na CIM das duas quitosanas não foram observadas, na MEV, células aparentes, indicando atividade bactericida dessa quitosana. Total inibição do crescimento de *K. pneumoniae* foi observado, após plaqueamento em placas com ágar MH, do material aderido às lamínulas, utilizando a CIM das duas quitosanas.

Observa-se de forma nítida que as quitosanas tomaram conta da imagem e com isso também tem os resultados esperado em relação a inibição da célula pelos possíveis mecanismos citados anteriormente de interação eletrostática. Porém o mecanismo de ação da quitosana frente a microrganismos não está completamente elucidado, contudo, sabe-se que sua ação pode é influenciada por fatores intrínsecos como grau de desacetilação e extrínsecos tais como: nutrientes, substratos químicos e condições do meio ambiente (COSTA SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Como esses estudos estão em fases iniciais precisa-se aumentar a gama modelos de células e concentrações para se poder ter resultados mais amplos para outros grupos.

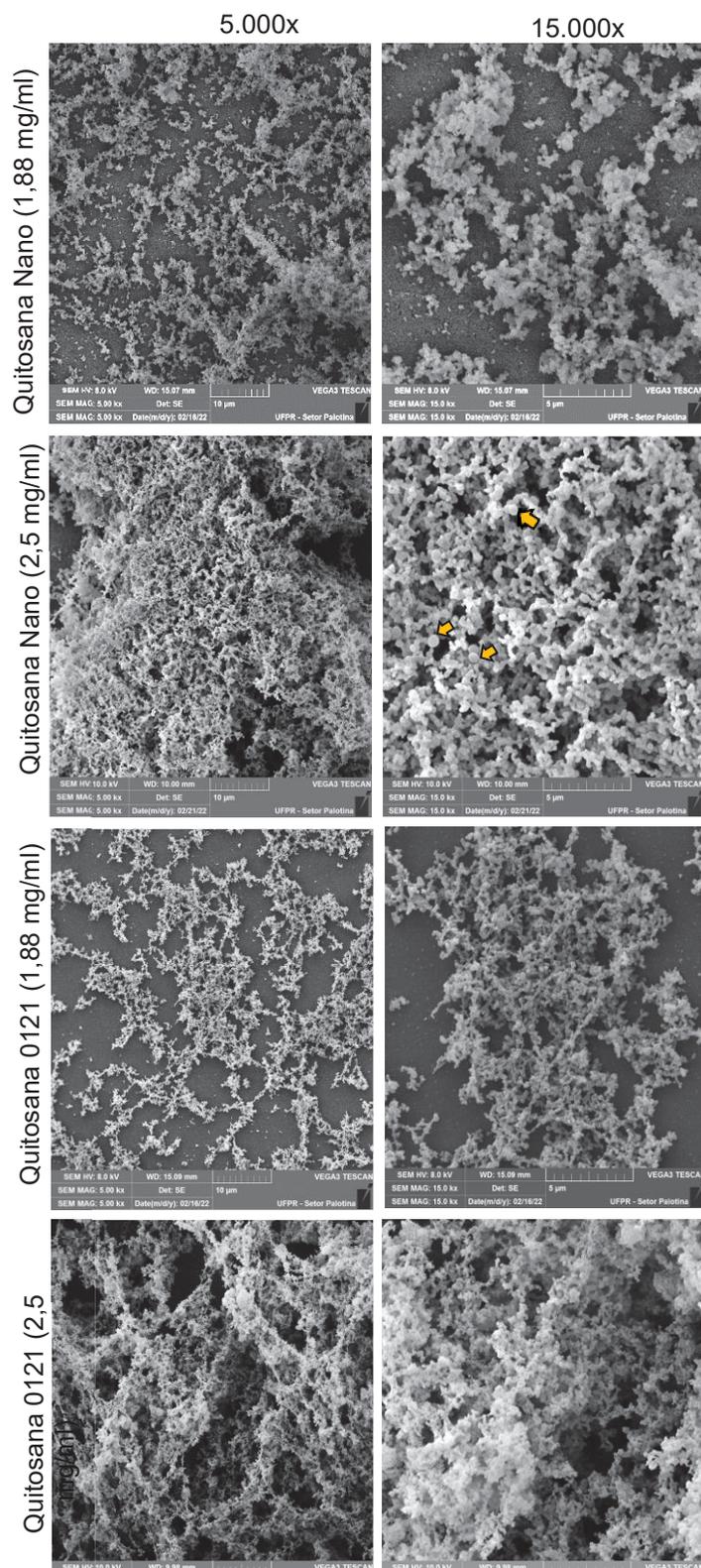


Figura 16- MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *S. aureus* NA PRESENÇA DAS QUITOSANAS NANO E 0121, NA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM: 2,5 MG/ML) E NA CONCENTRAÇÃO INTERMEDIÁRIA ENTRE A CIM E SUB-CIM (1,88 MG/ML). AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X

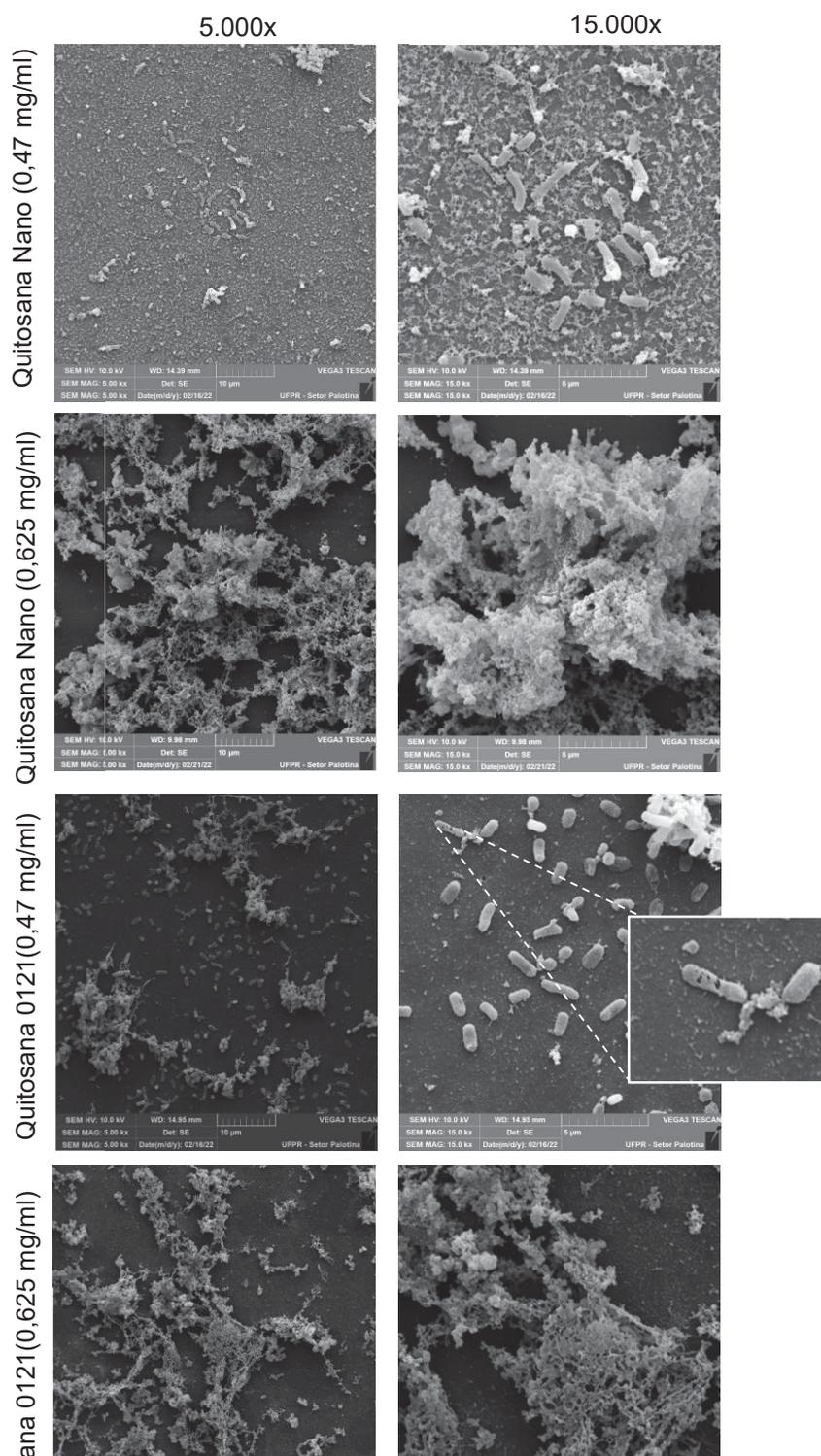


Figura 17- MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DE *K. pneumoniae* NA PRESENÇA DAS QUITOSANAS NANO E 0121, NA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM: 0,625 MG/ML) E NA CONCENTRAÇÃO INTERMEDIÁRIA ENTRE A CIM E SUB-CIM (0,47 MG/ML). AUMENTOS DE 5.000 E 15.000X.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.**

Com o término das análises pode-se concluir que existe sim mecanismos de inibição de crescimento e/ou bactericida para as moléculas alvo do estudo trabalho testou-se a atividade antibacteriana *in vitro* de duas nanoquitosanas obtidas de camarão, e duas quitosanas comerciais frente as cepas disponíveis para o estudo com isso atingindo os objetivos propostos inicialmente.

Como trabalhos futuros, pretende-se testar outros parâmetros como pH, outros microrganismos como leveduras de interesse médico e realizar microscopia eletrônica de varredura para verificar o efeito das quitosanas sobre a morfologia das bactérias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBERG, A. L.; SØRLIE, M.; VÅRUM, K. M.; EIJSINK, V. G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1482-517, 2010.

ALMEIDA, L.; RODRIGUES, W. L.; AGUIAR, N. V.; SILVA, R. S.; MOREIRA, C. K. P. Extração de quitina, síntese e caracterização de quitosana obtida através de resíduos de camarão (*Macrobrachium amazonicum*). **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.3, p. 2272-2278, 2015.

ALVES, H. J.; FURMAN, M.; KUGELMEIER, C. L.; OLIVEIRA, C. R.; BACH, V. R.; LUPATINI, K. N.; NEVES, A. C.; ARANTES, M. K. Effect of shrimp shells milling on the molar mass of chitosan. **Polímeros**, v. 27, n. 1, p. 41-47, 2017.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016.

BENHABILES, M., ABDI, N., DROUCHE, N., LOUNICI, H., PAUSS, A., GOOSEN, M., MAMERI, N. Protein recovery by ultrafiltration during isolation of chitin from shrimp shells *Parapenaeus longirostris*. **Food Hydrocolloids**, v. 32 n. 1, p. 28–34, 213.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, 2020.

CASADIDIO, C.; PEREGRINA, D. V.; GIGLIOBIANCO, M. R.; DENG, S.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science. **Marine Drugs**, v. 17, 369, 2019.

CHEN, C. P.; HSIEH, C. M.; TSAI, T.; YANG, J. C.; CHEN, C. T. Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue O for antimicrobial photodynamic inactivation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 20859–20872, 2015.

CHIU, H. T.; CHEN, R. L.; WU, P. Y.; CHIANG, T.Y.; CHEN, S. C. A study on the effects of the degree of deacetylation of chitosan films on physical and antibacterial properties. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 46, n. 12, p. 1121-1127, 2007.

CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, **Approved Standard - M7-A6**, ed 6, v. 23, 2003.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible Antimicrobial Films Based on Chitosan Matrix. **Journal of Food Science**, v. 67, p.1162-1169, 2002.

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

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703-714, 2004.

DING, C.; YANG, Z.; WANG, J.; LIU, X.; CAO, Y.; PAN, Y.; HAN, L.; ZHAN, S. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 49, p. 119–128, 2016.

ERASMUS, V. N.; KADHILA, KADHILA, T.; GABRIEL, N. N.; THYBERG, K. L.; ILUNGY, S.; MACHADO, T. Assessment and quantification of Namibian seafood waste production. **Ocean & Coastal Management**, v. 199, 2021.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P.; SOLER, C.; LAGARON, J. M.; OCIO, M. J. Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 287–294, 2010.

FIAMINGO, A. Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de caroximetilquitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em

engenharia de tecidos. **Tese de doutorado em Ciências (Físico-Química)** do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

FIRDOUS, K.; CHAKRABORTY, S. A Review: Naturally Available Sources of Chitosan And Analysis of Chitosan Derivatives for Its Antimicrobial Activity. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 15773-15776, 2017.

GASPARRINI, L. J. Efeito da massa molar da quitosana em membranas utilizadas em células a combustível. **Dissertação de mestrado** em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais, Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná, 2018.

GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; FALCÃO, J.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C.; MARTINEZ, M. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Medical Microbiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p.3-30, 2016.

GOPALAKANNAN, A., JASMINE, G.I., SHANMUGAM, S., SUGUMAR, G. Application of proteolytic enzyme, papain for the production of chitin and chitosan from shrimp waste. **Journal of the Marine Biological Association**, v. 42, p. 167–172, 2000.

GOY, R. C.; BRITTO, D. de; ASSIS, O. B. G. de. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, 2009.

GUIMARÃES, P. S. Tratamento de Águas Residuárias Oriundas da Purificação do Biodiesel por Coagulação Empregando Sulfato de Alumínio e Quitosana: Avaliação Preliminar. **Dissertação de Mestrado** em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-150/13, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 77 p. 2013.

HADWIGER, L. A.; KENDRA, D. G.; FRISTENSKY, B. W. & WAGONER, W. Chitosan both activated genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi, in: **“Chitin in nature and technology”**. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. & Gooday, G. W. (Eds.), Plenum, New York (1981).

HANPANICH, O.; WONGKONGKATEP, P.; PONGTHARANGKUL, T.; WONGKONGKATEP, J. Turning hydrophilic bacteria into biorenewable hydrophobic material with potential antimicrobial activity via interaction with chitosan. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 97–102, 2017.

JASIM, S. T.; SAMI, A. Article Review: *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, virulence factors and treatment. **Journal of University of Anbar for Pure Science**, v. 14, n. 2, p. 5–10, 2020.

KANDILE, N.; ZAKY, H.; MOHAMED, M.; NASR, A.; ALI, Y. Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Shells. **Open Journal of Organic Polymer Materials**, v. 8, p. 33-42, 2018.

KE, C. L.; DENG, F. S.; CHUANG, C. Y.; LIN, C. H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. **Polymers (Basel)**, v. 13, n. 6, p. 904, 2021.

KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, n. 62, p. 357–368, 2005

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

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials-influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, v. 3 n. 4, p. 1875-1901, 2011.

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

LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 313-319, 2004.

LIU, N.; CHEN, X. G.; PARK, H. J.; LIU, C. G.; LIU, C. S.; MENG, X. H.; YUL, J. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 60-65, 2006.

LO, W. H.; DENG, F. S.; CHANG, C. J.; LIN, C.H. Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains. **Molecules**, v. 25, p. 5114, 2020.

MÁRQUEZ, I. G.; AKUAKU, J.; CRUZ, I.; CHEETHAM, J.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 108-112, 2013.

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 Biological Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 918-924, 2012.

MONTARELO, D. P.; VIEDMA, E.; LARROSA, N.; GONZÁLEZ, C. G.; GOPEGUI, E. R.; GALLEGRO, I. M.; JUAN, R. S.; HIDALGO, N. F.; ALMIRANTE, B.; CHAVES, F. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia: association of molecular factors with the source of infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. **Marine Drugs**, v. 8, p. 292–312, 2008.

PAKIZEH, M.; MORADI, A.; GHASSEMI, T. Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. **European Polymer Journal**, v. 159, 2021.

PAPINEAU, A. M.; HOOVER, D. G.; KNORR, D.; FARKAS, D. F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v. 5, p. 45-57, 1991.

PARK, S. C.; NAH, J. W.; PARK, Y. pH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. **Macromolecular Research**, v. 19, n. 8, p. 853-860, 2011.

PASQUINA-LEMONCHE, L.; BURNS, J.; TURNER, R.D.; KUMAR, S.; TANK, R.; MULLIN, N.; WILSON, J.S.; CHAKRABARTI, B.; BULLOUGH, P. A.; FOSTER, S. J.; et al. The architecture of the gram-positive bacterial cell wall. **Nature**, v. 582, p. 294–297, 2020.

PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 12–18, 2003.

POLINARSKI, M. A.; BEAL, A. L. B.; SILVA, F. E. B.; WENZEL, J. B.; BURIN, G. R. M.; MUNIZ, G. I. B.; ALVES, H. J. New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan-Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 38, n. 4, 2021.

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

RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A.; SAHL, H. G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p.3764-3773, 2008.

RIVERA AGUAYO, P.; BRUNA LARENAS, T.; ALARCON GODOY, C.; CAYUPE RIVAS, B.; GONZALEZ-CASANOVA, J.; ROJAS-GOMEZ, D.; CARO FUENTES, N. Antimicrobial and antibiofilm capacity of chitosan nanoparticles against wild type strain of *Pseudomonas* sp. isolated from milk of cows diagnosed with bovine mastitis. **Antibiotics**, v. 9, n. 551, 2020.

ROHDE, M. The gram-positive bacterial cell wall. **Microbiology Spectrum**, v. 7, 2019 .

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

SHIH, P. Y.; LIAO, Y. T.; TSENG, Y. K.; DENG, F. S.; LIN, C. H. A potential antifungal effect of chitosan against *Candida albicans* is mediated via the inhibition of SAGA complex component expression and the subsequent alteration of cell surface integrity. **Frontiers in Microbiology**, n. 10, p. 602, 2019.

SILVA, F. E. B.; GASPARRINI, L. J.; CREMONEZ, PAULO ANDRÉ; BURIN, G. R. M.; MACHADO, B.; POLINARSKI, M. A.; ARANTES, M. K.; ALVES, H.J. Chitosan preparations with improved fat-binding capacity. **Journal of Applied Polymer Science**, 50841, 2021.

Silva et al, Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços, Vol. 29, No. 4, 2006.

TIWARI, S.; BHATT, P. Salmonella - A Review on Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Disease. **The Indian Journal of Basic and Applied Research**, v. 2, n. 1, p. 126–128, 2017.

TSAI, G. J.; SU, W. H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 239-243, 1999.

TSAI, G. J.; TSAI, M. T.; LEE, J. M., ZHONG, M. Z. Effects of chitosan and a low-molecular-weight chitosan on *Bacillus cereus* and application in the preservation of cooked rice. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 9, p. 2168-75, 2006.

WEINER, L. M.; WEBB, A. K.; LIMBAGO, B.; DUDECK, M. A.; PATEL, J.; KALLEN, A. J. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 37, p. 1288–1301, 2016.

WU, M.; LONG, Z.; XIAO, H.; DONG, C. Recent research progress on preparation and application of N N, N-trimethyl chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 434, p. 27-32, 2016.

XU, J.; ZHAO, X.; WANG, X.; ZHAO, Z.; DU, Y. Oligochitosan inhibits *Phytophthora capsici* by penetrating the cell membrane and putative binding to intracellular targets. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 2, p. 167-175, 2007.

YADAV, M., GOSWAMI, P., PARITOSH, K.; KUMAR, M.; PAREEK, N.; VIVEKANAND, V. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 8, 2019.

YANG, X.; LAI, Y.; LI, C.; YANG, J.; JIA, M.; SHENG, J. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2 p. 351–360, 2021.

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

ZADINELO, I. V. Avaliação de elemento filtrante à base de quitosana na aquicultura. **Tese de doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal, 2018.

ZHANG, A; MU, H; ZHANG, W; CUI, G; ZHU, J; DUAN, J. Chitosan Coupling Makes Microbial Biofilms Susceptible to Antibiotics. **Scientific Reports**, v.3, p.33-64, 2013; DOI:10.1038/srep03364. Acesso em: 11 de março 2022.

ZHENG, LIAN YING; ZHU, JIANG FENG; Estudo da atividade antimicrobiana da quitosana com diferentes pesos moleculares. **Polímeros de Carboidratos**, v.54; n.4, p. 527-530, 2003; doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.07.009. Acesso em: 12 de março 2022.