



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

MARIA TERESA PEREIRA MARQUES ARAÚJO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA (*DANIO RERIO*) E CINÉTICA DE INIBIÇÃO CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO CLOREXIDINA

**JOÃO PESSOA
2018**

Maria Teresa Pereira Marques Araújo

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*) E
CINÉTICA DE INIBIÇÃO CONTRA *Staphylococcus aureus* DE
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO CLOREXIDINA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba como
requisito para a obtenção do grau de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Drº. Ian Porto Gurgel do Amaral

Co-orientador: Drº. Lúcio Roberto Cançado Castellano

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663a Araujo, Maria Teresa Pereira Marques.

Avaliação da toxicidade em embriões de peixe zebra (Danio rerio) e cinética de inibição contra Staphylococcus aureus de micropartículas de quitosana encapsulando clorexidina / Maria Teresa Pereira Marques Araujo. - João Pessoa, 2018.

43 f. : il.

Orientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

Coorientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.

TCC (Especialização) - UFPB/CBiotec.

1. Microtecnologia. 2. Quitosana. 3. Curva de crescimento. 4. Embriotoxicidade. I. Amaral, Ian Porto Gurgel do. II. Castellano, Lúcio Roberto Cançado. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao primeiro dia do mês de novembro de 2018, às 13:00h, em sessão pública no Auditório da Escola Técnica de Saúde do Centro de Ciências da Saúde deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professor Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Rebeca Tibau Aguiar Dias (PPCEM/CT/UFPB); 2. Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano (ETS/UFPB), a discente **Maria Teresa Pereira Marques Araújo**, matrícula 11412025, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **"Avaliação da toxicidade em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) e cinética de inibição contra *Staphylococcus aureus* de micropartículas de quitosana encapsulando clorexidina"**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Ian Porto Gurgel do Amaral, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Ian Porto Gurgel do Amaral Rebeca Tibau Aguiar Dias
Presidente da Banca Examinadora Avaliador 1

Maria Teresa P.M. Araújo [Assinatura]
Discente Avaliador 2

João Pessoa/PB, 01 de novembro de 2018.

*Dedico este trabalho aos meus pais
por todo incentivo e apoio durante minha jornada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que, pela sua infinita bondade, me guiou e abençoou para que eu pudesse chegar onde estou.

Aos meus pais, Edseuda e Joaci, que nunca mediram esforços para minha formação e educação; a mais valiosa herança que eles me proporcionaram e a qual eu sou imensamente grata. Tudo que eu sou devo a vocês e os honrarei por isto. Os grandes amores da minha vida.

À minha irmã, Maria Eduarda, e ao meu sobrinho, Thomás, que me inspiram a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu noivo, André Igor, por todo apoio, carinho e compreensão durante esta jornada.

Aos amigos da turma, em especial, Camila, Cely, Aline, Filipi e Tarcísio, que nesses 4 anos de curso compartilharam comigo momentos felizes e também difíceis, mas sempre juntos. Vocês sempre me estenderam a mão e aqui estou. Este trabalho também é de vocês.

À Maximize, pelas amizades que cultivei durante os três lindos anos que participei da empresa, em especial, Anna Julyana, Albanísia e Mickael; e por todas as experiências vividas que me fizeram evoluir pessoal- e profissionalmente. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Lúcio, pela oportunidade de ingressar no LACEC e por toda confiança depositada a mim. À toda equipe da ETS, meu muito obrigada.

Ao Professor Ian, por ter abraçado a ideia deste projeto e pela confiança. À equipe do LABOrA, obrigada por todo apoio.

À Rebeca Tibau, que sempre foi muito prestativa e apoiou todos os nossos projetos. Você me fez acreditar que somos capazes de tudo, somos cientistas raiz! Muito obrigada por tudo!

À equipe da EMPASA, em especial, Silvana, Seu Tarcísio e Alisson, que me receberam carinhosamente no estágio e que contribuíram para minha formação profissional.

Às minhas amigas, Taína, Cinthia e Jéssica, que torcem e idealizam meus sonhos junto comigo.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.”

Henry Ford

RESUMO

O desenvolvimento de materiais e dispositivos em escala micrométrica é uma área que vem se destacando no cenário atual, tanto acadêmica quanto industrialmente. Neste âmbito, surgem as micropartículas feitas com polímeros naturais, as quais visam principalmente aplicações biotecnológicas e biomédicas. Embora diversas pesquisas se voltem para a atividade antimicrobiana desses sistemas, usualmente não levam em consideração a liberação prolongada dos mesmos, como também a capacidade de se aglomerar e dispersar que oportunizam o potencial risco de contaminação ambiental. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a cinética de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e a toxicidade em embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) de micropartículas de quitosana encapsulando clorexidina (MP-CS-CLX). Realizou-se a cinética de inibição para avaliar a ação de clorexidina encapsulada sobre o crescimento de *S. aureus* durante 30 horas. Foram realizadas leituras através de densidade óptica (DO) com espectrofotômetro (λ) 600 nm nos tempos de incubação de 0, 4, 6, 8, 20, 24, 27 e 30 h. Os grupos analisados na cinética foram as micropartículas de quitosana com clorexidina (MP-CS-CLX), as micropartículas sem o fármaco (MP-CS) e o fármaco livre (CLX), nas concentrações correspondentes à 2xCIM, CIM e 0,5xCIM. Para verificar a toxicidade das micropartículas em embriões de peixe-zebra foi feito o Teste FET (*Fish Embryo Acute Toxicity*). Os ovos de peixe-zebra recém-fertilizados foram expostos à diferentes concentrações das micropartículas em teste por um período de 96 horas, sendo estas 1,55, 0,77, 0,38, 0,19 e 0,1 x 10⁻² mg/mL. As MP-CS não apresentaram nenhuma ação inibitória contra o microrganismo. As duas maiores concentrações de MP-CS-CLX e CLX inibiram igualmente o crescimento de *S. aureus*. Por outro lado, na menor concentração a CLX encapsulada se mostrou mais eficiente durante mais tempo em comparação com a droga livre, indicando a possível liberação prolongada das micropartículas de quitosana. Com relação à toxicidade em embriões de peixe zebra, dos três grupos analisados, todas as concentrações contendo MP-CS-CLX e CLX tiveram 100% de mortalidade nas primeiras 24h, verificada a coagulação dos embriões. Já nos grupos contendo MP-CS, as concentrações 1,55, 0,77, 0,38x10⁻² mg/mL foram letais em todos os poços, enquanto as placas referentes a 0,19 e 0,1x10⁻² mg/mL não houve mortalidade nas 24h. Entretanto, os embriões apresentaram retardo no desenvolvimento quando comparado ao grupo controle. Em suma, constatou-se que, neste estudo, as MP-CS não apresentaram ação antibacteriana contra *S. aureus*, enquanto as MP-CS-CLX, em sua menor concentração apresentaram ação inibitória por um período de tempo maior quando comparadas com a mesma concentração da CLX livre. E, devido à alta mortalidade dos embriões do peixe-zebra, concluiu-se que as MP-CS-CLX são extremamente tóxicas nas concentrações avaliadas.

Palavras-chave: Microtecnologia; Quitosana; Curva de crescimento; Embriotoxicidade.

ABSTRACT

The development of materials and devices in micrometric scale is an area that has been standing out in the current scenario, both academically and industrially. This present, arise the part of organically organic biotecnological and biomedical. Different studies are focused on an antimicrobial activity of systems, usually do not take into account a prolonged discharge of the same, as well as the ability to agglomerate and disperse what is potentially risk of environmental contamination. Therefore, the study was to evaluate the kinetics of inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* and toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) of chitosan microparticles encapsulating chlorhexidine (MP-CS-CLX). Inhibition kinetics were performed to evaluate an action of chlorhexidine encapsulated on the growth of *S. aureus* for 30 hours. 600 nm were run at the incubation times of 0, 4, 6, 8, 20, 24, 27 and 30 h. The groups in the kinetics were: microparticles of chitosan with chlorhexidine (MP-CS-CLX), as microparticles without the drug (MP-CS) and free drug (CLX), in the units corresponding to $2 \times \text{CIM}$, MIC and $0.5 \times \text{CIM}$. To verify the toxicity of the microparticles in zebrafish embryos the Test FET (Acute Fish Embryo Toxicity) was performed. The newly fertilized zebrafish eggs were exposed to different concentrations of the microparticles under test for a period of 96 hours, these being 1.55, 0.77, 0.38, 0.19 and 0.1×10^{-2} mg/mL. As MP-CS is no inhibitory action against the microorganism. As the higher concentrations of MP-CS-CLX and CLX inhibited the growth of *S. aureus*. On the other hand, the lower encapsulated CLX proved to be more efficient over time compared to a free drug, linking to the prolonged publication of chitosan microparticles. In relation to fish toxicity, the first three groups consortium, all occurrences in MP-CS-CLX and CLX had 100% destruction in 24 hours, verified the coagulation of the embryos. Already in groups containing MP-CS, as the concentrations 1.55, 0.77, 0.38×10^{-2} mg / mL were lethal in all wells, whereas the plates referring to 0.19 and 0.1×10^{-2} mg / mL there was no habit in 24h. However, the embryos or retardation were not developed when they are in control. In short, that study, MP-CS is sound action against antibacterial against *S. aureus*, while MP-CS-CLX, in its smaller intervention to the inhibitory action for a longer period of time when compared to same concentration of free CLX. And, due to the high mortality of the zebrafish embryos, it was concluded as MP-CS-CLX.

Keywords: Microtechnology; Chitosan; Growth curve; Embryotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular da celulose, quitina e quitosana.....	15
Figura 2. Esquema molecular da gelatinização ionotrópica.....	15
Figura 3. Estrutura molecular da clorexidina.....	16
Figura 4. Síntese das micropartículas.....	21
Figura 5. <i>Pellet</i> formado da biomassa de <i>S. aureus</i> em meio BHI após centrifugação.....	23
Figura 6. Armadilha utilizada para coleta de embriões.....	25
Figura 7. Curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> expostas à diferentes concentrações de CLX, CS-CLX e CS. Os dados foram representativos dos resultados dos experimentos em triplicata e expressos como médias \pm desvios-padrão (DP).....	29
Figura 8. Eficiência de inibição dos grupos testados contra <i>S. aureus</i>	30
Figura 9. Embriões de peixe-zebra (A) controle; (B) coagulado [$0,38 \times 10^{-2}$ mg/mL] e (C) retardo no desenvolvimento, após 24h de exposição [$0,19 \times 10^{-2}$ mg/mL].....	31
Figura 10. Embriões do peixe-zebra (A) controle e (B) embrião sem pigmento, após 42h de exposição [$0,19 \times 10^{-2}$ mg/mL].....	32
Figura 11. Porcentagem da mortalidade dos embriões de peixe-zebra expostos à diferentes concentrações.....	33
Figura 12. Peixe-zebra (A) controle e (B) embrião no córion, após 72h [$0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL]..	34
Figura 13. Peixe-zebra (A) Controle e (B) Peixe com 96h [$0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL].....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC = *American Type Culture Collection*

BHI = Infusão de cérebro e coração (do inglês, *Brain Heart Infusion*)

CC = Controle de crescimento

CE = Controle de esterilidade

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CLX = Clorexidina

DO = Densidade óptica

FDA = *Food and Drug Administration*

LABOrA = Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos

MP-CS = Micropartículas de quitosana

MP-CS-CLX = Micropartículas de quitosana com clorexidina

nm = nanômetro

OECD = Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

pH = Potencial hidrogeniônico

TPP = Tripolifosfato de sódio

UFC = Unidade formadora de colônia

UFC/mL = Unidade formadora de colônia por mililitro

UV = Ultravioleta

(λ) = Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 Controle de liberação de fármacos	13
2.2 Micropartículas de quitosana	14
2.3 Clorexidina	16
2.4 Ecotoxicidade	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Síntese das micropartículas	21
4.2 Neutralização das micropartículas	21
4.3 Avaliação da cinética de inibição do crescimento microbiano	22
4.3.1 Preparo do inóculo	22
4.3.2 Padronização da densidade microbiana	22
4.3.3 Diluição da suspensão padronizada	22
4.3.4 Montagem da placa	23
4.3.5 Análise estatística	24
4.4 Avaliação da toxicidade em embriões de peixe zebra	24
4.4.1 Reprodução de linhagem selvagem do peixe zebra	24
4.4.2 Teste FET	25
4.5 Considerações éticas	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Cinética de Inibição	27
5.2 Test FET	31
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A - Certificado de aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa	42

1 INTRODUÇÃO

Materiais em escala micro- e nanométrica tem sido extremamente utilizados em diversas aplicações tecnológicas devido às suas propriedades advindas da relação área/volume. Tais materiais, como as micro/nanopartículas já estão sendo aplicadas na medicina para o tratamento de câncer no intuito de diminuir os efeitos colaterais ocasionados pela alta concentração de medicamentos tóxicos ao longo do uso (MONTANHA, 2012).

A clorexidina é um antibiótico muito utilizado na saúde, principalmente na odontologia devido à sua molécula ter forte ligação com as células epiteliais da mucosa oral (SIMEAO, 2008). A concentração de clorexidina geralmente utilizada é de 0,12%, contudo o seu uso a longo prazo pode causar efeitos indesejáveis (FLÖTRA, *et al.*, 1971). Em virtude disso, outros métodos de aplicação se fazem necessários, tal qual o emprego de sistemas de liberação controlada. Neste contexto, o teste de cinética de inibição é o método mais apropriado para determinar o efeito bactericida ou fungicida de uma substância. Ele apresenta-se como uma ferramenta poderosa para obter informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e a linhagem microbiana (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Para que possam ser eficientemente utilizados, os micromateriais poliméricos usualmente aplicados nos sistemas de liberação controlada devem se manter estáveis por longos períodos, sem que haja perda das suas propriedades. Diversas pesquisas são desenvolvidas no âmbito de melhorar os protocolos de síntese e aplicabilidade, no entanto, um problema deixado de lado é de como essas partículas podem causar impactos ao ambiente, diante da sua ampla utilização na atualidade.

Neste sentido, torna-se interessante a utilização do embrião do peixe zebra (*Danio rerio*) como um modelo de análise para avaliar o potencial de toxicidade desses materiais e suas interações com organismos não-alvo. O peixe zebra vem sendo utilizado em estudos de ecotoxicologia, até mesmo para análise de alterações comportamentais (AŠMONAITE *et al.*, 2016). Isto, por ser pequeno, possuir ciclo de vida curto e ser de fácil manipulação, porém com a representatividade de organismos mais complexos.

As informações obtidas através da realização deste estudo podem ser importantes para o controle do risco de materiais em escala micrométrica e produtos relacionados à microtecnologia no futuro próximo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Controle de liberação de fármacos

O sistema de liberação controlada de fármacos é uma tecnologia que promove o melhor aproveitamento do princípio ativo pelo organismo, permitindo uma liberação prolongada e com menor administração do medicamento, uma vez que atua em condições específicas (LYRA *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, o interesse em condicionar a velocidade, o local de liberação e o tipo de sistema empregados vêm ganhando espaço principalmente na indústria farmacêutica (LOPES *et al.*, 2005).

Atualmente são empregados vários tipos de sistemas de liberação, dentre eles destacam-se os lipossomos, nanocápsulas, nanopartículas, bombas osmóticas e sistemas transdérmicos (LOPES *et al.*, 2015). Os lipossomos e as micro/nanopartículas têm em comum a capacidade de veicular o fármaco até o local desejado, diminuindo a toxicidade e aumentando a ação terapêutica. Essas características fazem com que seu uso se torne aplicável em vários âmbitos da indústria, sendo também levado em consideração o custo de produção, o perfil de liberação desejado e as propriedades do fármaco (PEZZINI, *et al.*, 2007).

Os sistemas de liberação baseados em nanotecnologia são programas multidisciplinares emergentes na área biomédica, dentre outros fatores, por resolver os desafios como biodisponibilidade devido a menor solubilidade, mecanismo de absorção intestinal deficiente por degradação, mecanismo de liberação deficiente no local alvo, potência terapêutica, efeitos colaterais e inconsistência plasmática de drogas (JACOB *et al.*, 2018).

Neste contexto, vem se destacando o uso de biopolímeros como carregadores de fármacos, pois eles melhoram a cinética de liberação do encapsulado, são biodegradáveis, biocompatíveis, possuem baixa imunogenicidade e boa atividade antibacteriana (LIECHTY *et al.*, 2010; GOPI.; AMALRAJ; THOMAS, 2016). Biopolímeros como fibroína de seda, colágeno, gelatina, albumina, amido, celulose e quitosana podem ser facilmente feitos em suspensões que servem como veículos de liberação tanto para moléculas grandes quanto pequenas (JACOB *et al.*, 2018).

No trabalho realizado por Malik *et al.* (2016), avaliou-se a liberação controlada da clorexidina e sua combinação com a quitosana *in vitro* através de espectrofotometria na região do ultravioleta (UV-Vis). Foi observado que houve 100% de liberação do fármaco em 4 horas. Em contrapartida, quando associada a quitosana, houve 59% da liberação da

clorexidina no período de 24h. O efeito de liberação sustentada da quitosana é evidenciado na literatura, porém não se compreende quais propriedades do polímero são responsáveis por isso.

2.2 Micropartículas de quitosana

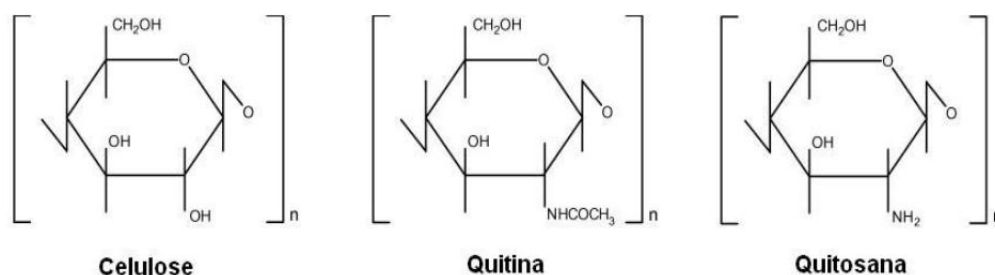
As micropartículas consistem de sistemas de carregamento de fármacos que têm atraído a atenção da indústria e de pesquisadores pela sua capacidade de controle de dosagem de substâncias em sítios específicos, bem como a utilização de polímeros biodegradáveis como vetores (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Esses sistemas são escolhidos para aplicações terapêuticas pela maior especificidade, melhor hidrofília, biodisponibilidade, efetividade terapêutica e na tentativa de diminuir concentrações de substâncias que causam efeitos colaterais indesejados, em outras palavras, diminuição nos níveis de toxicidade em comparação com as drogas livres (VARSHOSAZ *et al.*, 2010; KALITA *et al.*, 2015).

A técnica de microencapsulação promove a proteção do princípio ativo, que a depender do processo de síntese e da metodologia empregadas, pode ser envolto pela partícula formando uma microcápsula, ou ainda ficar disperso por toda a partícula sendo tal sistema denominado de microesfera (ASSIS *et al.*, 2012). Essa tecnologia permite a liberação do encapsulado sob condições específicas, em taxas de velocidade e quantidade controlados (MATTE; ROSA, 2013).

A quitosana consiste de um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, a qual é constituinte do exoesqueleto de crustáceos, insetos e parede celular de fungos. Nos últimos tempos, tem sido alvo de diversos estudos por ser um material biodegradável, atóxico e com propriedades antimicrobianas (SILVA, 2006).

Este biopolímero possui estrutura molecular semelhante à celulose, diferenciando-se apenas pela presença de grupos amino (NH_2) (Figura 1). Embora a quitosana seja solúvel em água em ácido diluído, ela precipita a um pH acima de 6 (HAYASHI, 1994). Suas características físico-químicas proporcionam a formação de géis, resistência mecânica e camada filmogênica; além de ser aplicável na síntese de filmes, micro/nanopartículas e microesferas, características essas de interesse na indústria de cosméticos, na biotecnologia, na agroindústria e na farmacêutica (MENDES, 2011).

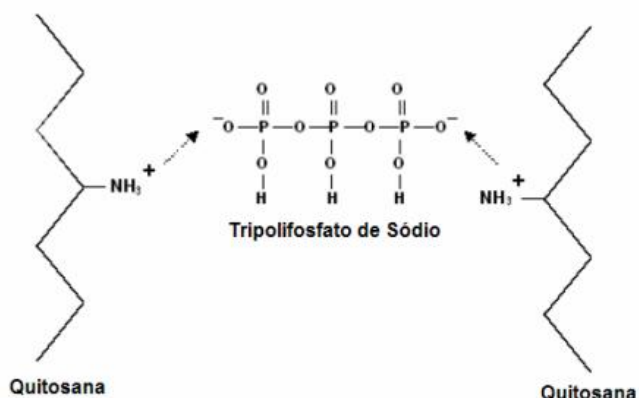
Figura 1. Estrutura molecular da celulose, quitina e quitosana.



Fonte: Mendes, 2011.

A gelatinização ionotrópica é o método mais utilizado para síntese de nanopartículas de quitosana (CALVO *et al.*, 1997a; CALVO *et al.*, 1997b; LIMA *et al.*, 2015; GONDIM *et al.*, 2018). O método consiste na adição de uma fase alcalina (em temperatura ambiente) contendo tripolifosfato (TPP), e uma fase ácida contendo quitosana (AOUADA, 2009) (Figura 2). Tal processo pode formar nano- ou micropartículas. Nas últimas décadas, observou-se grande aplicação tecnológica e resultados satisfatórios, principalmente no setor alimentício pela sua característica antimicrobiana (MATTÉ; ROSA, 2013).

Figura 2. Esquema molecular da gelatinização ionotrópica.



Fonte: AOUADA, 2009.

A quitosana pode ser utilizada para a fabricação de revestimentos e filmes comestíveis por possuir as propriedades funcionais básicas de fornecer barreira a gases e umidade, como também por possibilitar o uso de compostos ou misturas para regular a liberação de aditivos alimentares e nutrientes (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011; MAJID *et al.*, 2016). A fim de avaliar propriedades físicas, antioxidantes e antimicrobianas, Perdones *et al.*, (2014) sintetizaram e caracterizaram dispersões em formato de filmes de quitosana e óleo essencial de canela, contendo ou não ácido oleico (melhoramento das propriedades de barreira contra o

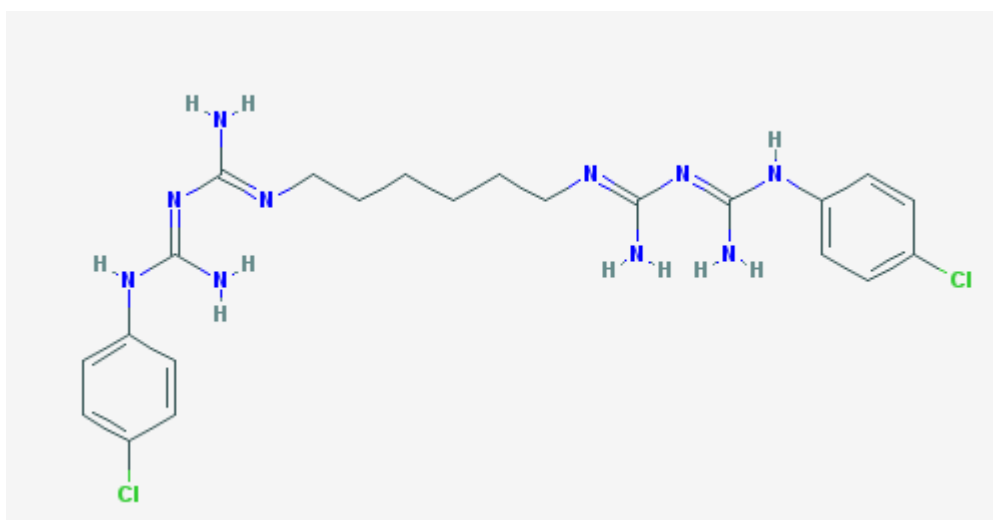
vapor de água). A potencial aplicação de tais revestimentos seria para controlar a decomposição fúngica de morangos.

Com base no exposto, nota-se que as micropartículas de quitosana vêm sendo desenvolvidas com o intuito de serem aplicadas em diversas áreas, para liberação de fármacos, óleos essenciais, moléculas antioxidantes entre outras (JANES *et al.*, 2001; FEYZIOGLU; TORNUK, 2016; HALEVAS *et al.*, 2017).

2.3 Clorexidina

O gluconato de clorexidina (Figura 3), também conhecido como digluconato de clorexidina, é um composto de biguanida que possui ação bacteriostática e, em altas concentrações, ação bactericida (MENDES *et al.*, 1995). É usualmente empregado na odontologia devido à suas moléculas terem forte ligação com as células epiteliais da mucosa oral (SIMEAO, 2008).

Figura 3. Estrutura molecular da clorexidina.



Fonte: PubChem

A clorexidina possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, como *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*, as gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella spp*, em fungos como *Aspergillus spp* e *Candida spp*, leveduras e vírus lipofílicos. Devido a isso, seu uso também se torna amplo pois pode ser utilizada na saúde humana, animal e na indústria (AMORAS, 2013).

De acordo com a NCI Thesaurus, a clorexidina é carregada positivamente e reage com a superfície celular microbiana carregada negativamente, destruindo assim a integridade da

membrana celular. Subsequentemente, a clorexidina penetra na célula e causa o vazamento de componentes intracelulares, levando à morte celular. Como as bactérias gram-positivas são mais carregadas negativamente, elas são mais sensíveis a esse agente. Esse mecanismo de ação impede que as bactérias se tornem resistentes ao composto.

Na prática clínica, a concentração de clorexidina geralmente utilizada é de 0,12% (v/v). Entretanto, seu uso a longo prazo pode gerar efeitos indesejados como a irritação da mucosa oral, descoloração do esmalte dos dentes, além de manchas na língua (MENDES et al., 1995). Por esse motivo, o sistema de microencapsulação de fármacos visa diminuir essas concentrações e, conseqüentemente, os efeitos colaterais, porém mantendo a mesma eficácia.

Honscha, Campos e Da Silva Júnior. (2015), avaliaram a fitotoxicidade aguda da clorexidina em sementes de alface (*Lactuca sativa*) utilizando enxaguantes bucais. Os ensaios foram conduzidos utilizando concentrações de 0%, 1%, 3%, 10%, 50%, 75% e 100% e a toxicidade foi avaliada após cinco dias observando o número de sementes germinadas, o peso fresco e o peso seco. O enxaguante de clorexidina apresentou diminuição da germinação e do peso fresco na concentração 10% e ausência de germinação nas concentrações superiores, demonstrando ser um enxaguante tóxico para o vegetal em estudo.

Diante disso, torna-se extremamente importante que novos estudos elucidem a toxicidade da clorexidina no ambiente, tendo em vista que é bastante utilizada na saúde humana, como também na saúde animal. E, principalmente, se o descarte do fármaco promove algum desequilíbrio ambiental.

2.4 Ecotoxicidade

A toxicologia ambiental se expandiu à medida que crescentes preocupações sobre o impacto de produtos químicos produzidos e liberados no meio ambiente e na saúde humana estão sendo demonstradas. Entre os efeitos tóxicos observados em organismos expostos a poluentes, aqueles que afetam os tecidos esqueléticos (osteotoxicidade) foram um tanto negligenciados em comparação com as toxicidades hepato-, imunológicas, neuro e/ou reprodutivas. No entanto, os efeitos subletais de agentes tóxicos no desenvolvimento esquelético e/ou manutenção óssea podem resultar em crescimento prejudicado, taxa de sobrevivência reduzida, aumento da susceptibilidade a doenças e diminuição do bem-estar (FERNÁNDEZ et al., 2018).

O impacto de substâncias químicas antropogênicas lançadas no meio ambiente é uma preocupação mundial, fomentando o desenvolvimento de diversas diretrizes e medidas

regulatórias por organizações internacionais como a Agência Europeia do Meio Ambiente (EEA), a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) e a *Food and Drug Administration* (FDA) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Por conseguinte, ampla discussão sobre os potenciais riscos dos nanomateriais ao meio ambiente e à saúde humana tem sido levantada diante da crescente produção e aplicação destes materiais (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Para que possam ser eficientemente utilizados, os micromateriais poliméricos devem se manter estáveis por longos períodos de tempo, sem que haja perda das suas propriedades. Diversas pesquisas são desenvolvidas no âmbito de melhorar os protocolos de síntese e aplicabilidade. No entanto, um problema deixado de lado é de como essas partículas podem causar impactos ao ambiente, diante da sua ampla utilização na atualidade. Devido às características inerentes de nano- e micromateriais, tais como tamanho, alta área de superfície e capacidade de se aglomerar e dispersar, existe o potencial risco de contaminação ambiental, visto que estas podem facilmente se translocar pelo ecossistema. Por conseguinte, estes aspectos justificam a importância de se pesquisar e obter dados confiáveis sobre a disponibilidade, degradabilidade e toxicidade dos nanomateriais (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um importante modelo experimental muito utilizado na biomedicina, neurofisiologia, genética e, mais recentemente, no controle ambiental. É um organismo pequeno, de fácil manipulação e pode ser mantido em laboratório a um custo baixo (SPENCE *et al.*, 2008). Os peixes se reproduzem o ano inteiro, podendo as fêmeas desovar a cada 3 dias e uma única desova pode gerar centenas de ovos. A fertilização é externa, o que permite a coleta e o monitoramento das fases do desenvolvimento do peixe (KIMMEL *et al.*, 1995). O peixe zebra já vem sendo utilizado em estudos de ecotoxicologia, até mesmo para análise de alterações comportamentais (AŠMONAITE *et al.*, 2016). Isto, por ser pequeno, possuir ciclo de vida curto e ser de fácil manipulação, além de apresentar-se como um sistema de análise de pequena escala eticamente aceitável, porém com a representatividade de organismos mais complexos (PADILLA *et al.*, 2012). Neste sentido, torna-se interessante a utilização do embrião do peixe zebra (*Danio rerio*) como um modelo de análise para avaliar o potencial de toxicidade de nano- e micromateriais e suas interações com organismos não alvo.

Asharani *et al.* (2011) testaram a toxicidade de nanopartículas de ouro (Au-NP), prata (Ag-NP) e platina (Pt-NP) em embriões do peixe-zebra e concluíram que as Ag-NP e Pt-NP induzem atrasos na eclosão, diminuição da frequência cardíaca e curvatura de eixos, enquanto

as Au-NP não apresentaram indícios de toxicidade. Entretanto, houve o acúmulo das nanopartículas no embrião confirmado por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-OES).

Teijeiro-Valiño *et al.* (2017) sintetizaram nanocápsulas de núcleo lipídico usando ácido hialurônico e o peptídeo protamina como invólucro externo para avaliar sua interação com as barreiras biológicas em embriões de peixe-zebra. Utilizando-se do Teste FET (*Fish Embryo Acute Toxicity*) e de marcadores fluorescentes, verificaram que houve permeabilidade das nanocápsulas no córion e na pele, porém apresentando apenas 17,71% de mortalidade, sendo este valor considerado de baixa toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a toxicidade e a cinética de inibição de micropartículas de quitosana encapsulando clorexidina.

3.2 Objetivos específicos

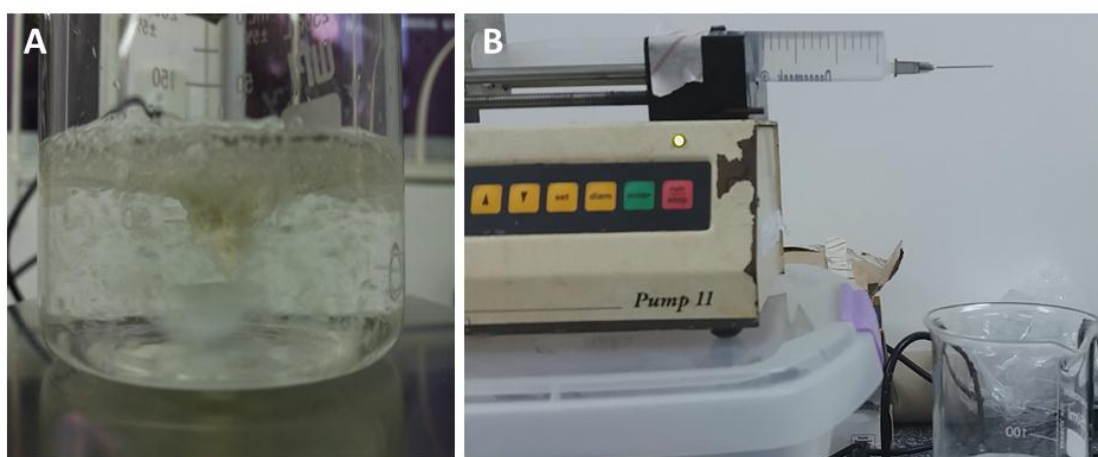
- Sintetizar micropartículas de quitosana encapsulando clorexidina;
- Avaliar a cinética de inibição de micropartículas de quitosana contendo clorexidina, em diferentes concentrações, contra *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a toxicidade de micropartículas de quitosana contendo clorexidina em diferentes concentrações em embriões de peixe zebra (*Danio rerio*) pelo teste *FET*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese das micropartículas

As micropartículas poliméricas de quitosana (CS) (Sigma-Aldrich®) encapsulando clorexidina (CLX) foram sintetizadas através da técnica de gelatinização iônica (CALVO *et al.*, 1997b; LIMA *et al.*, 2015; GONDIM *et al.*, 2018). Esta é baseada em interações iônicas entre um dos componentes positivamente carregado (quitosana contendo grupos amino protonados) com uma espécie negativamente carregada atuando com um poliânion (tripolifosfato de sódio - TPP). A partir da interação entre as duas espécies ocorre a reticulação iônica, ocasionando a coagulação e gerando sistemas coloidais estáveis (LIMA, 2013). Para tanto, foi pesado 0,04 g de quitosana e adicionado 8 mL de ácido acético a 1% (v/v). No preparo das partículas contendo clorexidina, além do polímero e do ácido acético (7,76 mL), foi acrescentado 0,24 mL de clorexidina a 4% (v/v). Ambas as misturas foram colocadas sob agitação magnética por 12 horas para a formação de uma solução. Após esse período, com o auxílio da bomba injetora KDS100 (KD Scientific®), foi gotejado em cada amostra 2 mL de tripolifosfato de sódio (TPP) concentrado a 2mg/mL, a uma taxa de 15 mL/h.

Figura 4. Síntese das micropartículas. Em (A), quitosana em solução de ácido acético a 1%, antes da dissolução do polímero ocorrer. Em (B), solução de TPP (2mg/mL) sendo gotejada na solução polimérica para ocorrer a gelatinização iônica e consequente formação de partículas.



Fonte: Autor, 2018.

4.2 Neutralização das micropartículas

Para ajustar o pH adicionou-se hidróxido de sódio aos poucos nas dispersões poliméricas de quitosana (MP-CS) e de quitosana com clorexidina (MP-CS-CLX). Com o

auxílio do pH-metro (Quimis®) realizou-se o controle do pH até atingir o valor de ~6 em temperatura ambiente, uma vez que as micropartículas seriam expostas aos embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) onde vivem num sistema aquático de pH 7,0.

4.3 Avaliação da cinética de inibição do crescimento microbiano

A cinética de inibição do crescimento microbiano proporcionada pelas MP-CS e MP-CS-CLX foi avaliada utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 15656). O experimento foi conduzido de acordo com Wang *et al.* (2017), com algumas modificações.

4.3.1 Preparo do inóculo

Para o cultivo da linhagem, foram colhidas de duas a três colônias, bem isoladas, da cultura em placa de ágar com ajuda de uma alça de platina devidamente flambada. Em seguida, estas foram inoculadas em 5 mL de meio caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) contidos em tubo falcon de 15 mL previamente esterilizados. Após homogeneização em agitador do tipo vórtex, o inóculo foi colocado em estufa bacteriológica (STERILIFER) a 37 °C durante 24h para obter a turbidez necessária.

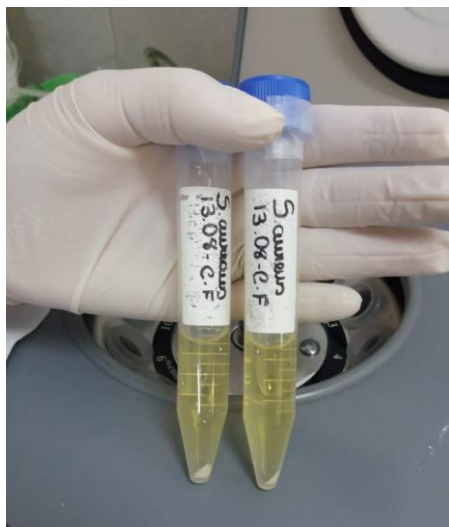
4.3.2 Padronização da densidade microbiana

Após 24h de cultivo, o inóculo foi centrifugado por 15 minutos a 507,5 x g. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* ressuspendido em 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Homogeneizou-se a mistura em vórtex e seguiu-se para a leitura da densidade microbiana em espectrofotômetro (GLOMAX MULTI, Promega) ($\lambda = 600$ nm). Para a leitura utilizou-se uma placa de 96 poços de fundo chato, na qual no primeiro poço foram colocados 100 μ L de salina, e do segundo poço em diante, 75, 50, 25, 20 e 10 μ L do inóculo, complementando para o volume final de 100 μ L com salina. Para coincidir com a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5, os valores de absorbância devem estar entre 0,080 e 0,100. Isto equivale a uma concentração de 1 a 2×10^8 UFC (unidades formadoras de colônia)/mL (NCCLS, 2003).

4.3.3 Diluição da suspensão padronizada

Depois de padronizada, a suspensão foi diluída para que após a inoculação, cada poço contivesse aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (faixa de 2 a 8×10^5 UFC/mL). Como o volume do inóculo entregue em cada poço era de 100 μ L, utilizou-se um fator de diluição de 1:30.

Figura 5. *Pellet* formado da biomassa de *S. aureus* em meio BHI após centrifugação.



Fonte: Autor, 2018.

4.3.4 Montagem da placa

Como descrito por Balouiri, Sadiki e Ibsouda (2016), de quatro à sete pontos na curva são necessários para observar a ação da substância sobre o crescimento do microrganismo, sendo estes pontos os tempos de incubação de: 0, 4, 18 e 24h ou 0, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h. O presente trabalho avaliou a ação de clorexidina encapsulada em micropartículas de quitosana sobre o crescimento de *S. aureus* durante 30 horas.

O experimento foi feito utilizando placas de 96 poços de fundo chato (KASVI). Inicialmente, foram dispostos 100 μL do meio BHI nos poços da placa. Em seguida, 100 μL das substâncias teste em três concentrações diferentes foram adicionados. Os grupos testados foram a clorexidina encapsulada (MP-CS-CLX), as partículas de quitosana sem o fármaco (MP-CS) e a clorexidina livre (CLX) nas seguintes concentrações: 2 x CIM, CIM, e 0,5 x CIM. A CIM corresponde a concentração inibitória mínima, sendo considerada a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento do microrganismo e o seu valor contra *S. aureus* foi determinado em experimentos prévios (LIMA; SARMENTO, 2016). Os 100 μL adicionados ao primeiro poço foram diluídos seriadamente, do mais concentrado para o menos concentrado, sendo os 100 μL descartados ao final da diluição no terceiro poço. Por fim, foram depositados 100 μL do inóculo na concentração de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Paralelamente aos grupos testados foram preparados os controles de crescimento (CC) e controle de esterilidade (CE). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram realizadas leituras com os tempos de 0, 4, 6, 8, 20, 24, 27 e 30 horas de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e a leitura feita através da densidade óptica (DO) com espectrofotômetro (GLOMAX MULTI, Promega) ($\lambda = 600$ nm). A eficiência de inibição foi calculada de acordo com a equação 1 (WANG *et al.*, 2017).

$$\text{Eficiência de inibição} = \frac{OD_{600}^{CC} - OD_{600}^{ST}}{OD_{600}^{CC}} \times 100\% \quad (1)$$

Onde OD_{600}^{CC} e OD_{600}^{ST} eram os valores de densidade óptica para o controle de crescimento e substância teste, respectivamente, medidos a 600 nm no tempo t.

4.3.5 Análise estatística

Os dados foram tabulados e a distribuição paramétrica ou não-paramétrica foi determinada através do GraphPad InStat versão 2.0 (software GraphPad, CA, EUA). Análise de variância simples (ANOVA One-way) foi utilizada para fazer a comparação por amostra em tempo fixo. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($p=0,05$).

4.4 Avaliação da toxicidade em embriões de peixe zebra

4.4.1 Reprodução de linhagem selvagem do peixe zebra

O peixe zebra se reproduz nas primeiras horas do dia, ou seja, quando há mudança do fotoperíodo escuro (noite) para o claro (dia) (SPENCE; ASHTON; SMITH, 2007; NASIADKA; CLARK, 2012). Foram instaladas 3 armadilhas (Figura 6) em 3 aquários da linhagem selvagem do Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LaBOrA) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) para coletar os ovos dos peixes uma hora antes das luzes do sistema acenderem, às 06h.

Após as luzes acenderem, esperando entre 1-2h para a fecundação dos ovos, as armadilhas foram retiradas dos aquários para separar e selecionar os ovos viáveis e seguir com o experimento. Foram necessários 408 embriões para todos os grupos posteriormente analisado.

Figura 6. Armadilha utilizada para coleta de embriões.



Fonte: Autor, 2018.

4.4.2 Teste FET

Para a aferição da toxicidade em embriões foi utilizado o teste de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra, Test FET (*Fish Embryo Acute Toxicity*), realizado de acordo com o protocolo nº 236 da OECD (2013). Os ovos de peixe-zebra recém-fertilizados foram expostos à diferentes concentrações das micropartículas em teste por um período de 96 horas, sendo estas $1,55$, $0,77$, $0,38$, $0,19$ e $0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL. A cada 24 horas, até quatro observações apicais eram registradas como indicadores de letalidade: (1) coagulação dos ovos fertilizados, (2) falta de formação dos sômitos, (3) falta do desprendimento da cauda e (4) falta de batimento cardíaco. No final do período de exposição, determinou-se a toxicidade aguda com base no resultado dos pontos de letalidade observados. Na presença de qualquer uma das quatro observações apicais registradas o embrião foi considerado morto.

Para o procedimento, foram utilizadas 17 placas de 24 poços contendo 1 embrião/poço. Em cada placa, 20 embriões foram destinados para a amostra teste e 4 para os controles internos, expostos apenas a água do próprio sistema em que são mantidos. Foram analisados 3 grupos, sendo um correspondente as micropartículas contendo a clorexidina (MP-CS-CLX); outro de micropartículas poliméricas sem o fármaco (MP-CS), para o controle da toxicidade do polímero; e o terceiro grupo consistindo da clorexidina livre (CLX). Seguindo as recomendações do protocolo nº 236 da OECD, foram utilizados no máximo 422 embriões, já considerando 10% de taxa de perdas. O teste foi iniciado em até 6 h após a fertilização dos ovos e continuado até completar 96 h.

4.5 Considerações éticas

Este trabalho integra a utilização de embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) para verificação da toxicidade de micropartículas de quitosana. Anteriormente à realização dos experimentos, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) protocolado sob o nº 4216270718 (ID 000331) (Anexo A).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de Inibição

A Figura 7 mostra as curvas de crescimento de *S. aureus* exposta à três concentrações diferentes de MP-CS-CLX, bem como de MP-CS e CLX livre. As eficiências de inibição correspondentes são mostradas na Figura 8.

Como observado por Wang *et al.* (2017), a curva de crescimento para o controle de *S. aureus* demonstrou um ciclo dinâmico representativo de três fases: fase *lag* (ou fase de latência), fase exponencial (ou de crescimento) e fase de estabilização (Figura 7). A fase *lag* pode ser explicada pela necessidade de a bactéria se adaptar às novas condições oferecidas pelo ambiente, o que é evidenciado na curva pelo crescimento inicial mais lento. Na fase exponencial, o número de bactérias do controle aumenta exponencialmente em função do tempo, isso pois não há nenhuma restrição ao seu crescimento, tal como nutrição insuficiente e/ou produtos metabólicos liberados no meio. Na fase de estabilização a taxa de crescimento bacteriano foi estável e assim se manteve até ocorrer o declínio devido à falta de nutrientes. Em contrapartida, quando expostas à CLX livre ou encapsulada nas duas maiores concentrações, o crescimento das bactérias não ocorreu, tendo estes dois grupos apresentado e mantido eficiência de inibição de ~90% (Figura 8-B e C) a partir do tempo de 6h em diante.

Como observado no gráfico da Figura 8-C, após aproximadamente 6h de incubação, 0,5 x CIM da CLX livre ($2,92 \times 10^{-2}$ mg/mL) começou a perder eficácia, enquanto a 0,5 x CIM da CLX encapsulada ($0,77 \times 10^{-3}$ mg/mL) (Figura 8-B) ainda manteve seu efeito, sendo a diferença estatisticamente significativa com $p < 0,001$. Tal ocorrência pode indicar que a atividade da CLX encapsulada perdura por mais tempo em virtude da liberação controlada da mesma pelas micropartículas de quitosana. A lenta liberação da CLX foi também verificada no estudo de Malik *et al.* (2016), onde associada à quitosana percebeu-se que a liberação do fármaco reduziu de 100%, nas primeiras 4 horas, para 59% em 24 horas.

A atividade antibacteriana da quitosana, bem como de nanopartículas de quitosana, têm sido extensivamente relatada na literatura (QI *et al.*, 2004; DU *et al.*, 2009; XING *et al.*, 2008; NO *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2014). Por outro lado, em oposição aos resultados encontrados, neste trabalho, a quitosana sozinha (MP-CS) não demonstrou a atividade esperada. Mesmo considerando que foram utilizadas concentrações sabidamente eficazes contra a bactéria em estudo, estas encontradas em experimentos anteriores (LIMA; SARMENTO, 2016), com 8h de incubação as MP-CS já não apresentavam mais ação. Eventualmente,

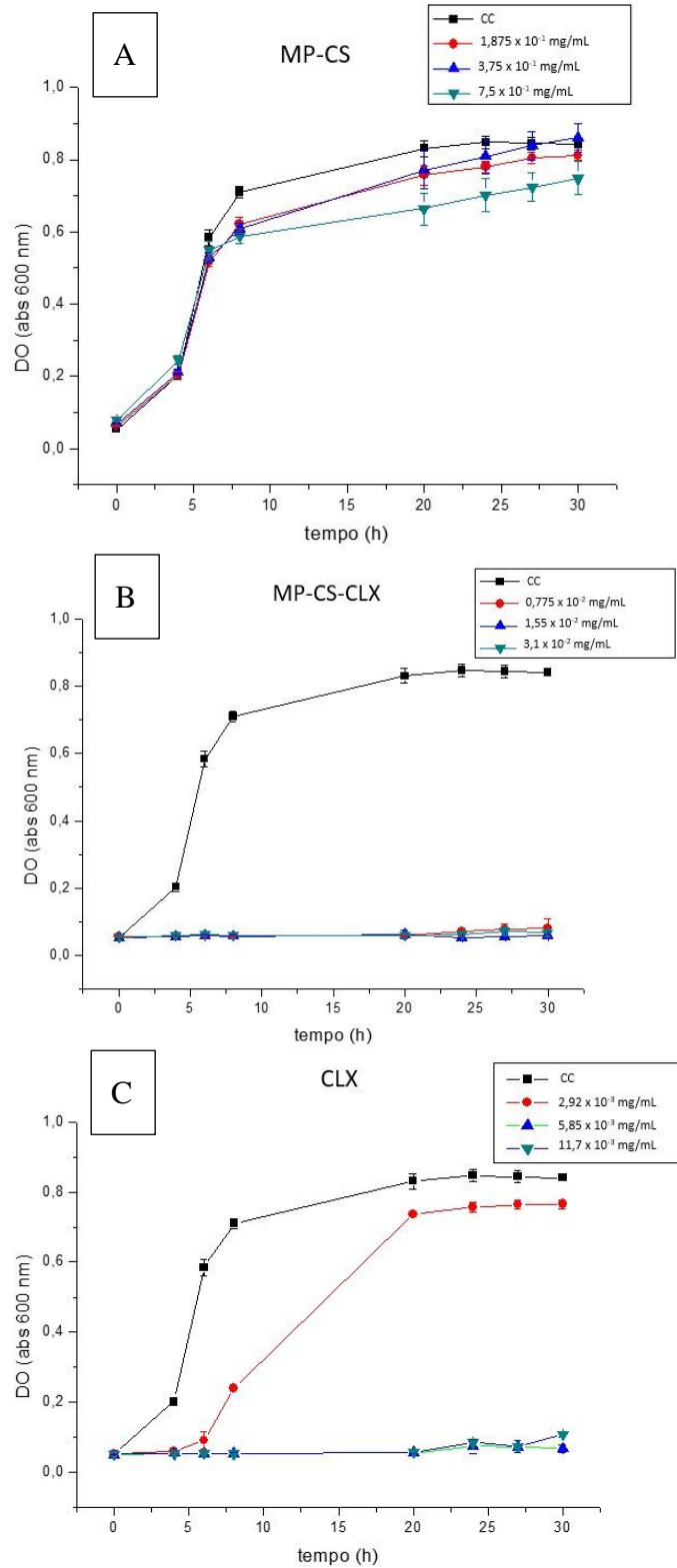
pequenas alterações da formulação, como por exemplo diferença no pH, podem ter influenciado essa atividade.

Abruzzo *et al.* (2012) sintetizaram complexos de quitosana/alginato (CH/ALG) em diferentes proporções carregadas com clorexidina para o tratamento de infecções vaginais. Foram realizadas a caracterização desses complexos, bem como a distribuição da droga e atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Escherichia coli*. O complexo que mostrou maior liberação da droga foi o CH/ALG (1:1), uma vez que a quantidade de cargas na interação ALG com a clorexidina é menor. Os complexos também exerceram forte atividade antimicrobiana contra *E. coli* nas primeiras 6 horas, enquanto só após 24h foi percebida a atividade contra *C. albicans*.

Gondim *et al.* (2018) avaliaram os efeitos de nanopartículas de quitosana (ChNPs) contra a adesão e formação de biofilmes de *C. albicans* e *Candida spp.* em resina acrílica. Através da determinação da concentração fungicida mínima (CFM) contra *Candida spp.*, observou-se que ChNPs tiveram atividade fungicida e inibiu a adesão inicial e o desenvolvimento do biofilme maduro na superfície da resina. Já no ensaio de cinética de inibição, para verificar a relação do tempo de exposição e a concentração das ChNPs, observou-se que em todas as concentrações houve redução no número de UFC/mL.

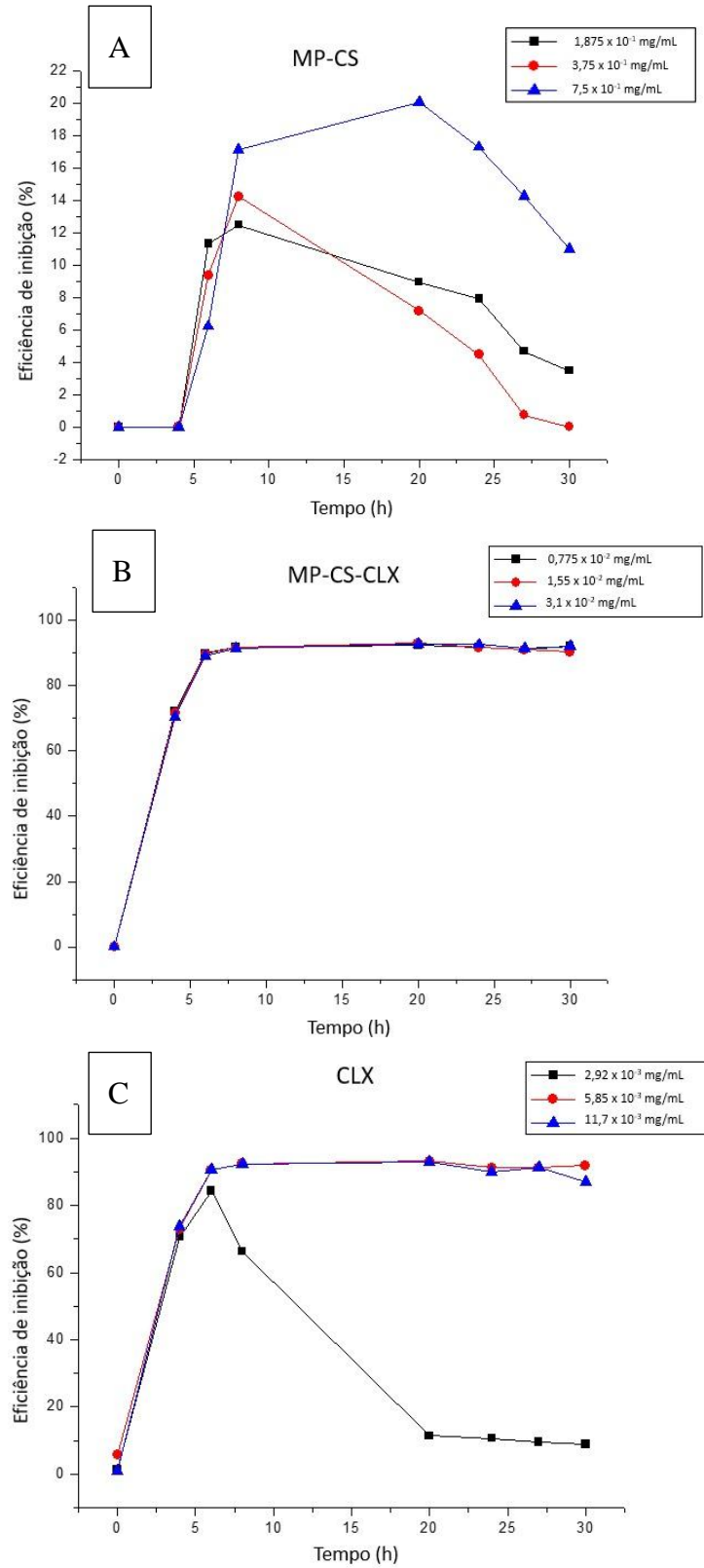
Com base nos trabalhos supracitados e nos resultados obtidos neste trabalho foi possível constatar que o uso da CS como polímero para sistema de liberação controlada é eficiente. Além disso, a CLX livre não demonstrou o efeito esperado, podendo outros fatores como calor e/ou evaporação terem afetado negativamente sua ação, sendo necessário outros ensaios para confirmar tal comportamento.

Figura 7. Curvas de crescimento de *S. aureus* expostas à diferentes concentrações de CLX, CS-CLX e CS. Os dados foram representativos dos resultados dos experimentos em triplicata e expressos como médias \pm desvios-padrão (DP).



CC: Controle de crescimento
Fonte: Autor, 2018.

Figura 8. Eficiência de inibição dos grupos testados contra *S. aureus*. Os valores de eficiência de inibição foram calculados de acordo com a Equação (1).



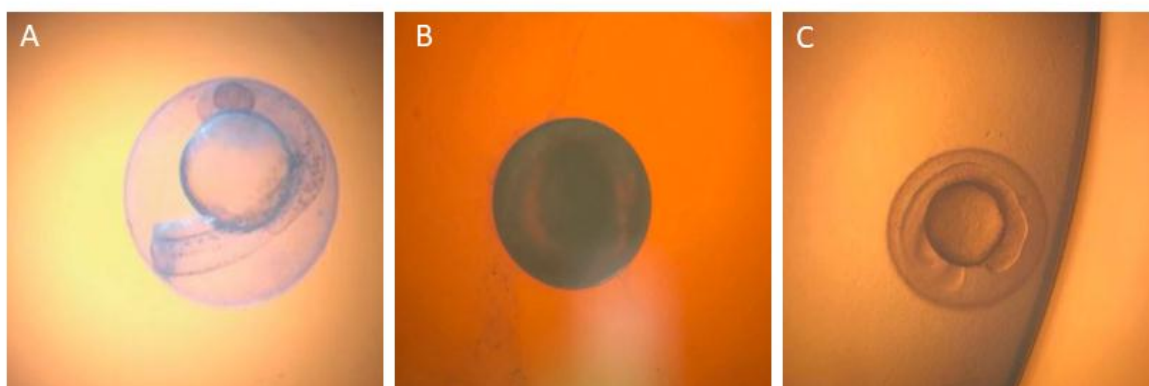
Fonte: Autor, 2018.

5.2 Test FET

Dos três grupos analisados, todas as concentrações contendo MP-CS-CLX e CLX tiveram 100% de mortalidade nas primeiras 24h (Gráfico 1-B e C) verificada a coagulação dos embriões (Figura 9-B). Isto indica que a concentração de CLX utilizada é extremamente letal para esse organismo, tendo em vista que se utilizou o valor referente a CIM de $1,55 \times 10^{-2}$ mg/mL em *Staphylococcus aureus*.

No grupo contendo apenas MP-CS, as concentrações $1,55$, $0,77$, $0,38 \times 10^{-2}$ mg/mL foram letais em todos os poços. Nas placas referentes a $0,19$ e $0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL não houve mortalidade nas 24h e ambas mostraram efeitos semelhantes nos embriões (Gráfico 1-A). Entretanto, os embriões apresentaram retardo no desenvolvimento quando comparado ao grupo controle, ou seja, sem presença de pigmento, cabeça e cavidade dos olhos pouco evoluídos e batimentos cardíacos lentos (Figura 9-C). Com 42h após exposição às partículas, os embriões continuaram a se desenvolver, mas ainda sem apresentar os pigmentos no corpo (Figura 10-B). Em 72h os embriões já apresentavam pigmento, mas ainda estavam dentro do córion, tendo em vista que o grupo controle havia eclodido (Figura 12). E, por fim, com 96 h de exposição, a maioria dos peixes já haviam eclodido do córion e apresentavam morfologia semelhante ao controle mesmo com o atraso no desenvolvimento nas primeiras horas (Figura 13).

Figura 9. Embriões de peixe-zebra (A) controle; (B) coagulado [$0,38 \times 10^{-2}$ mg/mL] e (C) retardo no desenvolvimento, após 24h de exposição [$0,19 \times 10^{-2}$ mg/mL].



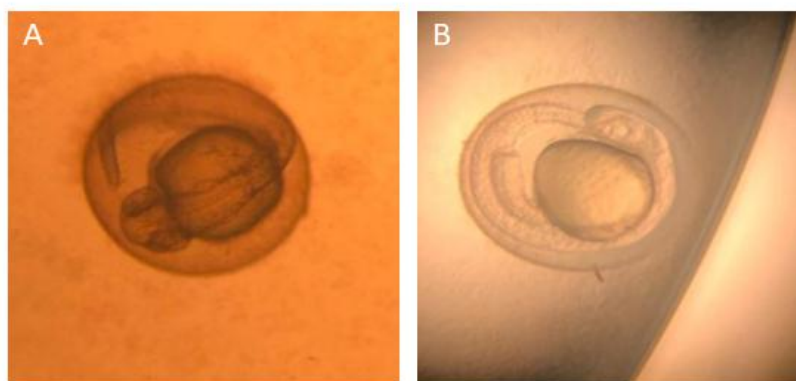
Fonte: Autor, 2018.

Diante do exposto, pode-se concluir que as concentrações utilizadas de MP-CS-CLX e CLX foram extremamente tóxicas ao embrião. Entretanto, quando comparado ao grupo apenas da MP-CS, percebe-se que nas concentrações mais baixas, não houve morte. Com isso, é possível inferir que o fator para a letalidade dos embriões foi a CLX, tendo em vista

que em todos os grupos ela foi letal nas primeiras 24h, mostrando que a CIM, utilizada como parâmetro de concentração, ainda é considerada tóxica para esse organismo.

Por outro lado, no grupo contendo MP-CS, as três maiores concentrações também foram letais. Para tanto, ainda é difícil saber se o fator limitante foi, de fato, a CS, uma vez que é relatado como um polímero atóxico (MATTÉ, 2013). Diante disso, é necessário verificar se a técnica utilizada para a síntese das nanopartículas pode ter influência nesse resultado. É sabido que durante a síntese de micropartículas diversos fenômenos químico-físicos podem ocorrer, e não somente aquele que era o esperado. Desse modo, podem ser formadas partículas de diferentes tamanhos, tal como não ocorrer a formação das mesmas. Logo, como as micropartículas utilizadas estavam em dispersão e não passaram por nenhum processo prévio antes da utilização, conseqüentemente os embriões estavam expostos à substâncias remanescentes da síntese e que podem ter afetado no desenvolvimento dos mesmos em concentrações mais elevadas.

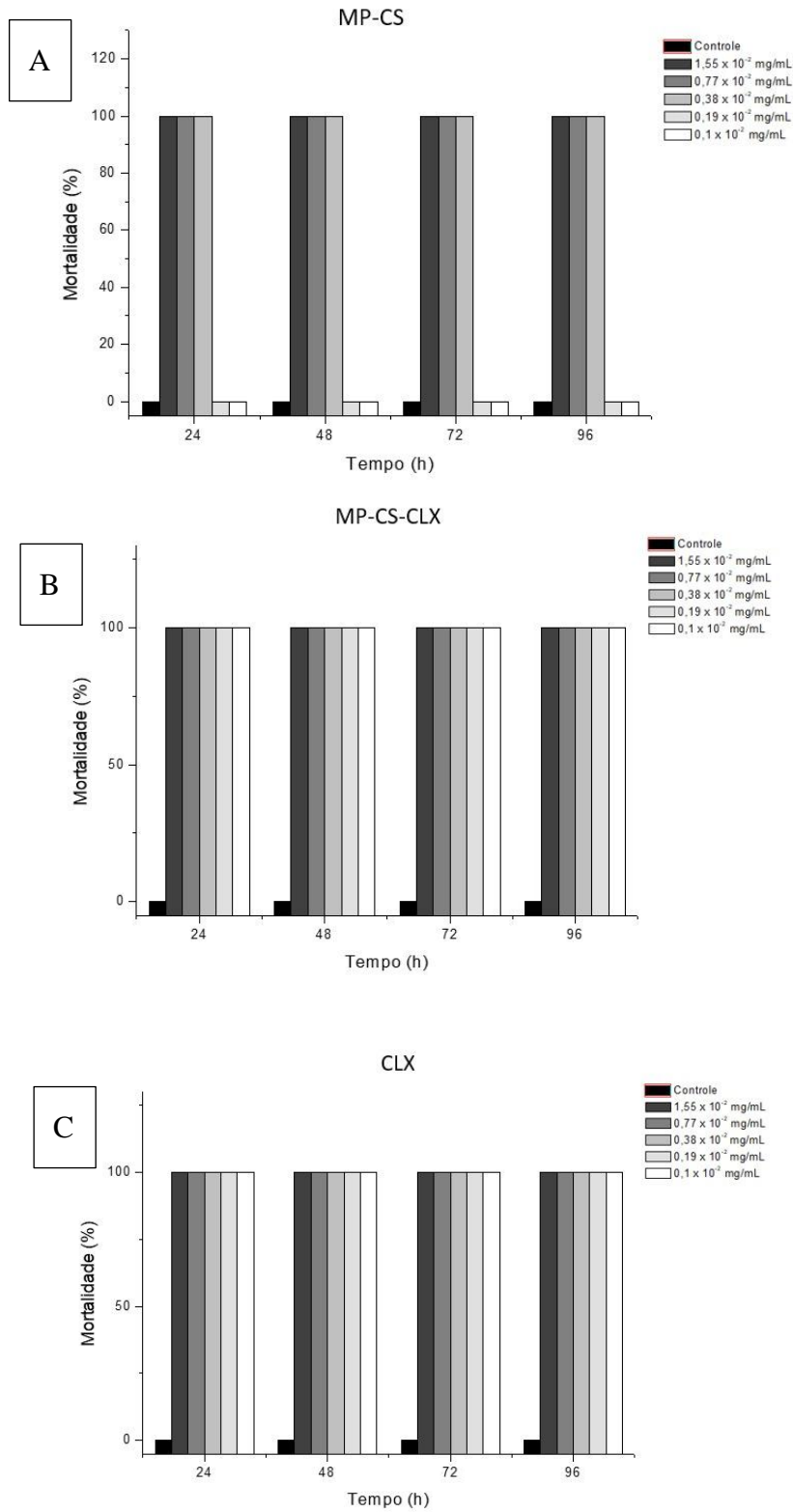
Figura 10. Embriões do peixe-zebra (A) controle e (B) embrião sem pigmento, após 42h de exposição [$0,19 \times 10^{-2}$ mg/mL].



Fonte: Autor, 2018.

Como relatado por Wang *et al.* (2014), a quitosana, especialmente de baixo peso molecular ou nanopartículas, pode entrar na célula, ligando-se ao DNA (poliânion) e, assim, inibir a síntese de RNA e proteína. A genotoxicidade de nanopartículas poliméricas de quitosana e poli(ácido metacrílico) de tamanhos diferentes (60, 82 e 111 nm) foi avaliada por De Lima *et al.* (2010). Avaliaram-se diferentes níveis de concentração, utilizando o teste de danos cromossômicos *Allium cepa*, bem como testes citogenéticos empregando culturas de linfócitos humanos. Os substratos de teste foram expostos a soluções contendo nanopartículas em concentrações de

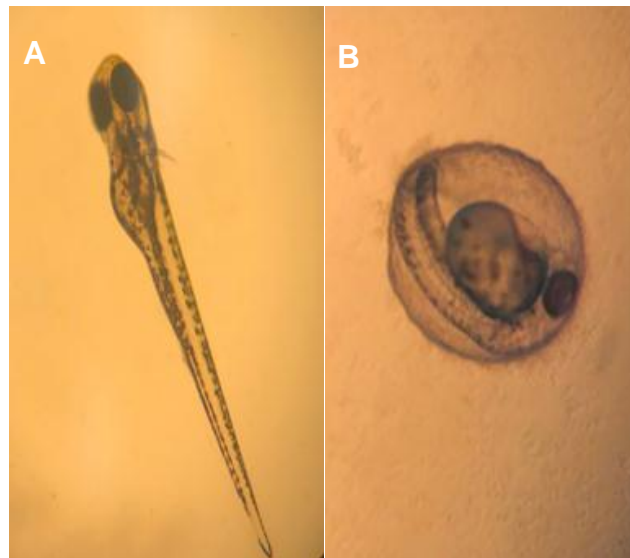
Figura 11. Porcentagem da mortalidade dos embriões de peixe-zebra expostos à diferentes concentrações.



Fonte: Autor, 2018.

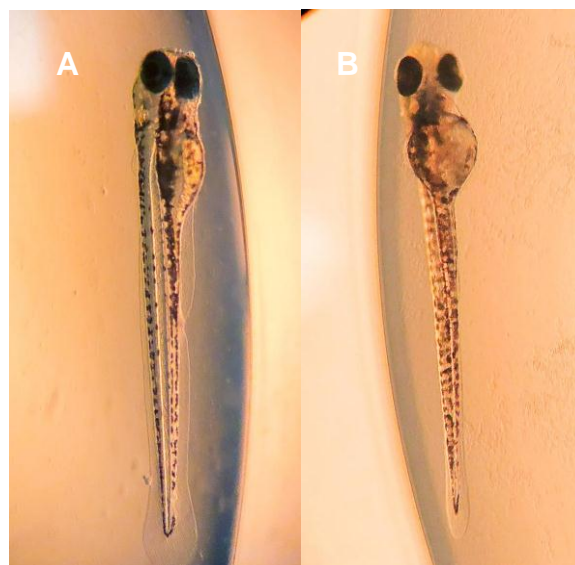
massa de polímero de 1,8, 18 e 180 mg/L. Os resultados não mostraram nenhuma evidência de danos no DNA causados pelas nanopartículas (nenhuma alteração numérica ou estrutural significativa foi observada), entretanto as nanopartículas de 82 e 111 nm reduziram os valores do índice mitótico na maior concentração testada (180 mg/L), indicando que as nanopartículas foram tóxicas para as células utilizadas nesta concentração.

Figura 12. Peixe-zebra (A) controle e (B) embrião no córion, após 72h [$0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL].



Fonte: Autor, 2018.

Figura 13. Peixe-zebra (A) Controle e (B) Peixe com 96h [$0,1 \times 10^{-2}$ mg/mL].



Fonte: Autor, 2018.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que as MP-CS não apresentaram ação antibacteriana contra *S. aureus*, enquanto as MP-CS-CLX apresentaram ação inibitória por um período de tempo maior, indicando a liberação controlada do fármaco. Já no Teste FET, observou-se que as MP-CS-CLX e a CLX livre foram letais aos embriões de peixe-zebra nas primeiras 24h, enquanto as MP-CS, em menores concentrações, apresentaram retardo do desenvolvimento dos mesmos, porém sem mortalidade. Contudo, estudos complementares se fazem necessários no intuito de investigar o fato das MP-CS não terem apresentado efeito inibitório contra *S. aureus*, como também se a CS é um fator limitante na mortalidade dos embriões de peixe-zebra. Além disso, utilizar concentrações menores das MP-CS-CLX para determinar a concentração letal média na metade dos indivíduos da população (CL50).

REFERÊNCIAS

- ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; SALADINI, B.; GALLUCCI, M. C.; RUCIANI, F.; LUPPI, B. Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 2, p. 651-658, 2013.
- AMORAS, Luciana da Silva. Uso da clorexidina na Medicina: Revisão de Literatura. Monografia (Especialização). Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, 2013.
- AOUADA, M. R. M. Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos. 2009. 138f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- ASHARANI, P. V.; LIANWU, Y. I.; GONG, Z.; VALIYAVEETIL, S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 43-54, 2011.
- AŠMONAITĖ, G.; BOYER, S.; DE SOUZA, K. B.; WASSMUR, B.; STURVE, J. Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach. **Aquatic Toxicology**, v. 173, p. 143–153, 2016.
- ASSIS, L. M. D.; ZAVAREZE, E. D. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOARES, L. A. D. S. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. “Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions”. **Colloid Polym. Sci.**, 275: 46, 1997a.
- CALVO, P.; REMUNAN- LOPEZ, C.; VILA- JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan- polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997b.
- CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 849-875, 2011.
- DE LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. D. E. S.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; FRACETO, L. F. Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films. **Journal of food science**, v. 75, n. 6, p. N89-N96, 2010.

DU, W. L.; NIU, S. S.; XU, Y. L.; XU, Z. R.; FAN, C. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 385-389, 2009.

FERNÁNDEZ, I.; GAVAIA, P. J.; LAIZÉ, V.; CANCELA, M. L. Fish as a model to assess chemical toxicity in bone. **Aquatic Toxicology**, v. 194, n. September 2017, p. 208–226, 2018.

FEYZIOGLU, G. Cansu; TORNUK, Fatih. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. **LWT-Food Science and Technology**, v. 70, p. 104-110, 2016.

FLÖTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **European Journal of Oral Sciences**, v. 79, n. 2, p. 119-125, 1971.

GONDIM, B. L. C.; CASTELLANO, L. R. C.; DE CASTRO, R. D.; MACHADO, G.; CARLO, H. L.; VALENÇA, A. M. G.; DE CARVALHO, F. G. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. **Archives of oral biology**, v. 94, p. 99-107, 2018.

GOPI, S.; AMALRAJ, A.; THOMAS, S. Effective drug delivery system of biopolymers based on nanomaterials and hydrogels-a review. **Drug Des**, v. 5, n. 129, p. 2169-0138, 2016.

HALEVAS, E.; NDAY, C. M.; CHATZIGEORGIOU, E.; VARSAMIS, V.; ELEFThERIADOU, D.; JACKSON, G. E.; SALIFOGLOU, A. Chitosan encapsulation of essential oil “cocktails” with well-defined binary Zn (II)-Schiff base species targeting antibacterial medicinal nanotechnology. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 176, p. 24-37, 2017.

HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Progress in polymer science**, v. 19, n. 4, p. 663-702, 1994.

HONSCHA, L. C.; CAMPOS, A. S.; DA SILVA JÚNIOR, F. M. R.. Higiene bucal: um risco diário para o meio ambiente?. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 50-53, 2015.

JANES, K. A.; FRESNEAU, M. P.; MARAZUELA, A.; FABRA, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. **Journal of controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 255-267, 2001.

JACOB, J.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 43-55, 2018.

KALITA, S.; DEVI, B.; KANDIMALLA, R.; SHARMA, K. K.; SHARMA, A.; KALITA, K.; KOTOKY, J. Chloramphenicol encapsulated in poly- ϵ -caprolactone-pluronic composite: nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 2971–84, 2015.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for drug delivery systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149-173, 2010.

LIMA, A. S.; SARMENTO, R. R. Atividade antimicrobiana de nanopartículas de quitosana carreando clorexidina em culturas de *Staphylococcus aureus*. In: Encontro de Iniciação Científica - Universidade Federal da Paraíba, 4, 2016, João Pessoa, PB. Anais (on-line). Disponível em: <http://www.propesq.ufpb.br/propesq/contents/downloads/enic/anais_xxiv_enic_catalogado_final.pdf> Acesso em: 25 de out 2018.

LIMA, J. M. D.; SARMENTO, R. R.; SOUZA, J. R. D.; BRAYNER, F. A.; FEITOSA, A. P. S.; PADILHA, R.; ALVES, L. C.; PORTO, I. J.; BATISTA, R. F. B. D.; OLIVEIRA, J. E. D.; MEDEIROS, E. S. D.; BONAN, P. R. F.; CASTELLANO, L. R. C. Evaluation of hemagglutination activity of chitosan nanoparticles using human erythrocytes. **BioMed research international**, v. 2015, 6 pg. 2015.

LIMA, L. A. Nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio obtidas via gelatinização iônica para a nanoencapsulação de quercetina. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências de Materiais, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LYRA, M. A. M. D.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; DE LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. D. S.; ROLIM NETO, P. J. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784-93, 2007.

MAJID, I.; NAYIK, G. A.; DAR, S. M.; NANDA, V. Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016.

MALIK, S.; TANEJA, S.; CHADHA, R.; KUMARI, M. Effect of Chitosan on sustained release of chlorhexidine—an in vitro study. **Journal of Dental Specialities**, v. 4, n. 1, p. 21-25, 2016.

MATTÉ, Grasielle M.; ROSA, S. A. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206-218, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, pp. 831-840, 2011.

MENDES, M. M. S. G.; ZENÓBIO, E. G.; PEREIRA, O. L. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. **Periodontia**, v. 5, n. 2, p. 253-6, 1995.

MONTANHA, V. C. Preparação e caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.

NASIADKA, Andrzej; CLARK, Matthew D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. **ILAR journal**, v. 53, n. 2, p. 161-168, 2012.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=9552081, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9552081>> (Acesso em: 10 de out de 2018).

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**, Approved Standards-M7-A6, 6ª ed., v. 23, n. 2, 2003.

NO, H. K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International journal of food microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 65-72, 2002.

OECD. Test No. 236, “**Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**” OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing, 2013.

PADILLA, S.; CORUM, D.; PADNOS, B.; HUNTER, D. L.; BEAM, A.; HOUCK, K. A.; REIF, D. M. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 174–187, 2012.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PERDONES, Á.; VARGAS, M.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 256-264, 2014.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737, 2003.

SILVA, C. F. Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos. 2006. 238f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

SIMEAO, M. C. Q. AÇÃO ANTIMICROBIANA DO XILITOL, CLOREXIDINA E XILITOL-CLOREXIDINA SOBRE *Streptococcus mutans*. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Potiguar. Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

SPENCE, R.; ASHTON, R.; SMITH, C. Oviposition decisions are mediated by spawning site quality in wild and domesticated zebrafish, *Danio rerio*. **Behaviour**, v. 144, n. 8, p. 953-966, 2007.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

TEIJEIRO-VALIÑO, C.; YEBRA-PIMENTEL, E.; GUERRA-VARELA, J.; CSABA, N., ALONSO, M. J.; SÁNCHEZ, L. Assessment of the permeability and toxicity of polymeric nanocapsules using the zebrafish model. **Nanomedicine**, v. 12, n. 17, p. 2069-2082, 2017.

VARSHOSAZ, J.; GHAFFARI, S.; KHOSHAYAND, M. R.; ATYABI, F.; AZARMI, S.; KOBARFARD, F. Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design. **Journal of Liposome Research**, v. 20, n. 2, p. 97-104, 23 jun. 2010.

WANG, H.; HAO, L.; WANG, P.; CHEN, M.; JIANG, S.; JIANG, S. Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 437-446, 2017.

WANG, S. L.; HIEP, Đ. M.; LUONG, P. M.; VUI, N. T.; ĐINH, T. M.; DZUNG, N. A. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. **Research on Chemical Intermediates**, v. 40, n. 6, p. 2165-2175, 2014.

XING, K.; CHEN, X. G.; LI, Y. Y.; LIU, C. S.; LIU, C. G.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Antibacterial activity of oleoyl-chitosan nanoparticles: A novel antibacterial dispersion system. **Carbohydrate polymers**, v. 74, n. 1, p. 114-120, 2008.

GLOSSÁRIO

Biodegradável: material que sofre decomposição pela ação de reações enzimáticas.

Biopolímero: polímeros derivados de matéria-prima de fontes renováveis, podem ser proteínas (fibroína de seda, colágeno, gelatina e albumina) e polissacarídeos (quitosana, alginato, celulose e amido).

Biodisponibilidade: percentual de aproveitamento de uma substância pelo organismo.

Dispersão: disseminação de uma substância em um fluido no qual não é solúvel.

Pellet: resíduo remanescente após centrifugação.

ANEXO A - Certificado de aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM EMBRIÕES DE PEIXE ZEBRA (Danio rerio) DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA ENCAPSULANDO CLOREXIDINA ", protocolada sob o CEUA nº 4216270718 (ID 000331), sob a responsabilidade de **Ian Porto Gurgel do Amaral e equipe; Maria Teresa Pereira Marques Araújo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 03/08/2018.

We certify that the proposal "Toxicity assessment of chlorhexidine encapsulate by chitosan microparticles in zebrafish embryos (Danio rerio)", utilizing 422 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4216270718 (ID 000331), under the responsibility of **Ian Porto Gurgel do Amaral and team; Maria Teresa Pereira Marques Araújo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 08/03/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018 a 10/2018** Área: **Ciência Animal**

Origem: **Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UnipOM)**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **0 a 5 dias** N: **422**

Linhagem: **Danio rerio** Peso: **0 a 0 g**

Local do experimento: **Unidade de produção de organismos modelo não convencionais (UnipOM)**

João Pessoa, 03 de agosto de 2018

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba