



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

TESE DE DOUTORADO

Produção e avaliação de micropartículas de alginato contendo bacitracina de zinco, berberina e nitroprussiato de sódio recobertas por quitosana para tratamento de bacterioses extraídas de peixes

ODAIR ANTONIO BARBIZAN

Brasília - DF

2019

ODAIR ANTONIO BARBIZAN

Produção e avaliação de micropartículas de alginato contendo bacitracina de zinco, berberina e nitroprussiato de sódio recobertas por quitosana para tratamento de bacterioses extraídas de peixes

PROFESSOR ORIENTADOR

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

COORIENTADORA

Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

Tese submetida à coordenação da Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília - DF

2019



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA**

**Produção e avaliação de micropartículas de alginato
contendo bacitracina de zinco, berberina e nitroprussiato de
sódio recobertas por quitosana para tratamento de
bacterioses extraídas de peixes**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Faculdade de Ceilândia - FCE – Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Faculdade de Ceilândia - FCE – Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dra. Mani indiana Funez

Faculdade de Ceilândia - FCE – Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Jefferson Bruno Pereira Ribeiro

UCB – Universidade Católica de Brasília

Prof. Dra. Dayani Galato

Faculdade de Ceilândia - FCE – Universidade de Brasília - UnB

DEDICATÓRIA

*A minha esposa Denise pelo apoio incondicional,
sem você este trabalho jamais seria possível.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, sempre, agradeço a Deus que em sua onisciência sempre acompanhou meus pensamentos, e na sua onipresença me protegeu ao longo do caminho.

Agradeço de coração pela minha família sempre me apoiando e fazendo parte deste trabalho. Em especial a minha esposa Denise, sempre ao meu lado.

Pela atenção especial que recebi de meus orientadores Professor Dr. Anderson de Jesus Gomes e Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes, sem vocês não teria chegado em momento nenhum no final desta jornada.

Agradecimento especial ao Mestre Igor Albuquerque, por me acolher em sua residência sem ao menos me conhecer, e ainda, ser meu guia na cidade e nos trabalhos.

Agradeço a todos professores, alunos técnicos (em especial ao Diego) da Faculdade de Ceilândia, que me orientaram, cederam equipamentos e me ajudaram nas interpretações.

Aos colegas de grupo de pesquisa pelas informações e orientações.

Ao Instituto Federal de Rondônia, pela oportunidade concedida a minha qualificação profissional.

As agências de fomento: IFRO, CAPES 001, FAPDF, FINATEC, CNPq e CDT-UNB.

Obrigado a todos envolvidos.

RESUMO

A vetorização de fármacos para um órgão específico representa um grande desafio para o desenvolvimento de novos sistemas de entrega controlada de fármacos. O uso de polímeros naturais representa uma valiosa estratégia tecnológica devido à ausência de processos tóxicos para o organismo, e sua capacidade de modificação química por meio de reações de reticulação. Neste trabalho micropartículas de alginato, contendo o antibiótico bacitracina de zinco (BAC), o fitoterápico Berberina (BER) e o liberador de óxido nítrico Nitroprussiato de sódio (SNP) são recobertas com Quitosana, por meio do processo de geleificação ionotrópica utilizando o cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente reticulador, as análises no MEV exibiram morfologia esférica e quando colocadas em solução aquosa as mesmas intumesceram. As micropartículas quando inseridas em solução aquosa apresentaram alta maior que 197 vezes na qualidade de intumescimento e capacidade de retenção de água, facilitando a difusão dos fármacos na solução. O exame detalhado da estrutura superficial por MEV revelou rugas causadas pelo colapso parcial da rede polimérica durante a secagem. O estudo de mucoadesão *in vitro* pelo método de Lowry demonstrou a capacidade de aderência a mucina de 66 %. O processo de liberação dos fármacos incorporados na matriz apresentou comportamento dependente do pH, onde a liberação dos fármacos ocorreu um mecanismo complexo, envolvendo a difusão dos fármacos após o relaxamento das cadeias poliméricas e a erosão da matriz. A análise de FTIR foi utilizada para identificar os grupamentos funcionais dos fármacos, demonstrando que ocorreu a incorporação dos mesmos nas micropartículas. A análise de DSC demonstra a estabilidade térmica da matriz das micropartículas, apresentando características térmicas dos componentes em separado. Os testes *in vitro* mostraram efeitos bactericida e bacteriostático nas culturas de *S. aureus* e *E. coli*, a bacitracina apresentou efeitos bactericida nas linhagens de *S. aureus* (Gram positiva) como esperado, e, ainda nitroprussiato apresentou efeitos bacteriostático nas linhagens de *E. coli* (Gram negativa), a berberina apresentou efeitos bacteriostáticos na *S. aureus*. Tais resultados mostram que estas partículas podem ser utilizadas de maneira promissora como suporte de multifármacos no tratamento de bacterioses.

Palavras-chave: Alginato, quitosana, micropartículas, berberina, bacitracina, óxido nítrico

ABSTRACT

Drug vectorization for a specific organ represents a major challenge for the development of new controlled drug delivery systems. The use of natural polymers represents a valuable technological strategy due to the absence of toxic processes for the organism, and their ability to chemical modification through crosslinking reactions. In this work alginate microparticles containing the antibiotic zinc bacitracin (BAC), the herbal medicine Berberina (BER) and the nitric oxide release sodium nitroprusside (SNP) are coated with chitosan through the ionotropic gelation process using calcium chloride. (CaCl_2) as crosslinking agent, SEM analysis showed spherical morphology and when placed in aqueous solution they swelled. The microparticles when inserted in aqueous solution showed a higher than 197 times high in swelling quality and water retention capacity, facilitating the diffusion of drugs in the solution. Detailed examination of the surface structure by SEM revealed wrinkles caused by the partial collapse of the polymeric mesh during drying. The in vitro mucoadhesion study by the Lowry method demonstrated 66% mucin adherence capacity. The release process of the drugs incorporated in the matrix showed a pH-dependent behavior, where the release of the drugs occurred a complex mechanism, involving the diffusion of the drugs after the relaxation of the polymer chains and the erosion of the matrix. FTIR analysis was used to identify the functional groupings of the drugs, demonstrating that their incorporation into the microparticles occurred. DSC analysis demonstrates the thermal stability of the microparticle matrix, presenting separate thermal characteristics of the components. In vitro tests showed bactericidal and bacteriostatic effects on *S. aureus* and *E. coli* cultures, bacitracin showed bactericidal effects on *S. aureus* strains (Gram positive) as expected, while nitroprusside showed bacteriostatic effects on *E. coli* strains (Gram negative), berberine had bacteriostatic effects on *S. aureus*. Such results show that these particles can be promisingly used as a multidrug support in the treatment of bacteriosis.

Keywords: Alginate, chitosan, microparticles, berberine, bacitracin, nitric oxide

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estado de Rondônia ponto de coleta de espécimes para pesquisa.	18
Figura 2 - Rondônia - pontos de concentração dos espelhos d'água com produção de peixes.	19
Figura 3 - Produção em toneladas de peixes na região do Cone - Sul de Rondônia.	20
Figura 4 - <i>Oreochromis niloticus</i> (Tilápia do Nilo)	24
Figura 5 - Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.	33
Figura 6 - Fórmula molecular estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de α -L-guluronato e M, os copolímeros de α -D-manuronato.	34
Figura 7 - Molécula da Bacitracina de Zinco.	36
Figura 8 - Estrutura da bacitracina A. O antibiótico é formado pela ciclodesidratação de Cys-2 com o esqueleto para formar o anel tiazolina, juntamente com a formação de estrutura por meio de uma ligação isopeptídica entre o grupo ϵ -amino de Lys-6 e o peptídeo C.	37
Figura 9 - Molécula da Berberina.	39
Figura 10 - Molécula do Nitroprussiato de Sódio.	41
Figura 11 – Processo de gelificação. (A) solução contendo Quitosana; (B) solução com Alginato de sódio; (C) fármacos adicionados à solução de alginato de sódio conforme tabela 1; (D) solução de alginato de sódio contendo as formulações propostas é gotejado na solução de Quitosana; as micropartículas formadas são secas (E) e armazenadas em freezer (F).	52
Figura 12 - Esquema de formação de redes tridimensionais entre os polímeros Alginato e Quitosana na presença de Cloreto de Cálcio.....	63
Figura 13 - Morfologia externa das micropartículas vazias operando a 10-20 kV, com o detector de elétrons retroespalhados BSED. (A) ampliação de 100X, (C) ampliação de 1.000X. Morfologia externa do BAC, BER e SNP aprisionados em esferas compostas de alginato / quitosana.....	65
Figura 14 – Micropartículas secas e intumescidas. Em (A) micropartículas secas, em (B) micropartículas após o processo de intumescimento (após 2h) em meio aquoso pH 5,0.	67
Figura 15 - Variação de tamanho do composto de micropartículas de alginato / quitosana durante o processo de intumescimento e liberação dos fármacos no decorrer do tempo.....	70
Figura 16 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Bacitracina de zinco á 37 °C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 254 nm.	71

Figura 17 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Berberina � 37 �C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm.....	72
Figura 18 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Nitroprussiato de sódio � 37 �C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 260 nm.....	73
Figura 19 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC � 37 �C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm.....	74
Figura 20 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC � 37�C no pH 5,0 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Hixson-Crowell (linha contínua).	77
Figura 21 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC � 37�C no pH 6,2 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Ordem Zero (linha contínua).	78
Figura 22 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC � 37�C no pH 7,0 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Michaelis-Menten (linha contínua).	79
Figura 23 - DSC das micropartículas Vazias, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5,0 �C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 �C.	80
Figura 24 - DSC das micropartículas com Berberina, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5,0 �C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 �C.	82
Figura 25 - DSC das micropartículas com Bacitracina, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 �C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 �C.	83
Figura 26 - DSC das micropartículas com Nitroprussiato de Sódio, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 �C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 �C.	84
Figura 27 - DSC da micropartículas com ALG_QUI_NPS_BER_BAC, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 �C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 �C.	85

Figura 28 - Curvas DSCs com micropartículas contendo: Berberina, Bacitracina de zinco e Nitroprussiato de sódio (3COM); Berberina (BER); somente as micropartículas sem fármacos (Vazia); Bacitracina de zinco (BAC) e com Nitroprussiato de sódio (NPS), sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.	86
Figura 29 - Perfil FTIR do Alginato de sódio preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.	89
Figura 30 - Perfil FTIR da Quitosana. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70,0 mg sendo 2,5 % de amostra.....	90
Figura 31 - Perfil FTIR da Bacitracina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.....	91
Figura 32 - Perfil FTIR da Berberina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.....	92
Figura 33 - Perfil FTIR do Nitroprussiato de Sódio. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.....	93
Figura 34 - Perfil FTIR da partícula com todos os componentes da formulação (ALG_QUI_NPS_BER_BAC), onde se visualiza os comprimentos de onda característicos da bacitracina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.	94
Figura 35 - Espectros infravermelhos de alginato de sódio, quitosana, bacitracina, berberina e Nitroprussiato de sódio (3C), e espectro da bacitracina (BAC). Os espectros de transmissão foram registrados usando pelo menos 40 varreduras com resolução de 4,0 cm ⁻¹	95
Figura 36 - Gráfico de padrão de Mucina (A) e padrão Albumina (B).....	97
Figura 37 - Avaliação da atividade bacteriostática. <i>S. aureus</i> (Sa) ou <i>E. coli</i> (Ec) foram incubados na presença de micropartículas vazias, compostos isolados Ampicilina (AMP), Bacitracina (BAC), Berberina (BER).	99
Figura 38 - Avaliação da atividade bactericida. <i>S. aureus</i> (Sa) ou <i>E. coli</i> (Ec) foram incubados na presença de micropartículas vazias, compostos isolados Ampicilina (AMP), Bacitracina (BAC), Berberina (BER).	100
Figura 39 - Peixes coletados, (A) peixe sem sinais sintomáticos, (B) peixe encontrado com sinais sintomáticos e (C) peixe coletado já morto.	103
Figura 40 - Teste de antibiograma <i>S. aureus</i> , em meio de cultura de Mueller Hilton.	106
Figura 41 - Halos de inibição (mm) formados em meio de cultura inoculados com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	107

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação, fármacos adicionados e nomenclatura correspondente adotada.	50
Tabela 2 - Quantidade de micropartículas em gramas utilizado para inoculação em tubos estéreis.....	59
Tabela 3 - Variação de diâmetro (mm) das micropartículas em solução aquosa, em pH's 5,0, 6,2 e 7,4	67
Tabela 4 - Composto de micropartículas de alginato / quitosana: característica de intumescimento e liberação dos fármacos no período de cinco horas.	68
Tabela 5 - Comportamento físico do composto de micropartículas de alginato / quitosana durante o processo de intumescimento e liberação dos fármacos no decorrer do tempo.....	69
Tabela 6 - Modelo cinético de degradação das micropartículas contendo os 3 compostos em diferentes pH's, resultados de r^2 de cada modelo utilizado.	75
Tabela 7 - Dados referentes aos comprimentos de onda de absorbância (nm) característicos dos fármacos com intensidade em absorbância (A).	88
Tabela 8 - Transições identificadas nos fármacos em seu estado como recebido do fornecedor e nas micropartículas confeccionadas, identificação das bandas seguindo as referências consultadas.	95
Tabela 9 - Resultados da análise estatística de Dunnett's, com nível de significância de $P < 0,0001$	101
Tabela 10 - Testes de identificação realizados nas amostras coletadas dos peixes, seguindo os protocolos em vigência (115,116,118).	103
Tabela 11 - Valores do diâmetro dos halos (em mm) obtidos nos testes de antibiograma.	105
Tabela 12 - Resultados da análise estatística de Tukey's, com nível de significância de $P < 0,0001$	107

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%EE – Eficiência de encapsulamento

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAC – Bacitracina de zinco

BER – Berberina

Dm – difusão

DS% - Percentual de hidratação

DSC - Differential Scanning Calorimetry

DSW – Intumescimento

ETs - Exfoliatives Toxins

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier

IC₅₀ - Maximal inhibitory concentration

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods

JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives

MEV – Microscópio eletrônico de varredura

MHB - Ágar Mueller-Hinton

NO – Óxido nítrico

NPS – Nitroprussiato de sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PdI – Índice de polidispersão

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa - Valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido

QUI-ALG-BER-NPS – Quitosana, alginato, berberina e nitroprussiato de sódio

TSST - Toxic Shock Syndrome Toxin

UV-vis – Espectroscopia de no ultravioleta visível

Wf - Fração da água retida

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Lei de Beer-Lambert	54
Equação 2 - Eficiência de encapsulamento	55
Equação 3 - Fração de água retida	55
Equação 4 - Percentual de hidratação	55
Equação 5 - Percentual de intumescimento.....	55
Equação 6 - Difusão.....	56

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	OBJETIVO GERAL.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	JUSTIFICATIVA.....	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1	MATERIAIS	46
5.1.1	Equipamentos.....	46
5.1.2	Reagentes	47
5.2	MÉTODOS	48
5.2.1	Preparo das soluções estoque	48
5.2.2	Preparo das micropartículas.....	49
5.2.3	Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl)	53
5.2.4	Potencial Zeta.....	53
5.2.5	Análise morfológica (MEV)	53
5.2.6	Avaliação da Eficiência de Encapsulamento (%EE)	54
5.2.7	Perfil de intumescimento	55
5.2.8	Avaliação do perfil de liberação do Fármaco (UV-vis) em diferentes pH's	56
5.2.9	Medidas de DSC das partículas vazias e contendo os fármacos	56
5.2.10	Análise do espectro de UV-vis das soluções	57
5.2.11	Medidas de FTIR das partículas vazias e contendo o fármaco.....	57
5.2.12	Análise de teste de Bioadesão	58
5.2.13	Análise da Interação Bacteriana <i>in vitro</i>	58
5.2.14	Autorização para coleta de material biológico.....	60
5.2.15	Isolamento de bactérias em peixes	60
5.2.16	Análise estatística.....	60
6	RESULTADOS	62
6.1	Estudos de Controle de Fármacos	62

6.2	Preparo e Avaliação das micropartículas (micropartículas)	62
6.3	Carga superficial das micropartículas	63
6.4	Análise morfológica (MEV)	63
6.5	Eficiência de Encapsulação (EE%)	65
6.6	Análise de perfil de intumescimento	66
6.7	Perfil de Liberação em pH's diferentes e cinética	70
6.8	Análise de DSC	80
6.9	Análise dos espectros UV-vis dos componentes	87
6.10	Análise de FTIR	88
6.11	Teste de Bioadesão com Mucina	96
6.12	Análise da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	98
6.13	Análise do isolamento de bactérias em peixes	103
7	DISCUSSÃO	109
8	CONCLUSÕES	118
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	120
	REFERÊNCIAS	121
	ANEXOS	132
9.1	Autorização para coleta de peixes pelo Comitê de Ética da uso de Animais (CEUA) 132	
9.2	Artigo publicado em revista de circulação internacional	132

1 INTRODUÇÃO

Desde os mais remotos anos (cerca de 2500 anos atrás) filósofos gregos já estudavam qual seria a unidade formadora da matéria. Hoje com o advento da criação de microscópios e equipamentos de detecção cada vez mais potentes, temos cada vez mais informações sobre a matéria em seu estado mínimo, além do átomo.

No momento em que os pesquisadores obtiveram mais informações sobre a constituição da matéria surgiu a possibilidade de rearranjar os átomos e moléculas de acordo com nossas necessidades, conceito este criado em 1959 por Richard P. Feynman, hoje considerado pai da nanotecnologia.

A nanotecnologia tem seu campo de atuação na escala de 1×10^{-9} (um bilionésimo de metro) e pode ser dividida em três grandes áreas: a nanoeletrônica que atua na fabricação de componentes eletrônicos como microchips e transistores; nanomateriais onde encontramos a utilização de materiais como grafeno e sílicas; por fim a área de nanobiotecnologia onde todos os esforços e materiais tem por objetivo a integração da escala nano para uso em áreas ligadas a vida.

No campo de atuação da nanobiotecnologia ocorre a integração dos diferentes campos da ciência como biologia, química, física, engenharias, medicina, informática e ciência dos materiais. Todos com o objetivo em comum de inovação de diferentes produtos aliados a vida, tanto para saúde como bem-estar.

A demanda mundial por pescado tem sofrido um significativo incremento nas últimas décadas, principalmente em função do crescimento populacional e da busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis.

O Brasil tem grande potencial aquícola devido a temperatura tropical e principalmente os grandes recursos hidrográficos. Nesta pesquisa focamos o estado de Rondônia (figura 1), onde ocorre a oferta de água em abundância devido a sua localização na bacia amazônica e ocorre a formação de bacias naturais.

Figura 1 - Estado de Rondônia ponto de coleta de espécimes para pesquisa.

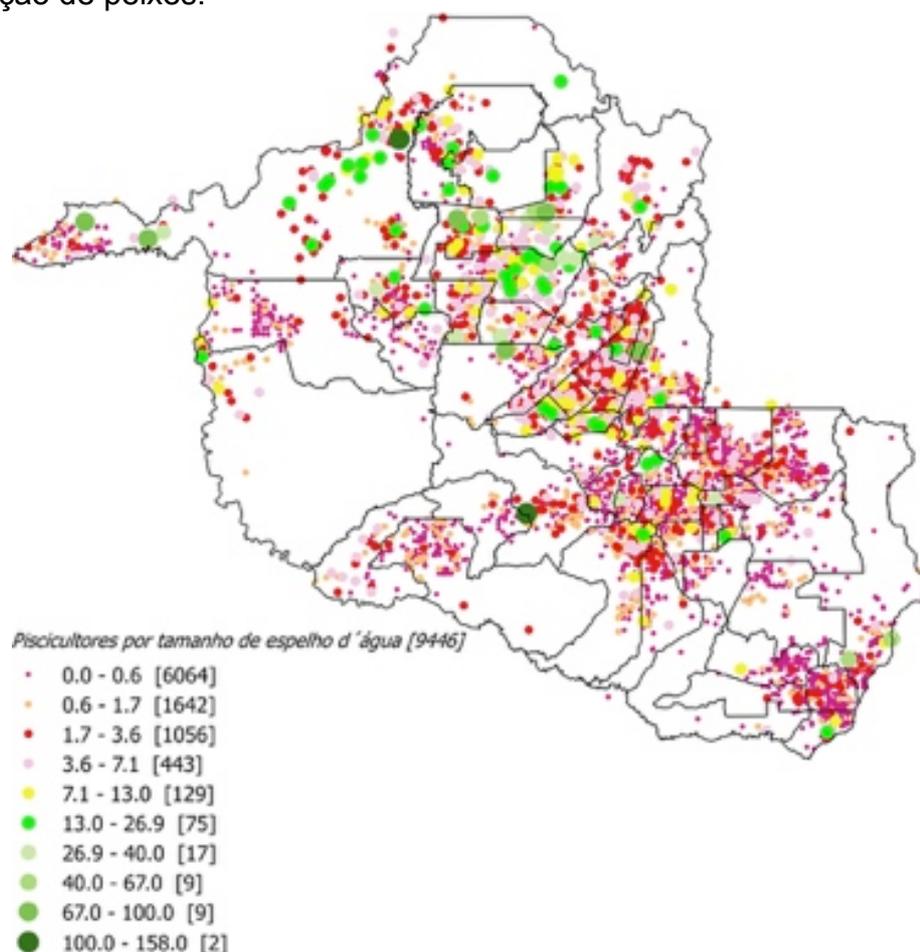


Fonte: IBGE

À região do estado de Rondônia, conhecida como Cone-sul onde se encontram as principais cidades do Estado (figura 2) encontramos os maiores espelhos d'água com produção de peixes como tilápias, tambaquis, tambacus e várias espécies de alevinos nativos do Estado e região Amazônica.

Estes tanques de criação em sua maioria são provenientes de represas e tanques escavados onde um tanque fornece água para o próximo formando uma cadeia de produção, onde temos a criação para corte e nos finais de semana as fazendas de criação são abertas para as atividades esportivas no modelo de pesque-pague onde o pescador pode levar o peixe para casa ou solta-lo de volta ao tanque.

Figura 2 - Rondônia - pontos de concentração dos espelhos d'água com produção de peixes.

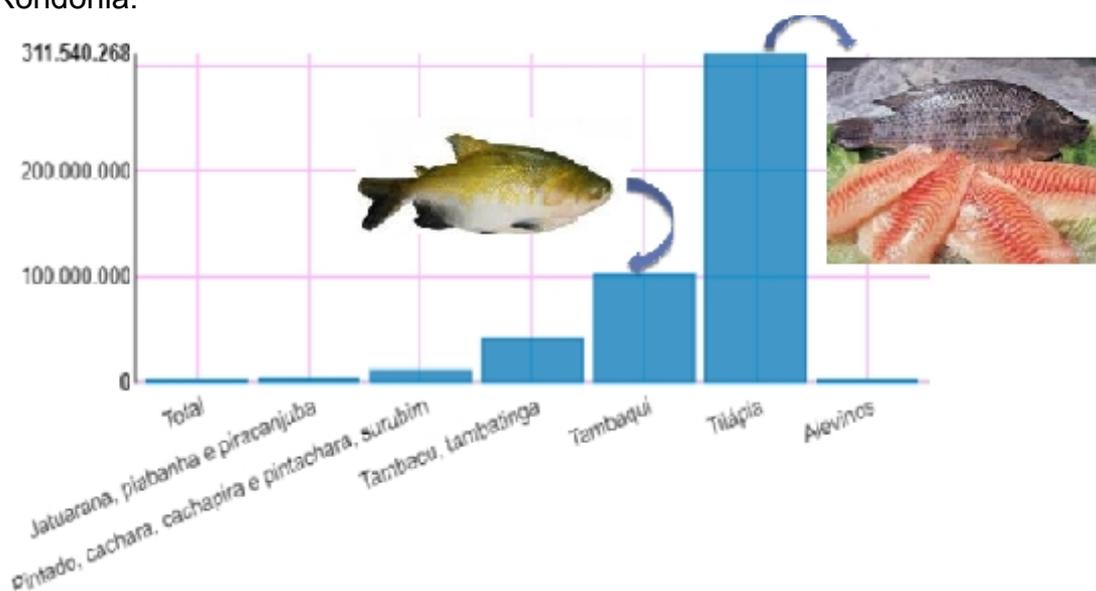


Fonte: IBGE

A aquicultura brasileira vem crescendo nos últimos anos, sendo a criação de tilápias (figura 3) a principal responsável por este aumento, representando cerca de cinquenta por cento da produção nacional.

O consumo de peixes no Brasil segundo o IBGE é de 14,5 Kg de peixe por habitante, sendo o consumo médio de peixe por habitante em nível mundial de 18,8 Kg, e o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 12 Kg, sendo assim podemos afirmar que estamos no caminho certo para uma alimentação variada e considerada por muitos como a mais saudável.

Figura 3 - Produção em toneladas de peixes na região do Cone - Sul de Rondônia.



Fonte: IBGE - Pesquisa da Pecuária Municipal

Fonte: IBGE

A utilização da aquicultura é uma estratégia muito favorável, pois, estimula uma cadeia produtiva completa que tem inúmeros elos, tais como: cultivo e produção; preservação e estocagem; venda e comercialização. Esta cadeia, pode ainda incentivar, substituir a pesca em rios, incentivando a preservação. Entretanto, a aquicultura pode ser tanto fortemente impactante quanto fortemente impactada, necessitando de um gerenciamento integrado, preditivo e estratégico, e de um monitoramento permanente.

Com a expansão da piscicultura no Brasil, a partir da década de oitenta, observou-se crescente interesse por parte dos criadores no que diz respeito aos prejuízos econômicos causados pela mortalidade de peixes, sendo que um maior número de espécies passou a ser cultivada. Desta maneira, houve a necessidade de aplicação de tratamento e controle das enfermidades.

Como qualquer criação de organismo vivo, a produção na piscicultura também está, diretamente, ligada ao grau de interferência que o homem exerce sobre um determinado cultivo. Pode-se prever que a piscicultura se tornará

cada vez mais intensiva. Para isso, é necessário que haja um desenvolvimento da economia como um todo, além da necessidade de novas tecnologia e investimentos elevados, é preciso um mercado que consuma um produto de alto valor.

Neste contexto, quando tratamos de tecnologia aliada a vida, não podemos deixar de comentar sobre os problemas enfrentados pelos produtores de proteínas animais para consumo humano. Mais especificamente sobre a aquicultura brasileira.

Com o crescente desenvolvimento da piscicultura no estado de Rondônia, a qualidade da água vem tomando impulso de grande interesse nesta linha de atuação, visto que, em um ambiente, água em condições inadequadas acarretará problemas no cultivo, levando os peixes à morte.

Os impactos negativos gerados pela aquicultura podem promover, dentre outros agravantes, a formação de florações de algas, afetando diretamente a biota aquática e, assim, promovendo rápidas alterações na qualidade da água.

Considera-se a água um ambiente favorável à proliferação de vários agentes patogênicos aos peixes, sendo as bacterioses responsáveis por grandes perdas nas pisciculturas.

A ocorrência de bacterioses em tanques de peixes na região norte do Brasil, mais especificamente a região do Cone-sul de Rondônia, motivou-nos a pesquisar a melhora da eficácia de administração de antibióticos nos peixes, através das técnicas mais atuais em nanotecnologia.

Considerando os fatores: saúde animal, uso de antibióticos e alimentação humana, é extremamente necessário que se invista recursos financeiros e humanos em se obter um meio eficaz de tratamento de bacterioses em peixes.

Neste trabalho utilizamo-nos dos conhecimentos já construídos ao longo do tempo sobre nanobiotecnologia para atingirmos o objetivo principal de formulação de um novo sistema de entrega de fármacos, constituído a base de polímeros naturais contendo fármacos conhecidos por seus efeitos bacteriológicos e bactericidas.

Este sistema é constituído de uma formulação contendo os fármacos bacitracina de zinco, berberina, nitroprussiato de sódio, agregados na matriz do polímero alginato de sódio e encapsulados com o polímero quitosana.

Pretendemos com este sistema oferecer uma possibilidade de controle de bacterioses encontradas em peixes em sistema de criação para corte e em peixes ornamentais em aquários.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A utilização dos recursos naturais para satisfazer as necessidades básicas da humanidade, tem aumentado constantemente, em virtude do crescimento demográfico (1–3). Crescimento este, que exige uma produção cada vez maior de alimentos, e dentre estes, destaca-se a produção de proteína animal como frango, suínos, bovinos e peixes (1–3).

A piscicultura entra neste cenário como uma atividade de natureza econômica que apresenta forte e rápido crescimento, trazendo alta produtividade e lucratividade para o país, geração de empregos e fornecimento de alimento (proteína animal) para a população (4,5).

Sabe-se que a água é um dos recursos naturais mais importantes e vitais para todos os ecossistemas. Dentre as discussões globais na atualidade uma das principais é a degradação ambiental por diversos contaminantes químicos, que apresentam sérias consequências para saúde humana e animal (6,7).

A contaminação do ambiente por medicamentos, principalmente antibióticos utilizados na produção animal, tanto na água como no solo é constante, o uso indiscriminado muitas vezes é devido a rápida seleção de microorganismos resistentes aos antibióticos utilizados (8–11) o que gera a necessidade da descoberta de novos fármacos ou a melhora dos meios de administração dos já utilizados (6,7).

A microbiota aquática é muito diversificada e está intimamente ligada aos aspectos físicos e químicos do ambiente (12), vários destes microorganismos fazem parte da microbiota associada aos peixes e são considerados oportunistas, e quando há um desequilíbrio no sistema (stress alimentar por manejo, por exemplo), diversas doenças são desencadeadas (9,12–14).

As bacterioses estão entre as maiores barreiras econômicas enfrentadas pelos produtores na criação de peixes para consumo humano e na manutenção de peixes ornamentais (1–4). As bacterioses destacam-se como importantes limitadores da produtividade, porque levam principalmente a perdas de

indivíduos (por morte), desde alevinos a indivíduos adultos prontos para o abate e comercialização, e ainda, provocam a perda de matrizes (5–7).

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Para este estudo foi escolhida a Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1758) (Figura 4) vulgarmente conhecida como Tilápia nilótica, é um ciclídeo nativo do continente Africano e da Palestina, encontrando-se difundidas por todo mundo, em vários países de clima tropical e subtropical, onde foram introduzidas deliberadamente ou acidentalmente (1,15,16).

Figura 4 - *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)



Fonte: <https://www.pisciculturasaojeronimo.com.br/>

Considerado como peixe de potencial para aquicultura, visto a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento, possui hábito alimentar onívoro, e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós larva até a fase de terminação (17), sendo considerada entre as espécies de peixes mais cultivadas, a que melhor resiste a alta temperatura, baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta concentração de amônia na água (1,15–17).

No Brasil, além da produção de Tilápias em escala comercial, encontramos um segmento que vem crescendo e sendo responsável pelo grande incremento da produção é o sistema de “pesque-pague”, que nos últimos anos ampliou em muito sua demanda (17).

A espécie *O. niloticus* é conhecida como uma espécie guardadora interna, ou seja, protegem a progênie na boca. Após a fertilização, coletam os ovos em sua boca onde os incuba, permanecendo sem se alimentar por duas semanas ou mais. Por esta razão, em nível comercial, são comercializados cultivos exclusivos de machos, e a técnica utilizada, consiste na reversão sexual de larvas de Tilápias por meio do uso de rações com hormônios masculinizantes em progênies recém nascidas por aproximadamente, três a quatro semanas de vida (16,17).

O conhecimento dos fatores que atuam na qualidade da água de viveiros de piscicultura é importante para um melhor gerenciamento desse empreendimento. O uso de indicadores como temperatura, oxigênio dissolvido (OD), potencial hidrogeniônico (pH) e condutividade elétrica auxiliam na identificação dos níveis de poluição da água, sendo utilizada uma boa manutenção aliada à ausência de contaminação, contribui para a manutenção da saúde dos peixes e, para melhor produção (1,15,17).

O pH em viveiros de peixes tem efeitos diretos na alimentação, crescimento e reprodução de peixes, os valores sem correção ficam em torno de 6,0 e 9,0 na água e entre 5,0 e 7,2 no solo do fundo do viveiro, ainda, no mesmo viveiro pode ocorrer variações diárias de uma ou duas unidades de pH (18).

A presença de sedimentos ácidos no fundo dos viveiros de aquicultura é um problema bastante comum, que exige a utilização de grandes quantidades de calcário agrícola para sua correção, objetivando um controle do pH entre 7,0 e 9,0 (18,19).

A escolha dos pH's, 5,0, 6,2 e 7,4 para realização deste trabalho, se deve as características do trato digestivo dos peixes, onde encontramos valores diferentes de pH's. Tilápias (onívoras) possuem o aparelho digestivo alongado com um comprimento que varia de 0,8 à 15,0 cm (20).

Os peixes onívoros (neste caso a Tilápia do Nilo) possuem dentes faringianos bem desenvolvidos (dispostos em placas ou ossos faringianos), que

são utilizados para esmagar e moer vegetais ou outros alimentos mais rígidos, facilitando a ação de enzimas digestivas devido ao aumento da área superficial do alimento (9,20).

Nestes peixes (Tilápias) a secreção de muco nos rastros branquiais e na faringe auxiliam na aglutinação de pequenas partículas durante a ingestão de alimentos. O muco produzido além de proteger o epitélio que reveste a boca, também serve de alimento às larvas quando incubadas na boca, além de possuir cofatores que auxiliam na digestão (20).

As secreções do estômago (suco gástrico) são produzidas na região fúndica e tipicamente incluem água, sais inorgânicos, muco (mucina), enzima proteolítica pepsinogênio, lipase gástrica e ácido clorídrico a 0,1 N. histologicamente o epitélio do estômago possui dois tipos de células secretoras: as mucóides, que produzem muco; e as células oxintopépticas, secretoras de ácido clorídrico e pepsinogênio (20).

Vários fatores estão relacionados com o estímulo da secreção do muco e do suco gástrico, entre eles, a presença de alimentos na luz do estômago, hormônios e estímulos neurais do nervo vago. O muco, alcalino, protege a mucosa estomacal da ação do ácido clorídrico e também da irritação mecânica dos alimentos, sendo secretado continuamente pelas células superficiais da mucosa gástrica (células mucóides), que secretam também íons bicarbonato. A estrutura do muco é tal que impede a difusão de íons H^+ . Isto, em conjunto com a neutralização efetuada pelo íon bicarbonato, permite que o pH da célula epitelial seja próximo de pH 7 e da luz gástrica seja ao redor de pH 2 (20).

Nos peixes herbívoros que possuem um pH estomacal bastante ácido (entre 1 e 2), como é o caso das Tilápias, têm a capacidade de decompor a clorofila e de quebrar as paredes celulares das algas verde azuladas, possibilitando, assim, uma subsequente digestão intestinal por permitir que as enzimas entrem em contato com o conteúdo das células vegetais (16,20).

A produção de ácido clorídrico é estimulada pela acetilcolina (nervo vago), gastrina e histamina, e ocorre nas células oxintopépticas. O ácido clorídrico ativa o pepsinogênio pela remoção de um peptídeo de baixo peso molecular, transformando-o na enzima pepsina, a qual continua o processo de transformação por autocatálise. Ataca fibras conjuntivas do tecido animal e a cobertura celulósica dos vegetais, complementando a mastigação. Atua

também na desnaturação das proteínas, tornando-as mais suscetíveis a subsequente hidrólise efetuada pelas proteases (20).

O suco entérico produzido na superfície luminal do intestino é o resultado das secreções oriundas das glândulas de Brünner e de Lieberkühn. O muco é secretado pelas glândulas de Brünner, que age como lubrificante, além de proteger a mucosa intestinal contra o ácido clorídrico proveniente do estômago, pois também contém HCO_3^- (íon bicarbonato), como nos mamíferos. Essas glândulas também secretam a enzima enteroquinase e uma amilase (20,21).

O baixo pH do duodeno (pela entrada do quimo) estimula a produção de secretina, um hormônio da mucosa intestinal. A secretina estimula o pâncreas a produzir uma secreção rica em íons bicarbonato (para neutralizar o HCl gástrico) e muito pobre em enzimas, o chamado suco pancreático. Peptídeos e nutrientes ingeridos, presentes na luz duodenal, estimulam a secreção da pancreozimina, hormônio também produzido na mucosa intestinal. A pancreozimina estimula o pâncreas a secretar pró-enzimas ou zimogênios (precursores enzimáticos da tripsina, quimotripsina, carboxipeptidases, amilase pancreática, lipase pancreática, quitinase, lecitinase, ribonuclease), sendo ativadas no intestino pela enteroquinase, produzida no epitélio intestinal pelos enterócitos e presente na superfície luminal do bordo em escova, que converte o zimogênio pancreático tripsinogênio em tripsina pela remoção de um hexapeptídeo N - terminal, como ocorre nos vertebrados superiores. A tripsina subsequentemente converte outras moléculas de tripsinogênio em tripsina. Assim a enteroquinase desencadeia uma cascata de atividade proteolítica, pois a tripsina é o ativador comum de todos os zimogênios pancreáticos. A tripsina (uma endopeptidase) é a enzima proteolítica predominante no intestino e é ativada em um pH entre 7 e 11. Nos peixes que se alimentam de insetos ou crustáceos o suco pancreático contém grande concentração de quitinases para quebrar a quitina existente no exoesqueleto desses animais (20).

Os peixes em piscicultura são passíveis de contaminação por agentes patogênicos, as vezes por falta de conhecimento de manejo, instalações, densidade de estocagem e necessidades nutricionais dos peixes (16), como também efeitos causados pelo estresse agudo e crônico em Tilápia do Nilo, devido a interação social e hierárquica entre os peixes (22).

O estresse (1,22,23) no peixe é geralmente definido como o distúrbio do equilíbrio interno (homeostase). É o primeiro passo para a ocorrência da doença, pois reduz a resistência do peixe e o torna mais suscetível a doenças. Portanto, a extensão do estresse e a capacidade dos peixes de resistir e manter a homeostase são mais importantes para a sobrevivência e o crescimento. O estresse pode ser causado por diferentes fatores, incluindo:

- Diferenças nutricionais (por exemplo, desequilíbrios vitamínicos).
- Qualidade ambiental e condições de cultura.
- Bem-estar do animal cultivado.
- Interferência física, química e biológica (apinhamento, manuseio, transporte, poluição, enriquecimento orgânico, etc.).

As tilápias são bem adaptadas às mais variadas condições ambientais (por isso temos uma distribuição mundial da espécie) e podem tolerar uma ampla gama de fatores ambientais, tais como temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, amônia, etc. No entanto, condições estressantes afetam adversamente a tilápia e as tornam mais suscetíveis a diferentes doenças, presumivelmente devido à imunossupressão (1,20,22,23).

El-Sayed e colaboradores (23) descobriram que o manejo do estresse causou um aumento significativo nos níveis séricos de cortisol da tilápia, e o nível de cortisol dependeu da severidade do estressor, duração da exposição e estado de saúde dos peixes. A remoção do estressor resultou em um rápido retorno ao nível normal de cortisol.

As bactérias são encontradas naturalmente no intestino da tilápia e podem se infectar quando as condições ambientais e culturais se tornam desfavoráveis (8).

Bacterioses

Entre as bactérias que contaminam peixes em tanques de criação ou aquários domésticos destacamos a espécie *Staphylococcus aureus* sendo considerada uma bactéria patogênica oportunista, cuja doença transmitida por alimentos é classificada pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (24) no grupo de risco III, que inclui as

doenças de “perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas autolimitados, mas que causam severo desconforto em humanos”. Já em peixes a infecção provoca perdas (morte dos indivíduos) em tanques de peixes para criação em tanques e aquários em geral (25–28).

De acordo com Schleifer (29,30) as células dos estafilococos são esféricas e caracteristicamente se dividem em mais de um plano, formando arranjos que lembram cachos de uvas. Gram positivos, imóveis, não esporogênicos. Catalase usualmente positiva e oxidase usualmente negativa. Quimioorganotróficos, apresentam metabolismo de carboidratos respiratório e fermentativo. São susceptíveis à lise por lisostafina e resistentes à lise por lisozima, predominantemente associados à pele, glândulas e mucosas de animais.

O *S. aureus* é tolerante ao sal (NaCl), de acordo com Schleifer (29,30) cresce muito bem em meios com 10 % de NaCl e pobremente em 15 %. De acordo com a FDA (Food and Drug Administration) (31), sob condições ideais cresce em atividade de água de 0,83 %, com ótimo desenvolvimento em 0,99 % de NaCl. Sob este aspecto é uma espécie atípica entre as bactérias patogênicas de origem alimentar, que normalmente não cresce em água. O *S. aureus* cresce em temperaturas na faixa de 7 a 47,8 °C com incremento pleno em 35 °C, a faixa de pH de crescimento vai de 4,5 a 9,3 com crescimento considerado ótimo na faixa de pH entre 7,0 e 7,5 (31).

As doenças causadas por *S. aureus* são citadas por Bien (32) em três categorias:

- i) Lesões superficiais tais como a infecção de feridas,
- ii) toxinoses tais como intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico, e
- iii) condições sistêmicas e com risco de vida como endocardite, osteomielite, pneumonia, abscesso cerebral, meningite e bacteremia.

Existem ainda vários tipos de toxinas associadas as doenças provocadas por *S. aureus*. As toxinas alfa, beta, delta e gama, por exemplo,

são leucocidinas envolvidas na lise de células e na invasão de tecidos (32,33). As Exfoliativas Toxins (ETs) também conhecidas como toxinas epidermolíticas, são responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada, caracterizada pela perda de camadas superficiais da pele, desidratação e infecções secundárias (32,33).

A Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma doença de início agudo, caracterizada por febre, erupções na pele e hipotensão, podendo levar à insuficiência múltipla de órgãos e choque letal (32,33).

As bactérias dos gêneros *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* estão entre os patógenos que mais causam perdas econômicas, sendo responsáveis por grande parte das doenças dos peixes cultivados para corte (1,2,8,9), nos gêneros citados destacam-se as espécies *S. iniae*, *S. aureus*, *S. shiloi* e *S. agalactiae* (1,2,8,9).

As bacterioses causadas pelos gêneros *Streptococcus spp.* *Staphylococcus spp.* caracterizam-se ao microscópio por um cocobacilo gram-positivo, catalase negativo, organizado em pares ou em cadeias. Geralmente ao colonizar o organismo desencadeiam um processo inflamatório (6), causando septicemia hemorrágica em peixes, os quais apresentam ainda, lesões superficiais e hemorrágicas focais como petéquimas, e exoftalmia, internamente pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins, com pontos de necrose característicos (1,2,8).

A transmissão ocorre por contato direto entre peixes infectados com peixes sadios, e por contato indireto, pela bactéria presente na água, permitindo que a doença se manifeste gradativamente em diferentes tanques de uma mesma propriedade pelo manejo inadequado da qualidade da água e da nutrição dos peixes (6,8,9,11,34).

A estreptococose é comumente observada em peixes variando de 50 gramas até matrizes com peso acima de um quilo, mas predomina na fase de engorda, sendo os peixes entre 400 - 600 gramas, os mais acometidos (8,9). Desta forma, alevinos e juvenis de Tilápias parece não manifestar a doença devido as práticas assépticas utilizadas na fertilização das ovas nos criadouros

(8), contudo não é descartada a possibilidade destes serem portadores assintomáticos e introduzirem a bactéria no sistema de produção.

Dentre os tratamentos mais efetivos realizados nos tanques de peixes de criação para consumo *in natura* ou processado, destaca-se a administração de antibióticos injetáveis nos indivíduos um a um o que demanda muito tempo e mão de obra, pois os peixes devem ser capturados, sedados e posteriormente devolvidos ao tanque, neste processo ocorre a possibilidade de não atingir todos os indivíduos do tanque de criação (3,4).

Convencionalmente são utilizados antibióticos das classes, tais como: aminopenicilinas, fenicol, macrólitos, aminoglicosídeos, nitrofuranos, quinolonas, fluroquinolonas e tetraciclina (10–12), adicionados a alimentação (ração) neste método ocorre um índice de alcance de cerca de 90 %, pois todos os peixes irão de alimentar em algum momento, e assim ingerir o fármaco (3,4), ou colocados diretamente na água (no caso de aquários).

Microencapsulação e sistema de entrega de fármacos

O desenvolvimento de sistemas inovadores de administração de medicamentos, versáteis para diferentes características dos medicamentos, com melhor eficácia e segurança, sempre esteve em alta demanda (35–38), nisto surge a microencapsulação devido à alta eficácia e elevada aplicabilidade em campos terapêuticos e farmacêuticos.

A tecnologia de microencapsulação traz vantagens adicionais aos meios convencionais de administração de fármacos. Este processo melhora a estabilidade dos ativos diante das características físico-químicas do sistema biológico, fornecendo uma barreira física que permite proteger os fármacos das ações do organismo como: diferenças de pH, calor, oxidação, luz e umidade (39–43).

Os hidrogéis são considerados macromoléculas ligadas em rede, passíveis de intumescimento em água ou em fluidos biológicos (38,44–46), quando formados por quitosana e alginato, devido à natureza catiônica da

quitosana em solução, permite a produção de complexos iônicos com espécies aniônicas como o alginato (47,48), neste contexto, o sistema formado tem a capacidade de transportar fármacos em sua rede polimérica.

As propriedades físicas e químicas das micropartículas (pequenas partículas em formato de esferas formadas após a reticulação de quitosana com alginato de sódio) apresentam um importante papel na determinação da taxa de liberação de fármacos incorporados, sendo que o meio utilizado para a dissolução tem um efeito decisivo em sua cinética de liberação (49,50).

Essa abordagem está na base dos chamados sistemas "multimodais" que exploram efeitos aditivos ou sinérgicos decorrentes da geração de várias espécies terapêuticas na mesma região do espaço (51–54), com o objetivo final de maximizar a eficiência de o tratamento. Esta associação entre os fármacos produz o efeito total maior do que cada uma das substâncias separadamente, ou seja, apresentam efeito sinérgico (51-54).

Quitosana

A quitosana é o segundo polímero natural mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Estima-se que cerca de 150.000 toneladas de quitina estejam disponíveis anualmente para uso comercial. No entanto, apenas alguns milhares de toneladas são realmente utilizados em todo o mundo (56).

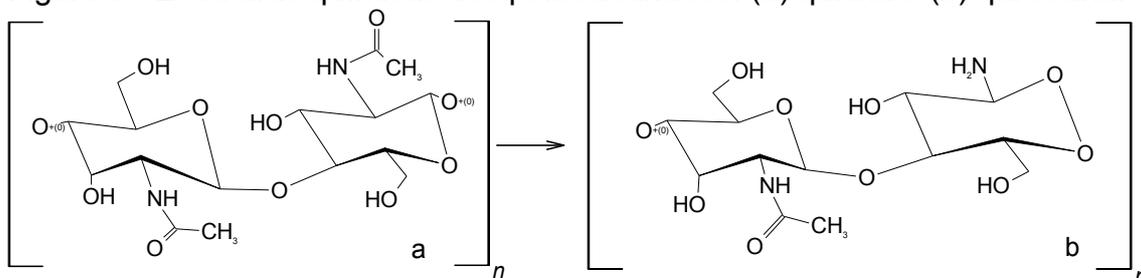
A quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, como também o alginato de sódio, a carragenina, a gelatina e outros polissacarídeos (57–59).

A quitosana (Figura 5) é um derivado da quitina, biopolímero natural presente principalmente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos. A quitina é constituída de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações β -(1→4) que, quando desacetilada, resulta na estrutura β -(1→4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, conhecida como quitosana (56).

O interesse crescente pela quitosana deve-se às suas propriedades químico-físicas e biológicas (hidrófilas, carregadas positivamente, biodegradáveis, não tóxicas e biocompatíveis). Estes compostos possuem uma elevada capacidade de sorção para íons metálicos e são propensas a modificação química. Como resultado, muitas aplicações para tais materiais são concebíveis incluindo tratamento de águas residuais, preparações farmacêuticas e cosméticas, complexação de metais pesados e catálise heterogênea (60,61).

A estrutura da quitosana pode ser modificada quimicamente por meio de reações de desacetilação carboximetilação, oxidação, entre outras, as aplicabilidades deste material parecem ilimitadas.

Figura 5 - Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.



Fonte: Autor, por meio do programa ACD/ChemSketch.

Dentre as propriedades de quitosana e quitina, destacam-se sua biocompatibilidade, bioadesividade, atuação na abertura das junções epiteliais (62), possuindo ainda ação antimicrobiana, capacidade de ativar macrófagos, estimular a migração e proliferação celular, além de orientar a reorganização da histo-arquitetura celular (47,61,63).

Após a dissolução em ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos, a quitosana forma um polieletrólito viscoso e suas soluções são, geralmente, miscíveis com outros polímeros, formando complexos e quelato. A presença de grupos amino na molécula da quitosana permite que esta seja modificada quimicamente quando desejável (61,62,64)

Em pH ácido, abaixo do seu pKa, as aminas primárias presentes na cadeia polimérica encontram-se positivamente carregadas. Essas aminas protonadas são capazes de interagir eletrostaticamente com os grupos negativamente carregados presentes nos ácidos nucleicos (DNA, siRNA e

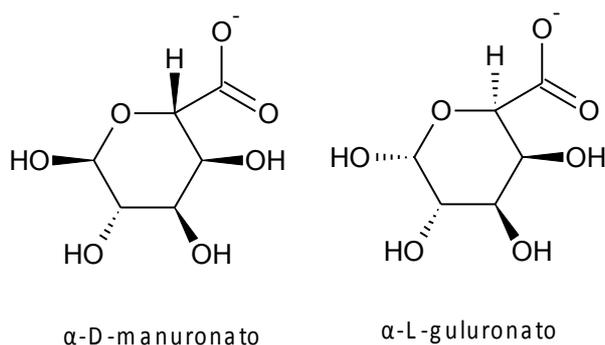
oligonucleotídeo curto de fita simples) (65). Esta interação gera a formação espontânea, em meio aquoso, de complexos em escala nanométrica chamados de poliplexos (60).

Esta capacidade de formar estruturas tanto nanométricas como micrométricas, chamou nossa atenção para utilizá-la como sistema de transporte para fármacos com potencial para tratamento de bacterioses em tanques de peixes.

Alginato de sódio

Outro polissacarídeo estudado em nosso grupo de trabalho é o alginato de sódio (Figura 6), que é um copolímero linear polianiónico de resíduos de ácido 1,4-ligado-gulurônico e ácido d-manurônico encontrados em algas marrons, que podem formar uma estrutura reticulada quando em contato com íons Ca^{2+} . Alginato gel pode ser usado para produzir sistema de partículas de liberação sustentada para vários medicamentos, proteínas e até mesmo células.

Figura 6 - Fórmula molecular estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de α -L-guluronato e M, os copolímeros de α -D-manuronato.



Fonte: Autor, por meio do programa ACD/ChemSketch.

Uma das técnicas mais eficazes e reprodutivas para a formação de partículas é a gelificação ionotrópica, este método permite a formação de partículas esféricas com forma regular, tamanho adequado e superfície lisa, bem como a preparação da membrana retardadora de liberação ideal (66).

Uma vez que o alginato é um copolímero aniônico com grupos carboxila terminais, o mesmo é considerado um bom agente mucoadesivo. Estudos têm demonstrado que o alginato tem a maior resistência mucoadesiva em comparação com polímeros como o poliestireno, quitosana, carboximetilcelulose e o ácido polilático (44,46,47,67,68). Devido à aderência de partículas de alginato aos tecidos da mucosa, o tempo de trânsito da proteína é retardado e o fármaco é localizado nas superfícies absorptivas, melhorando a biodisponibilidade e a eficácia dos medicamentos (41,69).

A liberação de macromoléculas de micropartículas de alginato em soluções de pH baixo também é significativamente reduzida, o que poderia ser vantajoso no desenvolvimento de um sistema de administração oral. Diversos trabalhos apresentados na literatura relatam que o alginato se contrai a pH baixo (ambiente gástrico) fazendo com que os fármacos encapsulados não sejam liberados (66). Quimicamente o que ocorre em baixo pH é a conversão do alginato de sódio hidratado em ácido algínico o qual é insolúvel. Uma vez atinja tecidos com pH mais alto como o intestino, a camada superficial de ácido algínico é convertida numa camada viscosa solúvel (66).

Este comportamento do alginato, dependente do pH, pode ser explorado para personalizar perfis de liberação. No entanto, a rápida dissolução de matrizes de alginato nos intervalos de pH mais elevados pode resultar na liberação de fármacos proteicos e subsequentemente na desnaturação dos mesmos por enzimas proteolíticas (66). Portanto, são necessárias muitas modificações nas propriedades físico-químicas para a liberação prolongada controlada de fármacos proteicos.

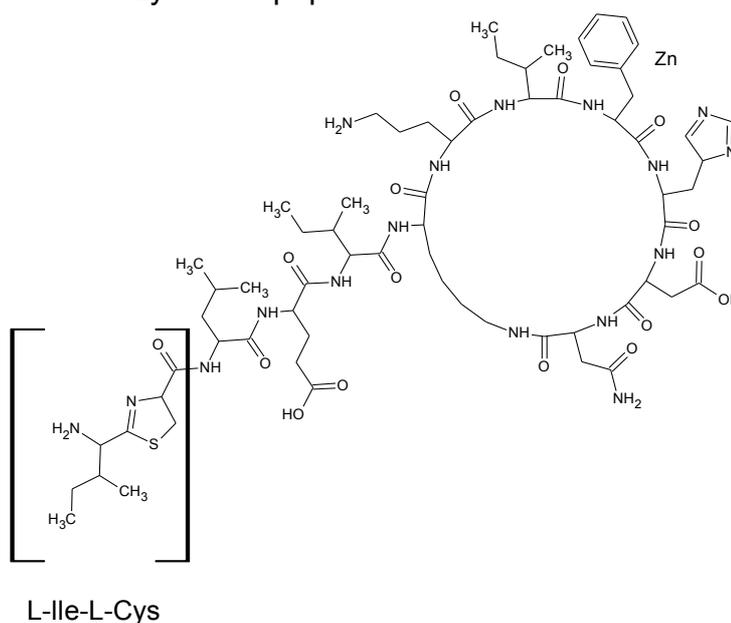
Os polímeros resultantes da complexação de alginato e quitosana são muito utilizados na forma de hidrogéis, que são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de absorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação química ou física. Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímero como grupos amino e carboxílicos que possuem afinidade com a molécula de água. Os hidrogéis tem uma vasta aplicação no campo biomédico e farmacêutico como sistemas de

estável e, em soluções com pH acima de 9, a mesma se degrada rapidamente em temperatura ambiente (74).

O mecanismo de ação no pirofosfato lipídico que não é explorado por outros agentes antibacterianos comumente utilizados, faz dela um agente promissor para controle de bacterioses, embora tenha sido utilizada por mais de 70 anos em humanos, não temos relatos de seu uso em peixes.

Produzida por *Bacillus licheniformis* com uma mistura de peptídeos intimamente relacionados, estes são sintetizados por peptídeos sintéticos não ribossômicos e contém aminoácidos D e L. Os peptídeos são ciclizados em estruturas via condensação do grupo ϵ -amino de uma cadeia lateral de lisina com o terminal C do peptídeo (72). Figura 8.

Figura 8 - Estrutura da bacitracina A. O antibiótico é formado pela ciclodesidratação de Cys-2 com o esqueleto para formar o anel tiazolina, juntamente com a formação de estrutura por meio de uma ligação isopeptídica entre o grupo ϵ -amino de Lys-6 e o peptídeo C.



Fonte: Autor, por meio do programa ACD/ChemSketch, adaptado de Nicoleta (2013) (72)

Segundo Nicoleta (2013), o zinco tem a função eletrostática e estrutural, ajudando a neutralizar a carga negativa do grupo pirofosfato e também liga dois átomos de oxigênio do pirofosfato aos átomos de oxigênio da cadeia principal e da cadeia principal do antibiótico. No complexo ternário, a bacitracina adota um comportamento altamente anfipático, tendo todas as cadeias laterais polares

segregando de um lado da molécula, enquanto o lado não polar se encontra no lado oposto. A maioria das cadeias laterais polares está diretamente envolvida no reconhecimento de metais ou do grupo pirofosfato, enquanto as cadeias laterais não polares formam um colar hidrofóbico que circunda o canal de saída através do qual a cadeia lipídica se estende para fora do local de ligação. Dentro da rede cristalina, as faces hidrofóbicas de múltiplas moléculas se associam umas às outras. Na presença de uma membrana celular bacteriana, no entanto, a face hidrofóbica presumivelmente se associa à membrana lipídica, com a ligação do pirofosfato ao lipídio e a subsequente ruptura da biossíntese da parede celular (72–74).

Na medicina veterinária, a bacitracina de zinco, além de antimicrobiano, é utilizado como aditivo promotor de crescimento. Segundo o Comité Misto FAO / OMS de Peritos em Aditivos Alimentares Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) é um comitê científico especializado internacional, que é administrado conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela União Europeia, o promotor é utilizado nas seguintes proporções: em frangos de corte 5 a 50 ppm, poedeiras 10 a 25 ppm, perus 4 a 50 ppm, outras aves 5 a 20 ppm, suínos 10 a 40 ppm, bovinos 30 a 7 ppm, em peixes não foram identificados trabalhos que citam seu uso (75).

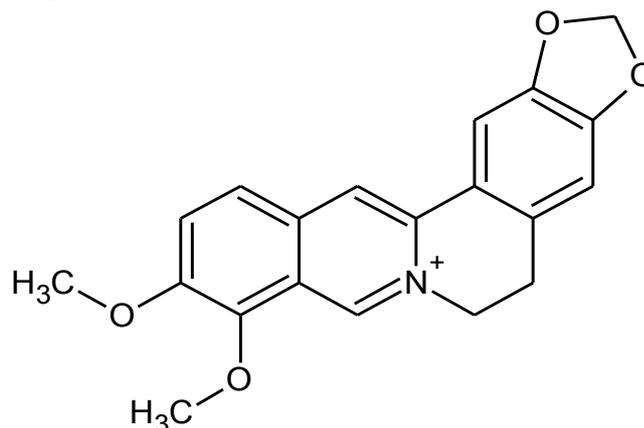
Berberina

Como complemento ao antibiótico bacitracina, ainda utilizamos na formulação das micropartículas, por nós produzidas, a berberina, caracterizada como um alcalóide isoquinolina presente em várias plantas, incluindo *Coptis sp.* e *Berberis sp.*

A berberina (Figura 9) é um componente habitual na medicina chinesa e caracterizada por uma diversidade de efeitos farmacológicos, como antibacteriana, anti-inflamatória, etc., (52). Barberry (*Berberis vulgaris* L. família Berberidaceae) é bem conhecida no oriente e várias partes desta planta,

incluindo a sua raiz, casca, folhas e frutas têm sido utilizados como medicina popular.

Figura 9 - Molécula da Berberina.



Fonte: Autor, por meio do programa ACD/ChemSketch.

Estudos realizados sobre a composição química da planta mostram que os constituintes mais importantes desta planta são os alcaloides da isoquinolina, como berberina, berbamina e palmatina (76). A berberina representa um dos mais estudados entre os alcaloides protoberberinos de ocorrência natural. Além de *B. vulgaris* (Berberis), a berberina está presente em muitas outras plantas e é usada para o tratamento de diferentes doenças, como inflamações do trato digestório, respiratório e sistema excretor, além de ser um ótimo antibacteriano natural (52,76).

A berberina é um quaternário do tipo, alcalóide biossintetizado por espécies das famílias de plantas Berberidaceae e Ranunculaceae, seu esqueleto pentacíclico (Figura 9) é derivado de um sistema benziltetrahydroisoquinolínico com a incorporação de um átomo de carbono extra, fornecido pela S-adenosilmetionina por meio de um grupo N-metila (77,78). Este carbono extra-esquelético é conhecido como ponte de “ponte berberin”. A formação da ponte berberina é prontamente racionalizada como um processo oxidativo no qual o grupo N-metila é oxidado a um íon imínio, e

uma ciclização para o anel aromático ocorre em virtude do grupo fenólico (77,78).

No aspecto mecanicista, a berberina tem uma potente atividade inibitória contra a sortase A (SrtA) e a sortase B. A inibição das enzimas sortase resulta em uma redução acentuada na virulência e no potencial de infecção de *S. aureus*, por isso pode ser um importante mecanismo na atividade antibacteriana da berberina (76). A berberina ainda interfere na aderência dos estreptococos do grupo A às células hospedeiras, impedindo a complexação do ácido lipoteicoico com fibronectina ou pela dissolução de tais complexos, uma vez formados, e também inibe a adesão de *E. coli* uropatogênica a células epiteliais por uma redução na síntese de subunidades fimbriais (76,77,79).

Sua ação bactericida é conhecida no tratamento de *B. vulgaris*, infecção bacteriana relacionada com diarreia, infecções intestinais parasitárias e oculares. Estudos de Zhongguo Zhong (2009), demonstraram atividade bacteriana e antifúngica significativa para *Staphylococcus aureus* e *Cândida spp.* a associação com antibióticos também é citada no trabalho, demonstrando uma interação entre os dois fármacos, potencializando seus efeitos.

Conforme relatado por Imenshahidi et. al (52) a berberina tem um efeito sinérgico com alguns antibióticos comuns, especialmente com linezolida, cefoxitina e eritromicina. Isso sugere o uso potencial da berberina em combinação com outros antibióticos como uma ferramenta terapêutica eficiente para infecções bacterianas resistentes a antibióticos.

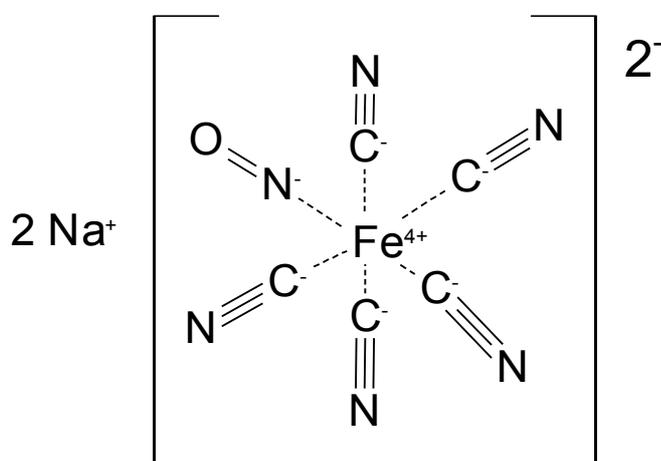
Nitroprussiato de sódio

As bacterioses em geral desencadeiam um processo inflamatório nos organismos contaminados (80) especialmente em peixes, assim, embora mais conhecido por suas importantes funções de sinalização na fisiologia humana, o óxido nítrico (NO), também possui um considerável interesse terapêutico. Como tal, os sistemas baseados em partículas que permitem a entrega exógena sustentada de óxido nítrico foram objeto de uma investigação considerável nos últimos anos (81). Além do seu papel nos processos de

sinalização biológica e em várias patologias, o NO também demonstrou algum potencial como agente terapêutico. Em particular, a entrega exógena de NO demonstrou ter alguma atividade contra células tumorais (82–84) e potencialmente útil em aplicações antimicrobianas (82).

Com o aumento da resistência aos antibióticos, tornando-se um problema clínico, os novos antimicrobianos que liberam NO podem ser benéficos clinicamente sozinhos ou aplicados ao lado de antibióticos tradicionais. Para nossos estudos utilizaremos o Nitroprussiato de Sódio como doador de NO. (Figura 10).

Figura 10 - Molécula do Nitroprussiato de Sódio.



Fonte: Autor, por meio do programa ACD/ChemSketch.

Pretende-se, utilizar partículas de Alginato recobertas com Quitosana contendo Bacitracina (BAC), Berberina (BER), e Nitroprussiato de Sódio (NPS) encapsuladas em sistemas nanoestruturados/microestruturados, para utilização em tanques de criação para controle de bacterioses em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A cobertura nas partículas produzidas é essencial para a estabilização das mesmas em modelo experimental *in vitro* e *in vivo*; na tentativa de proteger o fármaco, evitando seu contato direto com o ambiente externo até que atinja seu alvo.

Para que um medicamento tenha o efeito desejado é necessário que o mesmo permaneça no trato digestório o tempo suficiente para que ocorra a

absorção. Neste contexto destacam-se as mucinas como agentes de aderência intestinal.

De acordo com a literatura (39,69,85,86) as glicoproteínas de mucina desempenham um papel importante na proteção do intestino contra lesões químicas ou físicas, mas os mecanismos de proteção e a possível relação entre a estrutura e a função da mucina não estão completamente compreendidos (82).

Estruturalmente, as mucinas intestinais purificadas são um grupo heterogêneo e polidisperso de glicoproteínas de grande peso molecular que apresentam diferenças regionais e de desenvolvimento na composição.

A mucina recém-sintetizada contém mais proteínas e menos carboidratos do que a mucina adulta e difere da mucina adulta em densidade flutuante e mobilidade na eletroforese (82).

A função primária da mucina, proteção do intestino, parece depender de pelo menos quatro fatores: a taxa e a quantidade de liberação de mucina; a barreira física do cobertor de muco viscoso; a provisão de locais de ligação inibitória específicos a agentes e proteínas infecciosas e a inclusão de imunoglobulinas secretoras para fornecer uma ligação ao componente imunológico do sistema de defesa do hospedeiro intestinal (61).

O muco secretado pelo intestino pode fornecer uma ligação entre os componentes físicos e imunológicos do sistema de defesa do hospedeiro (69).

Com base nas informações sobre perdas ocasionadas por bacterioses na produção comercial de peixes que somam quantias na faixa de milhares de dólares (16), apresentamos este sistema de entrega controlada dos fármacos onde os mesmos foram conjugados em um sistema sinérgico.

Os Fármacos bacitracina de zinco, berberina e nitroprussiato de sódio, apresentam propriedades bacteriostáticas e bactericidas e após a funcionalização serão adicionados a rações para fornecimento em tanques de peixes na fase de engorda, e em aquários (com grandes volumes de água) contaminados por bactérias.

A proteção oferecida aos fármacos pelo encapsulamento com quitosana e alginato de sódio tem a finalidade de protegê-los e manter sua estabilidade química e física, por estarem aprisionados na matriz de alginato de sódio.

Após a ingestão das micropartículas espera-se que a interação mucina do intestino reaja com as ligações químicas da quitosana, mantendo a aderência pelo tempo necessário para a liberação dos fármacos da matriz.

Por se tratar de materiais de custo relativamente baixo e método de produção simples e sem a necessidade de equipamentos caros, espera-se que nosso sistema possa ser utilizado como uma alternativa ao uso de antibióticos diretamente na água, e assim evitar a contaminação direta e seleção de bactérias resistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi o de pesquisar e desenvolver sistema de entrega de fármacos a base de polímeros naturais que agem como bactericidas e bacteriostáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar as micropartículas propostas (ALG_QUIT_NPS_BER_BAC) quanto ao diâmetro, carga superficial, eficiência de encapsulação, perfil de liberação dos fármacos;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de ALG_QUIT_NPS_BER_BAC em cultura padrão de bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* de ALG_QUIT_NPS_BER_BAC em cultura de bactérias isoladas de espécimes (*Oreochromis niloticus*) contaminados de tanques de criação de peixes;
- Isolar e identificar bactérias encontradas em peixes doentes ou mortos de tanques de criação, bactérias consideradas oportunistas de peixes.

4 JUSTIFICATIVA

Atualmente as bacterioses, são consideradas grandes barreiras econômicas enfrentadas na produção de peixes em tanques e aquários domésticos.

A utilização de antibióticos em ambientes aquáticos apresenta grandes entraves, devido ao fato dos mesmos se solubilizarem com facilidade na água, e com isto não haver um controle na dose recebida pelo indivíduo infectado.

Assim, espera-se que os fármacos encapsulados e introduzidos na alimentação possibilitem que o fármaco seja consumido e só então liberado no sistema digestório do animal, efetivando a ação bacteriostática e/ou bactericida no organismo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Os reagentes e equipamentos aqui listados encontram-se nos laboratórios da Universidade de Brasília, Campus Faculdade de Ceilândia.

5.1.1 Equipamentos

Abaixo segue listagem de equipamentos utilizados na execução dos estudos:

- Agitador de tubos vortex, marca Logen Scientific[®], modelo LSM56-III e marca IKA[®] modelo Labdance;
- Balança analítica, marca Shimadzu[®], modelo AX200;
- Capela de fluxo laminar unidirecional marca Veco[®] modelos CFLV09 e CFLV12;
- Chapa de agitação e aquecimento marca Logen Scientific[®] modelo LS61-220;
- Espectrofotômetro UV-vis marca Hitachi High-Tecnologies Coporation[®], modelo U-3900H;
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL, marca Kasvi[®], modelo Ecopipette;
- Microscópio Eletrônico de Varredura FEI QUANTA 250 A[®];
- Centrífuga de bancada para microtubos, marca Eppendorf[®], modelo MiniSpin;
- Dispersador de alto desempenho Ultraturrax, marca IKA[®], modelos T25, equipado com o elemento de dispersão S25N-25F;
- Espectrofotômetro de fluorescência, marca Hitachi High-Technologies Corporation[®], modelo F-7000;
- Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier, marca Shimadzu[®], modelo IRPrestige-21;
- Espectrofotômetro para microplacas, marca SpectraMax[®], modelo M2;
- Espectrofotômetro Ultravioleta-visível (UV-vis), marca Hitachi High Technologies Corporation[®], modelo U-3900H;

- Estufa incubadora de CO₂, marca Thermo Scientific[®], modelo 8000 WJ;
- Instrumento para análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC), marca Shimadzu[®], modelo DSC-60A;
- Medidor de tamanho e potencial zeta, marca Malvern Instruments Limited[®], modelo Zetasizer Nano ZS;
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 µL, 20-200 µL e 100- 1.000 µL, marca Capp[®], modelo Ecopipette;
- Microscópio eletrônico de varredura marca FEI[®] modelo Quanta[®] 250 FEG;
- Microscópio óptico de luz invertido marca Olympus[®], modelo CK2.

5.1.2 Reagentes

Os materiais abaixo listados foram utilizados sem prévia purificação, exceto quando indicado pelo fabricante. Segue a lista:

- Berberina (BS MM 320,54 g/mol de Sigma Chem. Co.;
- Alginato de Sódio (MM: 584,44 g/mol Merck);
- Quitosana de baixo peso molecular viscosidade de 20-300 cP, 1 wt. % in 1,0 % ácido acético (25 °C, Brookfield) (lit.) (Sigma Chem. Aldrich);
- Cloreto de Cálcio (MM: 116,44 g/mol, Vetec Química Fina[®];
- Ácido acético (C₂H₄O₂ MM: 60,04 g/mol⁻¹ Dinâmica, P.A.);
- Álcool etílico P.A. ACS, C₂H₆O, MM 46,06 g/mol, dosagem mínima 95,0 %; densidade 0,81 g/mL, marca Vetec Química Fina[®];
- Brometo de potássio, KBr, massa molar de 119,0 g/mol, grau FTIR, pureza acima de 99,0 %, marca Sigma-Aldrich[®];
- Fosfato de sódio dibásico dihidratado P.A., Na₂HPO₄.2H₂O, massa molar de 178,0 g/mol, grau de pureza acima de 99,0 %, marca Vetec Química Fina[®];
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado P.A., NaH₂PO₄.H₂O, massa molar de 138,0 g/mol, grau de pureza acima de 98,0 %, marca Vetec Química Fina[®];

- Soro fetal bovino, SBF, certificado, originado dos Estados Unidos da América, nível de endotoxinas abaixo de 5,0 unidades/mL e nível de hemoglobina abaixo de 10,0 mg/dl, marca Gibco®;
- Mucina tipo II (Sigma Aldrich®)
- Nitroprussiato de sódio, NPS, ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) massa molar 298,0 g/mol, grau de pureza acima de 99,0 %, marca Sigma Aldrich®

Todos os demais reagentes utilizados durante a execução deste projeto apresentaram grau analítico de pureza e não foram necessários processos extras de purificação.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Preparo das soluções estoque

As soluções estoques de Berberina, Bacitracina e Nitroprussiato de Sódio foram preparadas utilizando-se 50 mL de água destilada e as concentrações obtidas foram de 1,0 mmol para cada fármaco. As concentrações foram calculadas por meio da equação de Lambert-Beer (Equação 1).

Quando necessário, medidas de massa foram realizadas em triplicata, zerando a balança antes de cada medição, usando luvas, pinças e espátulas. Soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema ultrapurificador de água da marca Elga®, modelo Purelab Classic DI MK2, operado a 14,0 m Ω .cm.

Com a finalidade de dar mais agilidade aos processos de produção dos sistemas e aumentar a reprodutibilidade dos ensaios propostos, foram preparadas as soluções estoques e armazenadas em refrigerador para uso posterior.

5.2.2 Preparo das micropartículas

Para síntese das micropartículas utilizou-se a técnica de gelificação ionotrópica conforme citado nas referências consultadas (85,87,88) onde tiramos proveito da habilidade dos polímeros hidrofílicos carregados positivamente (quitosana) ou negativamente (alginato de sódio) interagirem com moléculas de cargas opostas dando origem a redes tridimensionais reticuladas.

O método utilizado foi escolhido com base em publicações de referência na área (39,85,89,90), por apresentar um custo relativamente baixo, não utilizar solventes tóxicos e apresentar um alto rendimento. Foi utilizado neste projeto o cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente reticulador, que interagiu com o alginato e a quitosana, formando uma rede polimérica onde os fármacos ficaram inseridos (85,91).

Foram preparadas cinco soluções aquosas de quitosana com alginato seguindo a metodologia abaixo:

- Solução (1) contendo: 0,36 g de alginato solubilizado em 19 mL de água destilada;
- Solução (2) contendo: 0,12 g de quitosana; 27 mL de água destilada; 300 μL de ácido acético; 0,9 g de cloreto de cálcio.

Após a preparação das soluções de quitosana e alginato, foi adicionado à solução de alginato (1) os seguintes fármacos:

Formulação 1: não foi adicionado nenhum dos fármacos, permanecendo como “branco/vazia”, seguida de gotejamento na solução (2) na solução (1). As micropartículas formadas permaneceram overnight.

Formulação 2: foi adicionado à solução 50 μL de Nitroprussiato à 1,0 mM, seguida de gotejamento na solução (2) na solução (1). As micropartículas formadas permaneceram overnight.

Formulação 3: foi adicionado 50 μL de berberina à 1,0 mM, seguida de gotejamento na solução (2) na solução (1). As micropartículas formadas permaneceram overnight.

Formulação 4: foi adicionado 50 µL de bacitracina à 1,0 mM, seguida de gotejamento na solução (2) na solução (1). As micropartículas formadas permaneceram overnight.

Formulação 5: foi adicionado 50 µL de Nitroprussiato à 1,0 mM + 50 µL de berberina à 1,0 mM + 50 µL de bacitracina à 1,0 mM, seguida de gotejamento na solução (2) na solução (1), as formulações 2 e 3 permaneceram overnight.

Para a extrusão da dispersão polimérica contendo os fármacos a serem encapsulados, foi utilizada uma seringa com agulha 23G 1'' (0,6 x 25 mm), onde foi gotejada a solução sobre o agente reticulante (cloreto de cálcio CaCl₂), adicionando-se por gotejamento lentamente a solução de alginato em uma velocidade constante de aproximadamente 90 gotas por minuto, de forma que as gotículas formadas não se aglomerassem.

Depois de gotejada toda a solução de alginato na solução de quitosana a mistura contendo a suspensão de micropartículas foi mantida sob agitação lenta overnight. Após 24 horas as micropartículas formadas foram lavadas 3 vezes com água ultrapura.

O excesso de água foi retirado com a ajuda de um conta-gotas e então deixada em uma superfície plana e protegida de possíveis contaminações e protegida da luz para secagem adequada, à temperatura ambiente, pelo tempo necessário até massa constante, o que foi obtida após 3 dias.

Depois de totalmente secas foram recolhidas e armazenadas em freezer para posteriores análises. A Tabela 1, abaixo contém a nomenclatura utilizada para as formulações, e na Figura 11 o processo de síntese das micropartículas:

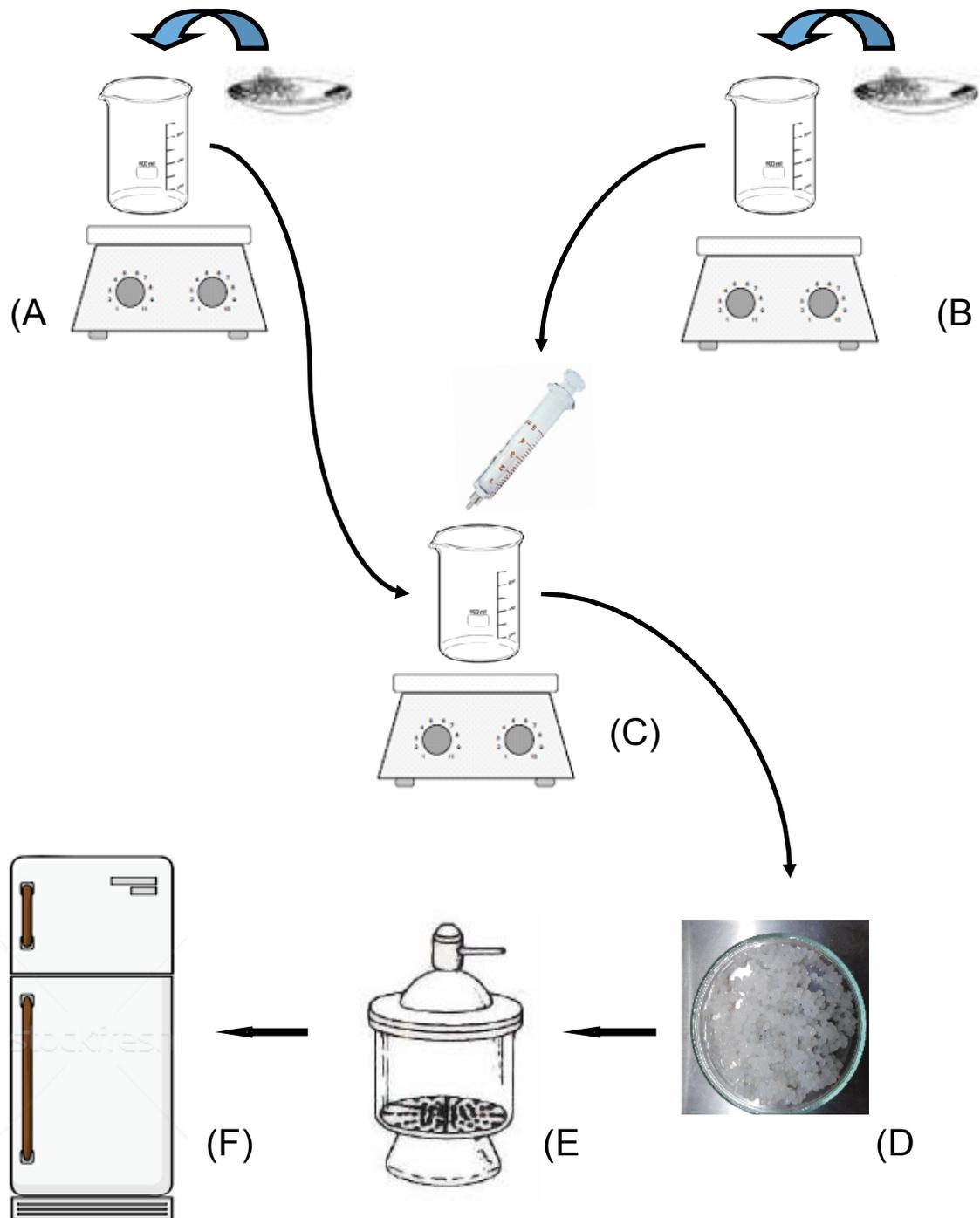
Tabela 1 - Formulação, fármacos adicionados e nomenclatura correspondente adotada.

Formulação	Fármacos adicionados	Nomenclatura
F1	Sem fármacos	ALG_QUIT_VAZIA
F2	50 µL de Nitroprussiato (1,0 mM)	ALG_QUIT_NPS
F3	50 µL de Berberina (1,0 mM)	ALG_QUIT_BER

F4	50 µL de Bacitracina (1,0 mM)	ALG_QUIT_BAC
F5	50 µL de Nitroprussiato (1,0 mM) 50 µL de Berberina (1,0 mM) 50 µL de Bacitracina (1,0 mM)	ALG_QUIT_NPS_BER_BAC

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 11 – Processo de gelificação. (A) solução contendo Quitosana; (B) solução com Alginato de sódio; (C) fármacos adicionados à solução de alginato de sódio conforme tabela 1; (D) solução de alginato de sódio contendo as formulações propostas é gotejado na solução de Quitosana; as micropartículas formadas são secas (E) e armazenadas em freezer (F).



Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3 Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl)

A análise do diâmetro das micropartículas foi realizada por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, que consiste em uma técnica não destrutiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição dos tamanho de partículas, normalmente na região de 10 nm a 6 μm , em geral o espalhamento de luz mede o movimento browniano das partículas em suspensão que faz com que o laser do equipamento seja espalhado com intensidades diferentes, as análises de intensidade resultam na velocidade do movimento browniano e assim chega-se ao tamanho da partícula usando a relação de Stokes-Einstein.

O índice de polidispersão (Pdl) é um parâmetro usado para indicar a distribuição do tamanho e homogeneidade das micropartículas

A medida foi realizada em cubeta contendo água deionizada e determinada utilizando o equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido).

5.2.4 Potencial Zeta

A análise do potencial Zeta visa a obtenção do valor da carga elétrica na superfície das micropartículas. Esta medida tem como objetivo prever e controlar a estabilidade de suspensões, pois, quanto maior o potencial Zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural de agregação.

A medida foi realizada em cubeta contendo água deionizada e determinada utilizando o equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido).

5.2.5 Análise morfológica (MEV)

Para realização das medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), aproximadamente 0,01 g de NP foram transferidas para um microtubo e suspensas com 1,0 mL de água ultrapura utilizando-se o homogeneizador mecânico (modelo T10) com velocidade de 30 000 rpm. Em uma lamínula circular limpa e esterilizada foram depositadas 30 µL dessa suspensão.

Em seguida, esse material foi introduzido no interior de um dessecador à temperatura ambiente e pressão reduzida por 24 horas. Após desidratação, a lâmina foi fixada com fita adesiva condutora dupla face sobre um suporte de alumínio (*stub*). Devido à baixa condutividade elétrica das NP, uma fina camada de ouro (com aproximadamente 40 nm de espessura) foi depositada revestindo as amostras através de um processo de metalização em atmosfera de argônio. Esse procedimento foi realizado utilizando um equipamento da marca Balzers®, modelo SCD-050.

As amostras foram examinadas e fotografadas nos aumentos entre 1.000 e 5.000 vezes, operando em tensão de aceleração de 5,0 kV no modo de detecção de elétrons secundários.

5.2.6 Avaliação da Eficiência de Encapsulamento (%EE)

Imediatamente após a preparação das partículas foi recolhido o sobrenadante para cálculo da eficiência de encapsulação (%EE) através da técnica de UV-vis. Para cálculo da concentração final de fármaco no sobrenadante foi utilizada a fórmula da absorvância Lei de Beer-Lambert (Equação 1);

Equação 1 - Lei de Beer-Lambert

$$A = \epsilon \times b \times C$$

Onde: “A” corresponde a absorvância da amostra;

“ ϵ ” é o coeficiente de extinção molar;

“b” o caminho ótico e

“C” a concentração do fármaco na solução.

A quantificação da eficiência de encapsulamento foi determinada utilizando a seguinte Equação 2):

Equação 2 - Eficiência de encapsulamento

$$\% \text{ Eficiência de encapsulamento} = \frac{\text{Fármaco encapsulado}}{\text{Fármaco teoricamente encapsulado}} \times 100$$

5.2.7 Perfil de intumescimento

Parâmetros físico-químicos como: fração da água retida (W_f), percentual de hidratação ($DS\%$), intumescimento (DSW) e difusão (D_m) (45,85,92), foram medidos e analisados para as micropartículas nos pH's de 5,0, 6,2 e 7,4.

As análises foram executadas baseando-se na variação de massa ocorrida durante o intumescimento das micropartículas poliméricas, as quais foram aferidas em balança analítica.

Após a coleta dos dados os valores foram plotados em planilha do Excel® e aplicadas as equações abaixo para cada parâmetro físico-químico, sendo:

Equação 3 - Fração de água retida

$$W_f = \frac{(m - m^*)}{1}$$

Equação 4 - Percentual de hidratação

$$\%DS = W_f \cdot 100$$

Equação 5 - Percentual de intumescimento

$$Q\% = 100 \cdot \frac{(m - m^*)}{m^*}$$

Equação 6 - Difusão

$$Dm = \frac{m}{m^*}$$

Onde, “m” é a massa da bead intumescida e “m*” é a massa da bead seca.

Para o ensaio da determinação da fração de água retida (Wf), foram separadas 15 micropartículas (cinco para cada pH) aleatoriamente e rotuladas conforme a solução tampão que foi empregada (tampão acetato pH 5,0; tampão citrato pH 6,2 e tampão PBS pH 7,4), as micropartículas foram pesadas em balança analítica e tiveram seu tamanho medido com auxílio de um paquímetro.

As micropartículas foram colocadas em Eppendorf identificadas e acrescidas com 1,0 mL de água ultrapura. Os dados foram coletados de uma em uma hora e anotados para cálculos de percentual de hidratação e percentual de intumescimento.

5.2.8 Avaliação do perfil de liberação do Fármaco (UV-vis) em diferentes pH's

Para avaliação do perfil de liberação do fármaco foi utilizado o Espectrofotômetro (UV-vis), as micropartículas em um total de treze foram selecionadas ao acaso, pesadas e acondicionadas em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm, foram utilizadas as soluções tampão com diferentes pH's 5,0; 6,2 e 7,4, os espectros de absorbância foram coletados a cada 2 minutos, perfazendo um total de cinco horas de análise para cada amostra.

Os dados obtidos foram tratados com o software UV Solutions 3.0[®] e transferidos para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

5.2.9 Medidas de DSC das partículas vazias e contendo os fármacos

Para obtenção da curva de DSC (Differential Scanning Calorimetry), a amostra foi macerada e transferida para um cadinho de alumínio onde foi

medida a massa de aproximadamente 3,0 mg. Em seguida, o material a ser analisado foi selado através do uso de uma prensa apropriada.

Os ensaios foram realizados em um DSC-60A, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5,0 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C. O equipamento de DSC foi calibrado com índio metálico (pureza acima de 99,99 %; $T_{\text{fusão}} = 156,4$ °C).

As caracterizações dos eventos térmicos das amostras foram identificadas em curvas obtidas após tratamento com o software TA-60WS[®] e transferidas para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

5.2.10 Análise do espectro de UV-vis das soluções

A técnica de espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-vis) foi utilizada para determinação dos picos padrões de cada composto, para avaliar a eficiência de encapsulamento de cada um dos fármacos e seu perfil de liberação.

Espectros de absorção eletrônica das soluções e das partículas em estudo foram obtidos através do uso de um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe, duplo monocromador, com fotomultiplicador da marca Hitachi®, modelo 3900H. Durante as medidas a fenda de passagem de luz foi mantida com 2,0 nm de abertura e foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm. Antes do início das leituras, foi obtida a linha de base utilizando apenas o meio no qual as formulações estariam suspensas.

Em seguida, foram realizadas as análises posicionando a cubeta contendo a formulação solubilizada ou em suspensão aquosa no equipamento. Foram obtidas medidas de absorbância pelo modo de varredura dentro da faixa espectral de 200 a 800 nm, com velocidade de escaneamento de 600 nm/min. os dados obtidos foram tratados com o software UV Solutions 3.0[®] e transferidos para o programa GraphPad Prism 6.01[®].

5.2.11 Medidas de FTIR das partículas vazias e contendo o fármaco

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada com a finalidade de identificar as principais bandas características de cada componente utilizado na formulação. Para tanto, foram realizadas análises dos compostos puros de Bacitracina de zinco, Berberina, Nitroprussiato de sódio, Alginato de sódio e Quitosana e das micropartículas composta por todos os componentes em um espectrofotômetro de FTIR. Para a leitura foram utilizadas pastilhas de brometo de potássio com massa média de 70,0 mg preparadas com aproximadamente 2,5 % de formulação, prensadas a 80,0 kN pelo período de 3 minutos.

Para cada leitura foram obtidas 40 medidas, com resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ na região compreendida entre 400 e 4000 cm^{-1} no modo de porcentagem de transmitância. Os dados foram tratados com o software IR Solution 1.5[®] e transferidos para o programa de construção gráfica GraphPad Prism 6.01[®].

5.2.12 Análise de teste de Bioadesão

Para o teste de Bioadesão foi utilizado o método de Lowry (93), que apresenta limite de detecção de $0,7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e leituras de absorbância em comprimento de onda 750 nm . Neste método, ocorre redução dos constituintes ativos do reagente Folin-fenol dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. Após a reação ocorrer, são obtidos os espectros das soluções, através do Espectrofotômetro (UV-vis), e estes comparados com a curva padrão da albumina.

Neste teste foi utilizada 20 mg de micropartículas, onde foram mantidas em solução aquosa de mucina em diferentes concentrações ($0, 40, 80, 120, 160, 200\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora em banho termostático a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de mucina livre, para isto foi utilizado o ensaio colorimétrico com reagente de Lowry.

5.2.13 Análise da Interação Bacteriana *in vitro*

Escherichia coli estirpe J96 e *Staphylococcus aureus* estirpe ATCC 25923 foram inoculadas em meio de caldo de Müller-Hinton (MHB) de estoques congelados em glicerol a 25 % a -80 ° C. A cultura foi realizada durante a noite em pH 7,0 a 37 ° C com agitação orbital de 180 RPM.

No dia seguinte amostras de cada cultura foram inoculadas em duplicados em 3 mL de meio MHB (Ágar Mueller-Hinton) em tubos estéreis de 15 mL contendo as seguintes quantidades de micropartículas em gramas (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantidade de micropartículas em gramas utilizado para inoculação em tubos estéreis.

Formulação	Tubo 1 (g)	Tubo 2 (g)
Vazias	0,5414	0,5411
BAC	0,5235	0,5371
BER	0,5032	0,5021
SNP	0,5162	0,5211
BAC/BER/NPS	0,5347	0,5538

Sendo: bacitracina BAC; berberina BER; nitroprussiato SNP; micropartículas com todos fármacos BAR/BER/NPS.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os compostos não encapsulados BAC, BER e SNP foram utilizados como controle para sua atividade antibacteriana, assim como o controle extra Ampicilina com a concentração de 10 mg/mL.

As micropartículas Vazias foram usadas em meio MHB sem inoculo bacteriano, a fim de verificar a contaminação das micropartículas e também na presença de *E. coli* ou *S. aureus* para verificar qualquer atividade antibacteriana do material das micropartículas.

O crescimento bacteriano e a atividade bacteriostática foram avaliados por turbidimetria a 600 nm por 24 horas de incubação na presença dos compostos isolados ou encapsulados.

A atividade bactericida foi verificada pelo crescimento em meio de ágar Müller-Hinton (MHA), após diluições seriadas e contagem de unidades formadoras de colônias por mL de amostra (UFC/mL).

5.2.14 Autorização para coleta de material biológico

Os peixes foram coletados seguindo o protocolo submetido e aprovado pelo CEUA (Comissão de Ética no uso de Animais) do Instituto Federal de Rondônia, conforme protocolo número 013/2019, de acordo com o disposto na Lei nº.11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº 01 de 09/07/2010/CONCEA.

5.2.15 Isolamento de bactérias em peixes

Os peixes (Tilápias) foram coletados utilizando um puçá, no pesqueiro do Lupatini localizado na área rural de Vilhena RO (12° 44' 26" S, 60° 8' 45" W), no tanque de pesca número três, as dimensões do tanque são de 53 x 20 x 2,5, totalizando um volume de aproximadamente 2650 m³ de água.

A coleta foi de três espécimes sendo um vivo sem sintomas aparentes, um morto e um boiando apresentando sinais de contaminação por bacterioses, mas com sinais vitais ainda. A média de comprimento do corpo dos três espécimes estava em 35 cm e com 230 gr. de peso.

No mesmo momento foram coletadas as amostras com um swab estéril (depositadas em solução salina 3 %), das brânquias e pele de todos espécimes coletados.

Do espécime morto foram coletadas as amostras de pele e brânquias com o swab e depois de realizar a esterilização da carcaça com álcool 70 % e hipoclorito de sódio, foi retirado uma amostra do fígado do mesmo para cultura posterior de bactérias em placa.

As amostras recolhidas foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia do Instituto Federal de Rondônia onde foram realizados os testes de identificação, e posteriores testes de sensibilidade as micropartículas.

5.2.16 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados numéricos apresentados como uma média \pm desvio padrão (SD, Standard Deviation). As

análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism®, versão 6.01. A diferença estatística entre grupos foi determinada pela ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,0010$.

6 RESULTADOS

6.1 Estudos de Controle de Fármacos

A proposta deste trabalho se baseia em uma nova formulação para administração de um fármaco já catalogado e liberado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (94), a bacitracina de zinco.

Para efeitos de registro da formulação aqui apresentada, seguiremos os critérios análogos aos adotados para os medicamentos novos.

Segundo a ANVISA (94), uma avaliação de registro costuma ser dividida em três partes: análise farmacotécnica, análise de eficácia, e análise de segurança (94).

A análise farmacotécnica inclui a verificação de todas as etapas da fabricação do medicamento desde aquisição dos materiais, produção, controle de qualidade, liberação do fármaco no organismo e sua eficiência (94).

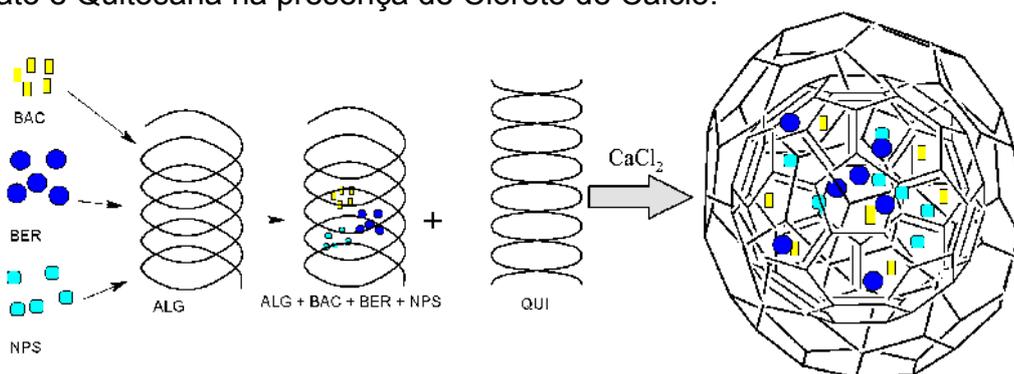
Destas, neste trabalho foi realizada a “fabricação” e análises de caracterização, liberação e testes de eficácia *in vitro*.

6.2 Preparo e Avaliação das micropartículas (micropartículas)

O preparo das micropartículas foi realizado por meio da técnica de geleificação ionotrópica, sendo uma técnica considerada simples, que não utiliza solventes orgânicos tóxicos e com possibilidade de produção em escala comercial (39).

Seu preparo consiste na habilidade dos polímeros hidrofílicos carregados positiva ou negativamente interagirem com moléculas de cargas opostas dando origem a redes tridimensionais reticuladas (Figura 12) (39,40).

Figura 12 - Esquema de formação de redes tridimensionais entre os polímeros Alginato e Quitosana na presença de Cloreto de Cálcio.



Onde: Bacitracina de Zinco (BAC), Berberina (BER), Nitroprussiato de Sódio (NPS), Alginato de Sódio (ALG), Quitosana (QUI) e Cloreto de Cálcio (CaCl_2).

Fonte: elaborado pelo autor.

Neste projeto, foi utilizado o cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente reticulador, que interagiu com o alginato e a quitosana, formando uma rede polimérica onde os fármacos ficaram inseridos (Figura 12).

Assim que preparadas as partículas foram submetidas as análises de caracterização, que segue nos tópicos seguintes.

6.3 Carga superficial das micropartículas

As propriedades de carga são essenciais para a função do transportador do fármaco, pois, na passagem pelo trato digestivo as micropartículas sofrerão a ação do meio mais ácido do estômago, já no intestino o meio mais básico.

Como esperado, as partículas apresentaram um valor de carga superficial (Zeta) em torno de +0,305 mV, devido aos grupos amino e carboxila da superfície, conforme relatado em trabalhos da literatura (95), a introdução de quitosana pode melhorar as propriedades bioadesivas das micropartículas à regiões específicas do trato gastrointestinal, como o estômago, intestino delgado, íleo, cólon e mucosa bucal. Assim, como sistema de entrega de fármaco oral, é possível prolongar o tempo de residência no sítio da aplicação e absorção (44,96).

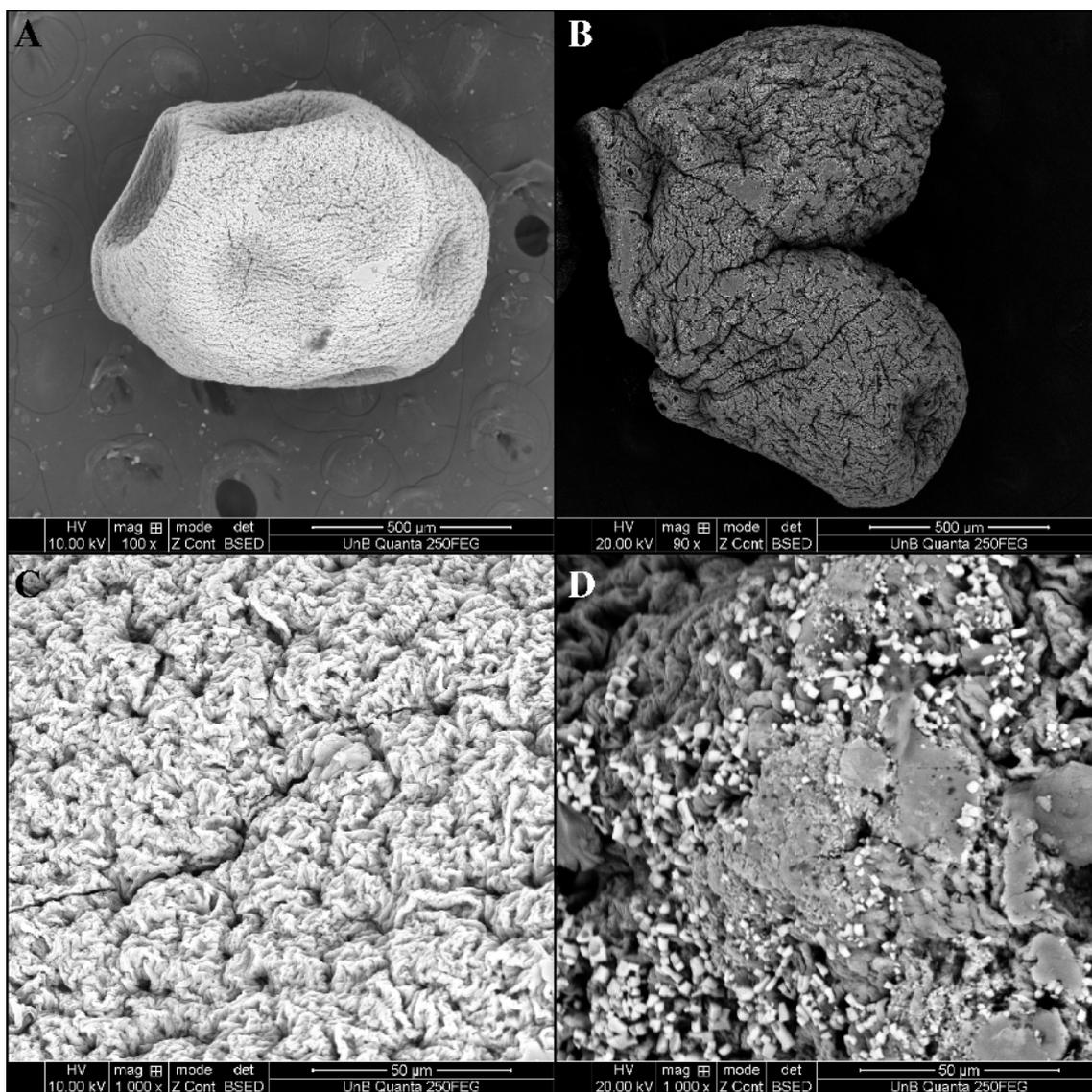
6.4 Análise morfológica (MEV)

A morfologia da superfície de micropartículas de compósito de alginato de sódio / quitosana foi investigada por análises MEV como mostrado na Figura 13 A e 7B.

Micropartículas de alginato/quitosana reticuladas por CaCl_2 exibiram morfologia esférica em solução aquosa e entumeceram quando colocadas no meio aquoso.

As dimensões observadas para as micropartículas molhadas sugerem alta qualidade de intumescimento e capacidade de retenção de água das micropartículas. O exame detalhado da estrutura superficial por MEV (Figura 13 – C e D) revela rugas severas causadas pelo colapso parcial da rede polimérica durante a secagem, as quais estão de acordo com outros resultados observados na literatura (97).

Figura 13 - Morfologia externa das micropartículas vazias operando a 10-20 kV, com o detector de elétrons retroespalhados BSED. (A) ampliação de 100X, (C) ampliação de 1.000X. Morfologia externa do BAC, BER e SNP aprisionados em esferas compostas de alginato / quitosana.



Fonte: imagens do autor.

6.5 Eficiência de Encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação foi obtida utilizando-se o método indireto que consiste no cálculo da concentração dos fármacos no sobrenadante.

O cálculo da concentração final dos compostos foi realizado utilizando-se a equação de Lambert-Beer $A = \epsilon \times b \times C$ (Equação 1) onde a absorvância (A) tem a relação direta entre o coeficiente de extinção molar (ϵ), a distância (b)

que o feixe de laser atravessa (cubeta) e a concentração da substância na solução.

A porcentagem de eficiência de encapsulamento obtida foi de $99 \pm 0,5$ %.

6.6 Análise de perfil de intumescimento

Fração de água retida, difusão e percentual de hidratação

Amostras de micropartículas foram separadas aleatoriamente, medidas com o auxílio de um paquímetro, identificadas em Eppendorfs, em seguida foi adicionado 1 mL de tampão acetato pH 5,0; tampão citrato pH 6,2 e tampão PBS pH 7,4 a cada amostra. A Tabela 3 mostra o diâmetro das micropartículas inicial (secas) e sua variação de diâmetro com o processo de intumescimento (Figura 15)

Podemos perceber que as amostras submetidas ao pH 5,0 tiveram seu intumescimento mais lento levando 5 horas até a dissolução das partículas (Tabela 3), essa característica pode ser atribuída as ligações do grupo amina da quitosana que, em meio aquoso ($pK_a = 6,3 - 6,7$) (42,62,64), faz com que a quitosana se solubilize no meio de dissolução de pH 6,2 (Tabela 3), mas não na solução tampão. No pH 5,0, os grupos amina são facilmente protonados(62) impedindo a liberação do conteúdo de sua matriz. Na Figura 14 podemos ver as imagens das micropartículas após duas horas em meio aquoso com pH 5,0.

O gráfico da Figura 15 contém a variação de tamanho das micropartículas durante o processo de intumescimento, compreendendo o período total de quatro horas, nos diferentes pH's sendo 5,0; 6,2 e 7,4.

Figura 14 – Micropartículas secas e intumescidas. Em (A) micropartículas secas, em (B) micropartículas após o processo de intumescimento (após 2h) em meio aquoso pH 5,0.



Fonte: imagens do autor.

Tabela 3 - Variação de diâmetro (mm) das micropartículas em solução aquosa, em pH's 5,0, 6,2 e 7,4

		SECAS	1 h	2 h	3 h	4 h
	pH	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
BCA	5,0	0,728	0,868	1,34	2,07	2,16
	6,2	0,704	2,040	2,40	0	0
	7,4	0,784	1,986	2,33	0	0

BER	5,0	0,9	1,150	1,38	1,922	2,08
	6,2	0,854	2,040	2,42	0	0
	7,4	0,85	2,028	2,03	0	0
NPS	5,0	0,744	1,040	1,32	1,88	2,03
	6,2	0,754	2,028	2,42	0	0
	7,4	0,756	1,480	2,12	0	0
BAC	5,0	0,868	1,034	1,34	1,78	2,02
	6,2	0,866	1,992	2,48	0	0
	7,4	0,858	1,400	2,00	0	0
3 COMP.	5,0	0,768	1,026	1,36	1,8	2,02
	6,2	0,758	2,382	2,48	0	0
	7,4	0,768	1,580	2,04	0	0

Sendo: BCA (branco, partículas de alginato recobertas com quitosana sem os fármacos); BAC (bacitracina de zinco); BER (berberina); NPS (nitroprussiato de sódio) e 3 COMP (três fármacos utilizados).

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Composto de micropartículas de alginato / quitosana: característica de intumescimento e liberação dos fármacos no período de cinco horas.

	pH	W_F	ECW	% H	D_{sw}	TC (horas)
BCA	5,0	0,0196	1,96	61,83	2,62	5
	6,2	Agr.	Agr.	Agr.	Agr.	5
	7,4	0,4415	44,15	97,27	36,60	5
BER	5,0	0,0175	1,75	59,12	2,45	5
	6,2	0,1848	18,48	93,43	15,22	5
	7,4	0,0254	2,54	65,97	2,94	5
NPS	5,0	0,1098	10,98	91,96	12,44	5
	6,2	Agr.	Agr.	Agr.	Agr.	5
	7,4	0,1380	13,80	91,82	12,22	5
BAC	5,0	0,1198	13,98	93,96	13,54	5
	6,2	Agr.	Agr.	Agr.	Agr.	5
	7,4	0,1423	14,56	93,47	4,28	5
3 COMP.	5,0	0,0162	1,62	55,10	2,23	5
	6,2	Agr.	Agr.	Agr.	Agr.	5
	7,4	0,2077	20,77	94,71	18,91	5

Sendo: BCA (branco, partículas de alginato recobertas com quitosana sem os fármacos); BAC (bacitracina de zinco); BER (berberina); NPS (nitroprussiato de sódio) e 3 COMP (três fármacos utilizados). W_f (fração de água retida); ECW (coeficiente de difusão); % H (percentagem de hidratação); D_{sw} (intumescimento); TC (curso do tempo); Agr. Agregação.

Fonte: elaborada pelo autor.

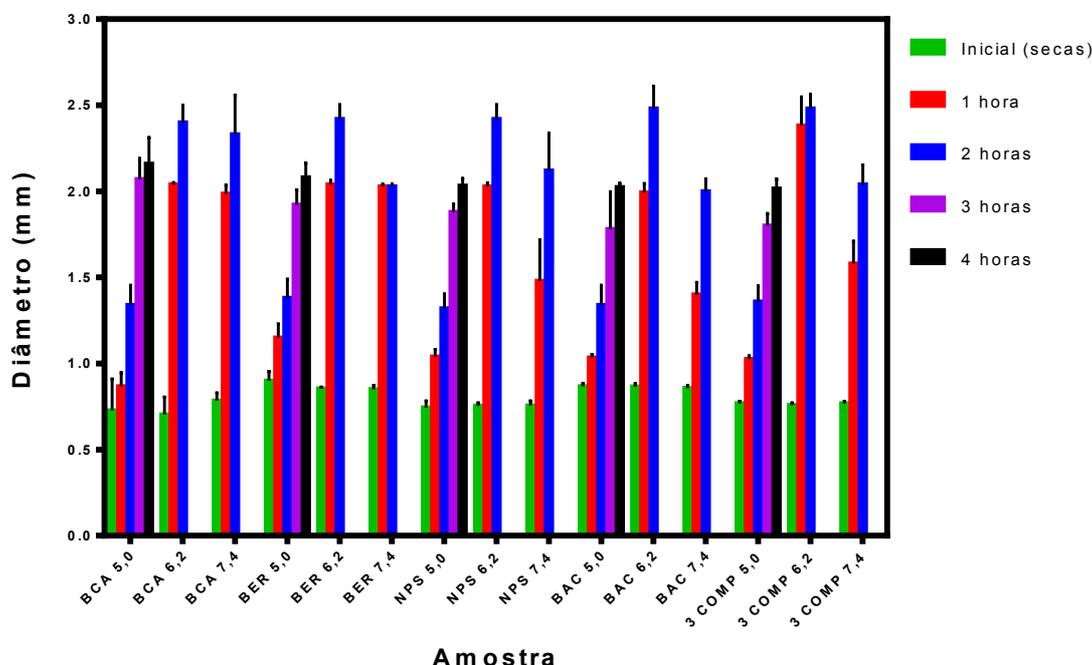
Tabela 5 - Comportamento físico do composto de micropartículas de alginato / quitosana durante o processo de intumescimento e liberação dos fármacos no decorrer do tempo.

		SECAS	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
	pH						
BCA	5,0	sólidas	sólidas	semi sólida	semi sólida	degradada	dissolvidas
	6,2	sólidas	maleável	Gelatinosa	dissolvidas	dissolvidas	dissolvidas
	7,4	sólidas	maleável	Maleável	degradada	dissolvidas	dissolvidas
BER	5,0	sólidas	sólidas	semi sólida	semi sólida	degradada	dissolvidas
	6,2	sólidas	muito maleável	Gelatinosa	dissolvidas	dissolvidas	dissolvidas
	7,4	sólidas	maleável	Maleável	degradada	dissolvidas	dissolvidas
NPS	5,0	sólidas	sólidas	semi sólida	semi sólida	degradada	dissolvidas
	6,2	sólidas	maleável	Gelatinosa	dissolvidas	dissolvidas	dissolvidas
	7,4	sólidas	maleável	Maleável	degradada	degradada	dissolvidas
BAC	5,0	sólidas	sólidas	semi sólida	semi sólida	dissolvidas	dissolvidas
	6,2	sólidas	maleável	Gelatinosa	dissolvidas	dissolvidas	dissolvidas
	7,4	sólidas	maleável	Maleável	degradada	dissolvidas	dissolvidas
3 COMP.	5,0	sólidas	sólidas	semi sólida	semi sólida	degradada	dissolvidas
	6,2	sólidas	maleável	Gelatinosa	dissolvidas	dissolvidas	dissolvidas
	7,4	sólidas	maleável	Maleável	degradada	dissolvidas	dissolvidas

Sendo: BCA (branco, partículas de alginato recobertas com quitosana sem os fármacos); BAC (bacitracina de zinco); BER (berberina); NPS (nitroprussiato de sódio) e 3 COMP (três fármacos utilizados).

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 15 - Variação de tamanho do composto de micropartículas de alginato / quitosana durante o processo de intumescimento e liberação dos fármacos no decorrer do tempo.



Sendo: BCA (branco, partículas de alginato recobertas com quitosana sem os fármacos); BAC (bacitracina de zinco); BER (berberina); NPS (nitroprussiato de sódio) e 3 COMP (três fármacos utilizados).

Fonte: elaborada pelo autor.

6.7 Perfil de Liberação em pH's diferentes e cinética

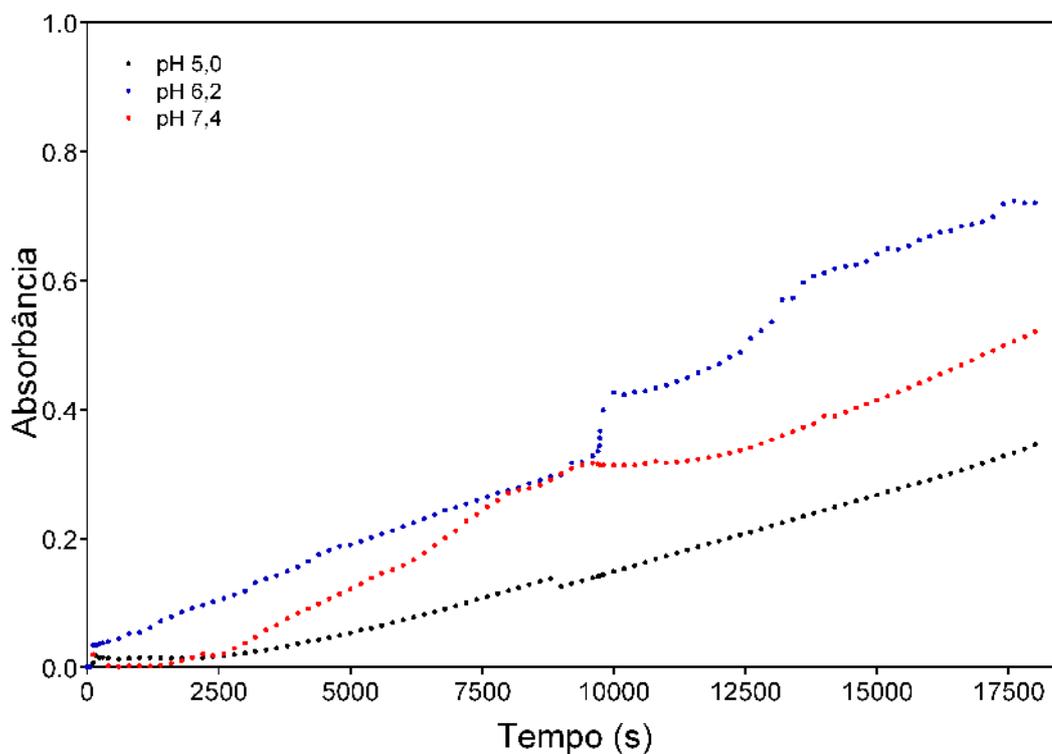
O ensaio de dissolução dos fármacos para determinação do perfil de liberação (*in vitro*) ao longo do tempo foi realizado utilizando-se as micropartículas preparadas conforme o item 4.1.2, seguindo-se da pesagem de amostras das mesmas, tendo-se micropartículas com Berberina ($10,0 \pm 2,0$ mg); micropartículas com Nitroprussiato de Sódio ($10,0 \pm 1,0$ mg); micropartículas com Bacitracina ($10,0 \pm 3,0$ mg) e micropartículas vazias ($10,0 \pm 0,5$ mg).

O ensaio foi realizado na própria cubeta do UV-VIS, utilizando como solvente as soluções tampão com pH's de 5,0, 6,2 e 7,4 visando simular a variação que ocorre ao longo do trato gastrointestinal (39,66). A quantidade de

fármaco liberada foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda correspondente a máxima absorção para cada fármaco.

Na Figura 16 podemos acompanhar o perfil de liberação obtido do fármaco Bacitracina de zinco, no comprimento de onda fixo de 254 nm, durante o tempo de 17500 s, (5 horas) de coleta de dados.

Figura 16 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Bacitracina de zinco á 37 °C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 254 nm.



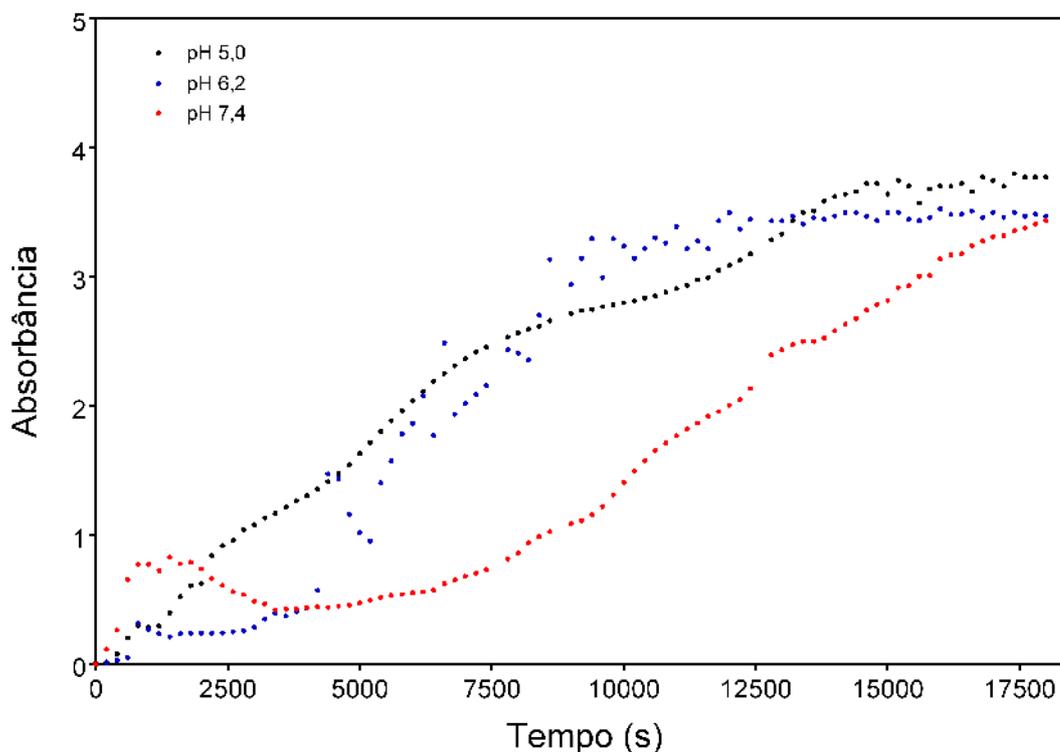
Fonte: elaborada pelo autor.

Nos primeiros 2500 segundos as micropartículas nos pH's 5,0 e 7,4 se mantiveram estáveis com pouca liberação do fármaco, após este momento houve um aumento linear da liberação, já no pH 6,2 a liberação do fármaco se deu desde o início da coleta de dados, com uma grande diferença em relação

aos outros pH's, em aproximadamente 10000 s a liberação em pH 6,2 elevou-se além dos outros pH's e depois manteve-se constante.

O resultado que obtivemos com a Berberina, no comprimento de onda fixo de 344 nm encontra-se na Figura 17, onde podemos verificar que houve uma liberação maior no pH 7,4 entre o tempo inicial e nos 2500 s e nos pH's 5,0 e 6,2 os mesmos permaneceram com o mesmo perfil de liberação ao longo do tempo até atingirem o patamar estável nos 10000 s.

Figura 17 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Berberina á 37 °C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm.

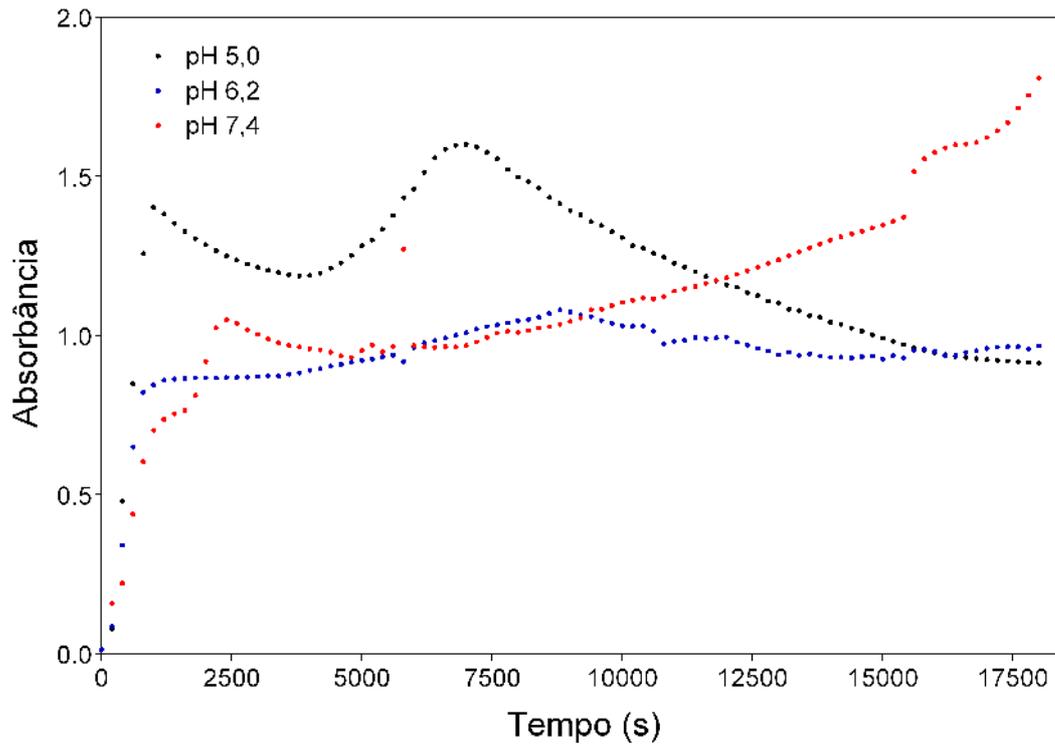


Fonte: elaborada pelo autor.

O perfil de liberação do Nitroprussiato de Sódio pode ser observado na Figura 18, obtida no comprimento de onda de 260 nm. Nota-se uma grande liberação de Nitroprussiato já nos primeiros segundos, o que pode ser atribuído a sua solubilidade elevada (70), no período de 2500 s até 10000 s os perfis de

pH's 6,2 e 7,4 mantiveram-se estáveis e após este período as micropartículas no pH 7,4 liberam mais Nitroprussiato que os outros perfis.

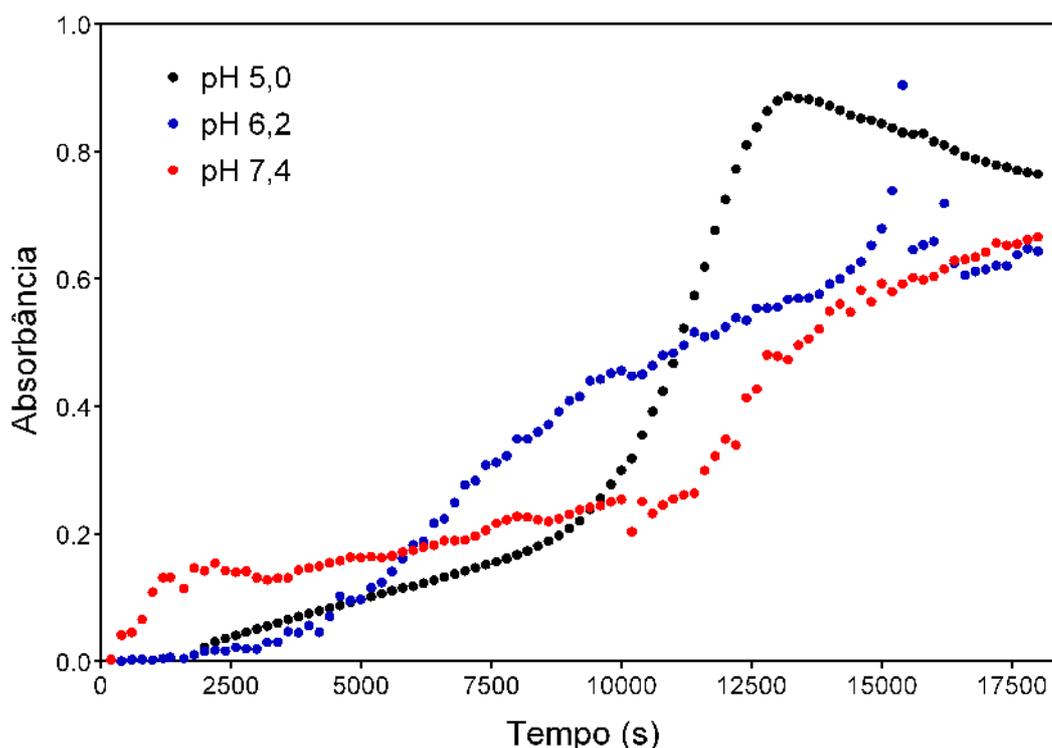
Figura 18 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo o fármaco Nitroprussiato de sódio á 37 °C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 260 nm.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após os testes com os fármacos separados, utilizamos as amostras com os três fármacos encapsulados, as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 344 nm, mesma da berberina, por apresentar um comprimento de onda de absorvância que não se sobrepõe aos da bacitracina e do nitroprussiato, evitando efeito aditivo. O perfil de liberação obtido pode ser observado na figura 16.

Figura 19 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC á 37 °C nos pH's 5,0 (preto), 6,2 (azul), e 7,4 (vermelho) após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nos primeiros 2500 segundos é observado uma rápida liberação do fármaco no pH 7,4 o qual pode ser atribuído ao fármaco associado a superfície da partícula, pois apresentou o mesmo perfil da Figura 17 que mostra a liberação da Berberina encapsulada, em seguida, se observa que as micropartículas (provavelmente já intumescidas) no pH 5,0 sofreram uma

grande liberação de fármacos no período de 9000s até 14000 s, sofrendo uma redução após este período. Nos pH's 6,2 e 7,4 a liberação foi crescente e constante até os 15000 segundos.

Foram realizados testes de modelagem cinética utilizando os modelos de ordem zero, um, dois e três; Korsmeyer-Peppas; Weibull; Hixson-Crowell; Higuchi; Baker-Lonsdale; Michaelis-Menten e Equação de Hill, os resultados de ajuste do r^2 , encontram-se na Tabela 6.

Com base nos resultados da Tabela 6, o modelo cinético que mais explica o perfil de liberação ao pH 5,0 é Hixson-Crowell onde os dados de dissolução são traçados de acordo com a lei da raiz cúbica de Hixson-Crowell (49,90,98,99), isto é, a raiz cúbica da concentração inicial menos a raiz cúbica da percentagem permaneceu, como uma função do tempo indicando uma relação linear.

Tabela 6 - Modelo cinético de degradação das micropartículas contendo os 3 compostos em diferentes pH's, resultados de r^2 de cada modelo utilizado.

MODELO CINÉTICO	pH 5,0	pH 6,2	pH 7,4
MODEL ORDER IS 0	8,654E-001	9,435E-001	8,942E-001
MODEL ORDER IS 1	4,354E-001	3,822E-001	2,083E-001
MODEL ORDER IS 2	3,041E-001	6,664E-002	3,368E-002
MODEL ORDER IS 3	3,041E-001	6,664E-002	3,368E-002
KORSMEYER-PEPPAS	2,508E-001	5,987E-001	9,782E-001
WEIBULL	2,508E-001	5,986E-001	9,781E-001
HIXSON-CROWELL	9,031E-001	8,701E-001	8,563E-001
HIGUCHI	-1,035E+000	-3,688E-001	5,074E-001
BAKER-LONSDALE	7,502E-001	8,635E-001	7,901E-001
MICHAELIS-MENTEN	8,989E-002	4,944E-001	9,999E-001
HILL EQUATION	2,508E-001	5,986E-001	9,781E-001

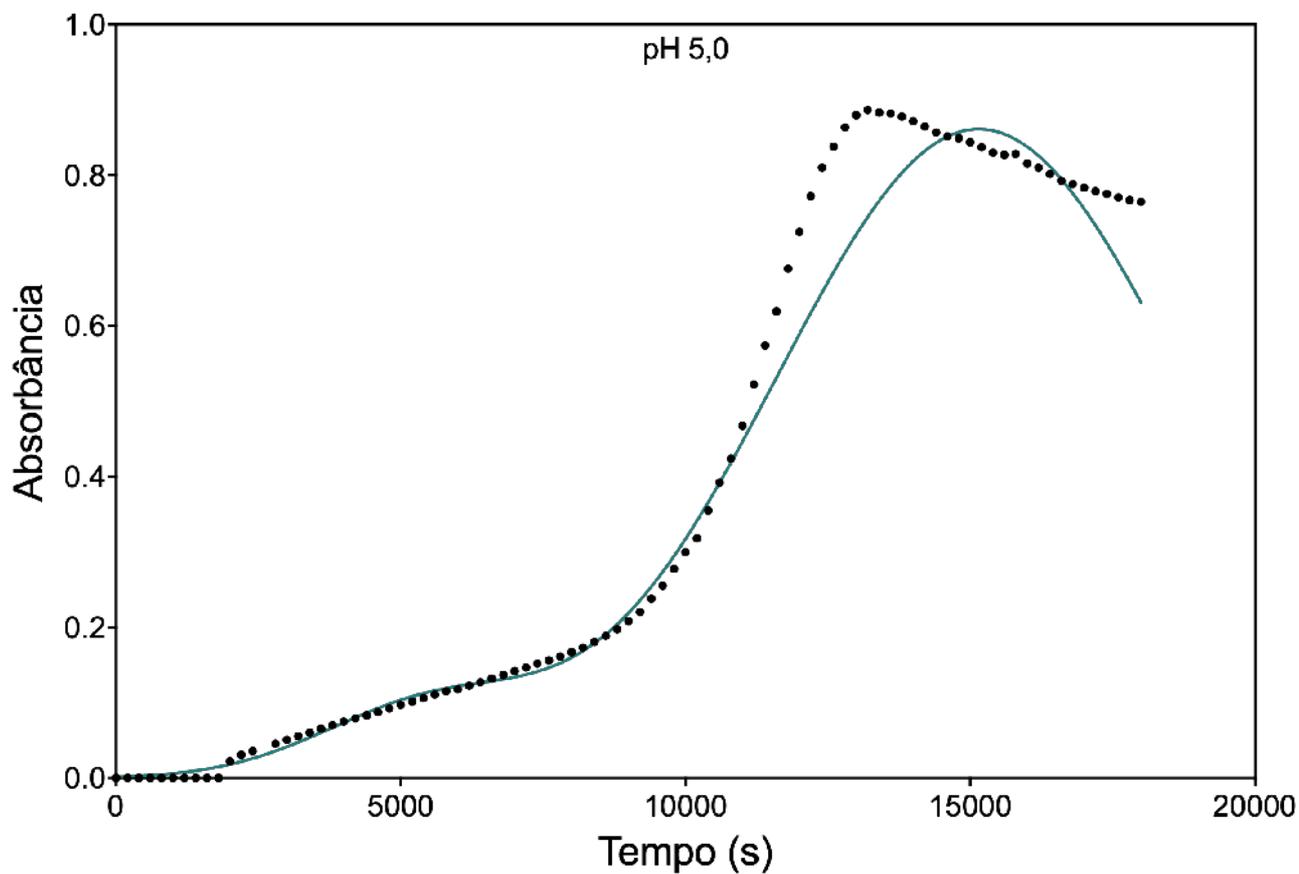
Fonte: elaborada pelo autor.

As micropartículas que permaneceram na solução tampão com o pH 6,2, seguiram um padrão descrito como de ordem zero, que se baseia na liberação lenta da substância ativa, em um primeiro momento imediata motivada ou pela liberação do fármaco existente à superfície do sistema ou por alterações que se

verificam na estrutura do sistema, com consequente liberação imediata dos fármacos seguido de uma liberação lenta (45,98,100,101).

A liberação dos fármacos no pH 7,4, conforme a Tabela 6 se caracteriza pelo modelo Michaelis-Menten que explica a relação entre a concentração do meio e a matriz, onde a velocidade da liberação depende da relação entre as grandezas concentração e matriz, onde a velocidade é rápida no início e constante no decorrer da reação (70,102,103).

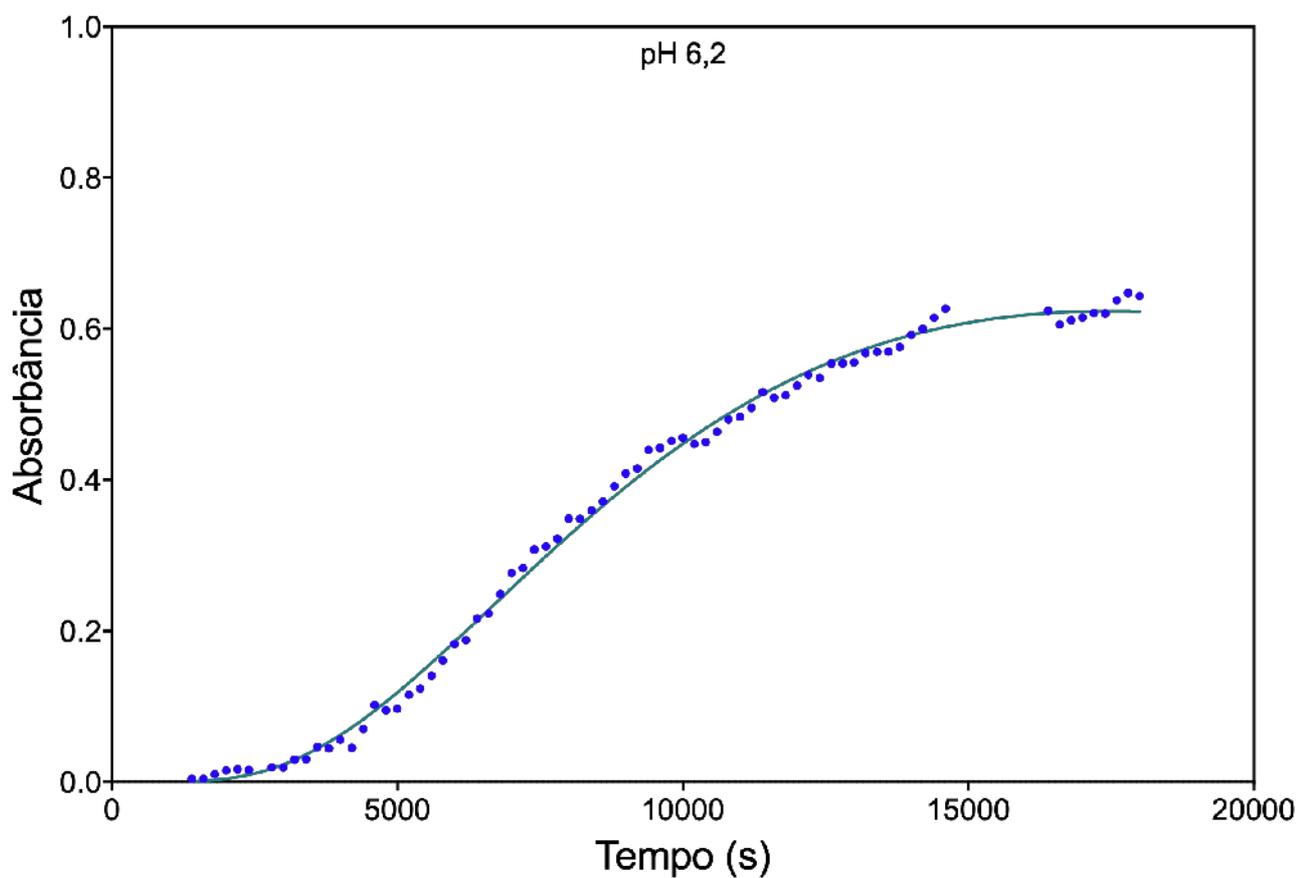
Figura 20 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC á 37°C no pH 5,0 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Hixson-Crowell (linha contínua).



Sendo: Valores observados (pontilhados) e valores previstos segundo cada modelo (linha contínua).

Fonte: elaborada pelo autor.

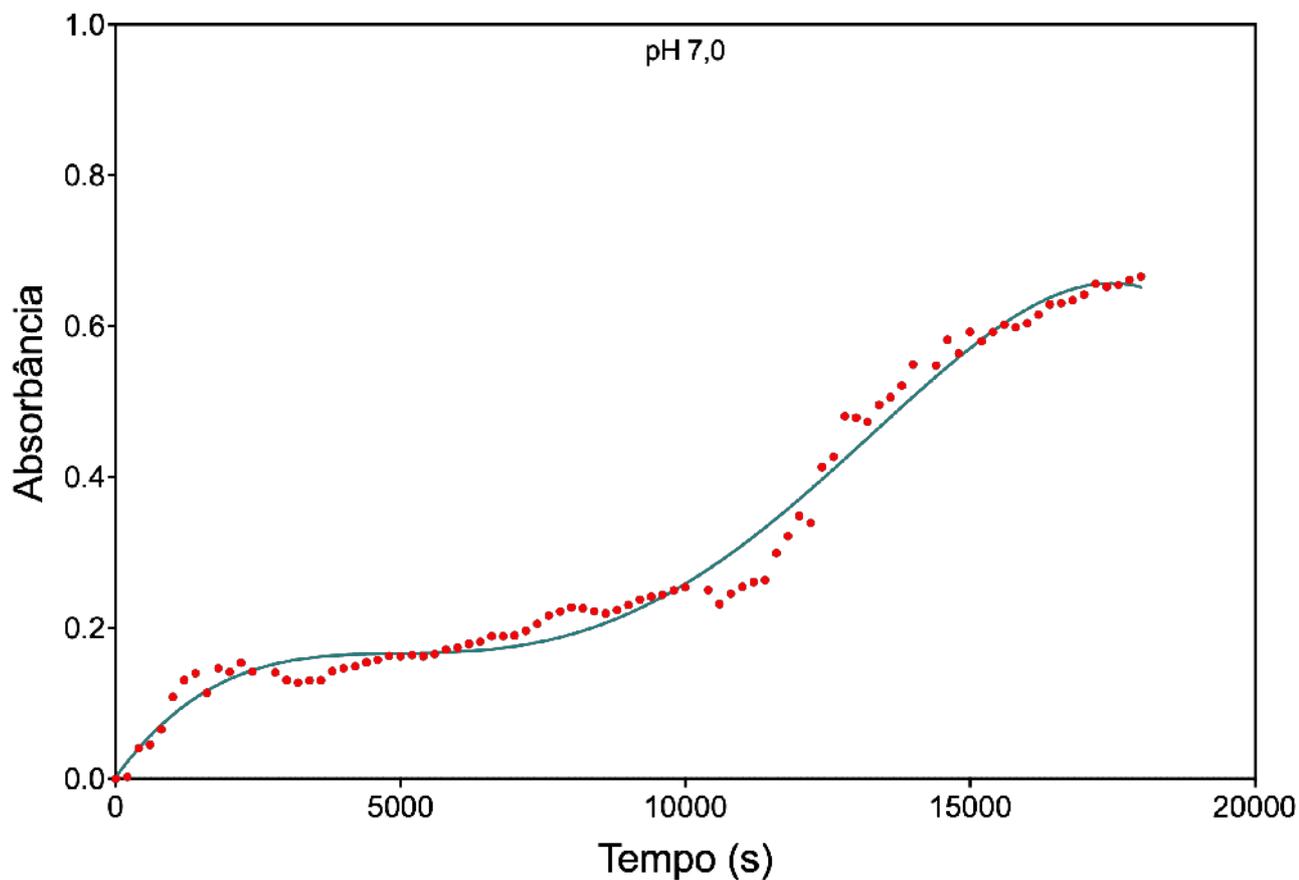
Figura 21 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC á 37°C no pH 6,2 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Ordem Zero (linha contínua).



Sendo: Valores observados (pontilhados) e valores previstos segundo cada modelo (linha contínua).

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 22 - Perfil cumulativo de liberação das partículas contendo os fármacos NPS_BER_BAC á 37°C no pH 7,0 (pontilhado), após 17500 segundos, leitura realizada no comprimento de onda de 344 nm. Abaixo comparativo com o modelo de cinética de Michaelis-Menten (linha contínua).



Sendo: Valores observados (pontilhados) e valores previstos segundo cada modelo (linha contínua).

Fonte: elaborada pelo autor.

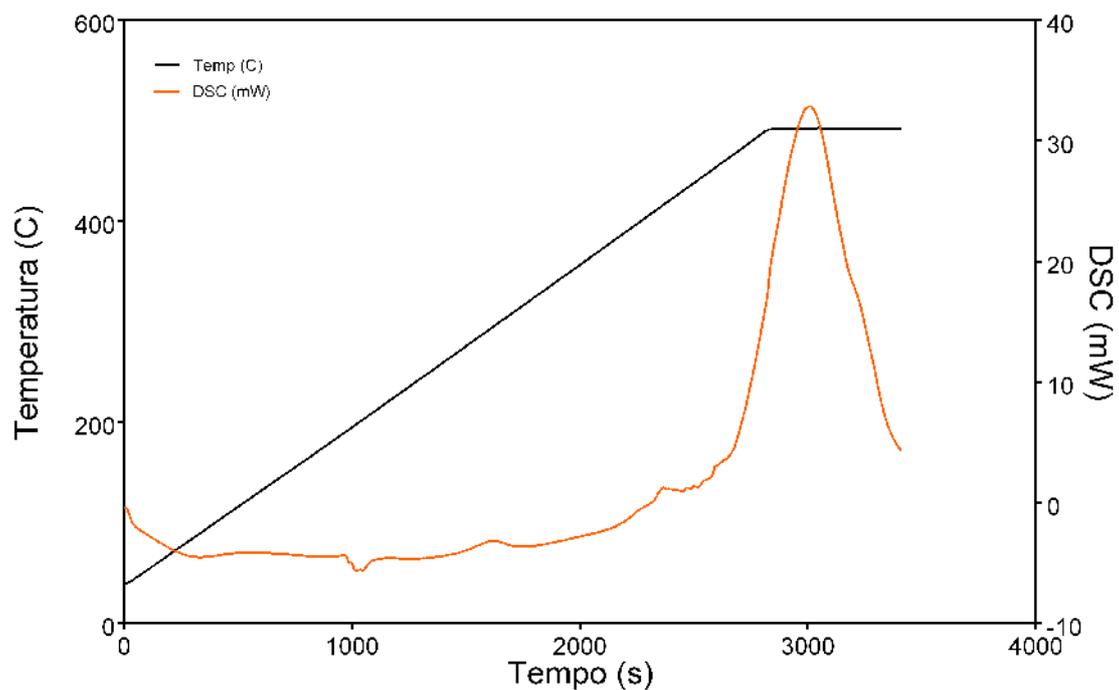
6.8 Análise de DSC

Esta técnica consiste em medir a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e um material de referência durante o processo de aquecimento/resfriamento, o sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra ou para a referência, dependendo do processo envolvido ser endotérmico ou exotérmico, com a finalidade de manter a amostra e referência com a mesma temperatura (97,104,105).

As curvas de DSC da Bacitracina, Berberina e Nitroprussiato de Sódio foram obtidas através de um calorímetro SHIMADZU, modelo DSC-60A, calibrado com padrão Índio, com a finalidade de se obter informações sobre as características térmicas das micropartículas.

Na Figura 23, temos o perfil de DSC das partículas vazias, compostas por alginato e quitosana. A partir dos 114 °C a amostra podemos observar um evento endotérmico, onde o material volátil e a água começam a evaporar com um comprimento de onda (seta) endotérmico em 1027 s, deste momento em diante a temperatura da amostra começa a elevar-se até, com um pequeno patamar de estabilização entre 2355 s e 2539 segundos, à uma temperatura de 137 °C este patamar pode significar a cristalização da amostra, pois a partir deste momento a temperatura se eleva em um evento exotérmico com comprimentos de onda de temperatura em 516 °C que degrada a amostra.

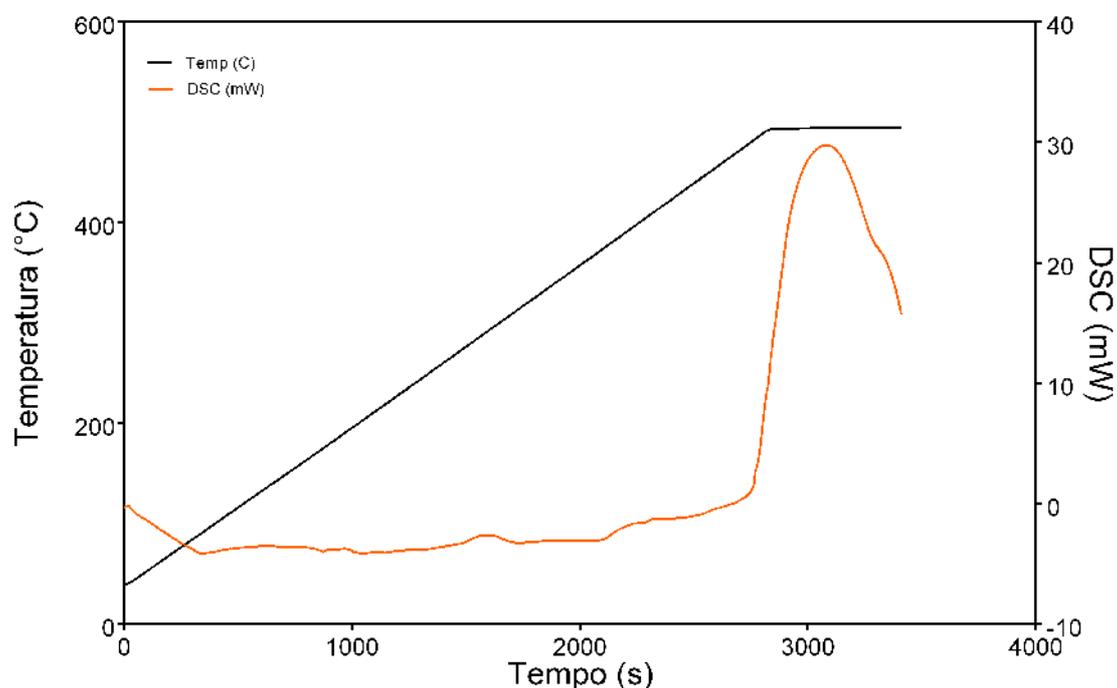
Figura 23 - DSC das micropartículas Vazias, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5,0 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

A amostra composta por alginato, quitosana e berberina (Figura 24) absorveu calor em uma faixa praticamente constante de aproximadamente 85 °C (com a volatilização da água principalmente), após a temperatura elevou-se para 99,2 °C até 129 °C no período de tempo de 582 segundos, deste momento em diante a temperatura elevou-se em um evento exotérmico até a temperatura máxima de 476 °C, após houve a degradação da amostra.

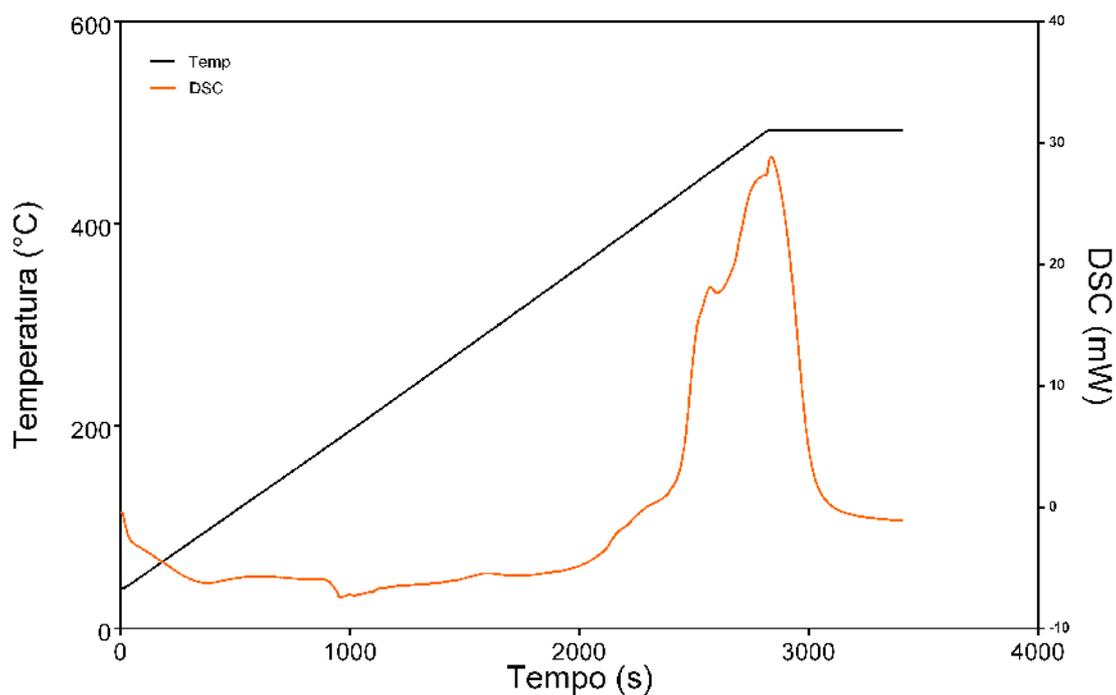
Figura 24 - DSC das micropartículas com Berberina, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5,0 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

Micropartículas compostas por alginato, quitosana e bacitracina de zinco submetidas a análise de DSC (Figura 25) apresentaram o mesmo comportamento da micropartículas vazias com um comprimento de onda endotérmico (seta) em 1027 segundos, a partir deste ponto temos três patamares (breves) de eventos exotérmicos o primeiro em 2253 s à temperatura de ~121 °C, o segundo em 2570 s à temperatura de ~339 °C, o terceiro patamar ocorreu em 2774 s à 452 °C, e pôr fim a amostra atingiu o comprimento de onda máximo de 470 °C aos 2845 segundos seguindo-se da degradação da amostra. Este comportamento pode ser explicado pela molécula da bacitracina, pois a mesma é um polipeptídico (106–108), e estes possuem pontos de fusão e ebulição diferentes para cada segmento da molécula.

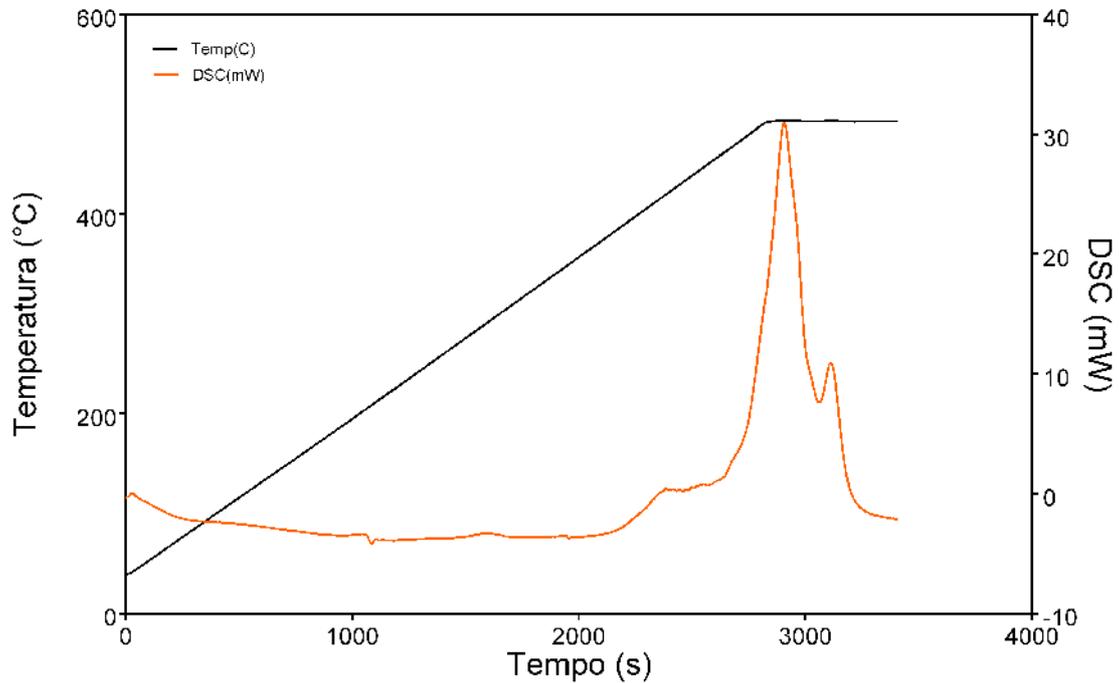
Figura 25 - DSC das micropartículas com Bacitracina, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

Na *Figura 26* está representado o perfil de micropartículas com alginato, quitosana e Nitroprussiato de Sódio (utilizado como doador de Óxido Nítrico), a amostra absorveu temperatura até os 2190 s à 77 °C, neste momento ocorreu um patamar de estabilização por 276 s a uma temperatura de aproximadamente de 125 °C, após elevou-se ao máximo de 487 °C aos 2905 s seguido de um período de perda de massa até o ponto de 3120 segundos à 249 °C onde podemos ver um comprimentos de onda de exotérmico, após seguiu-se da degradação da amostra

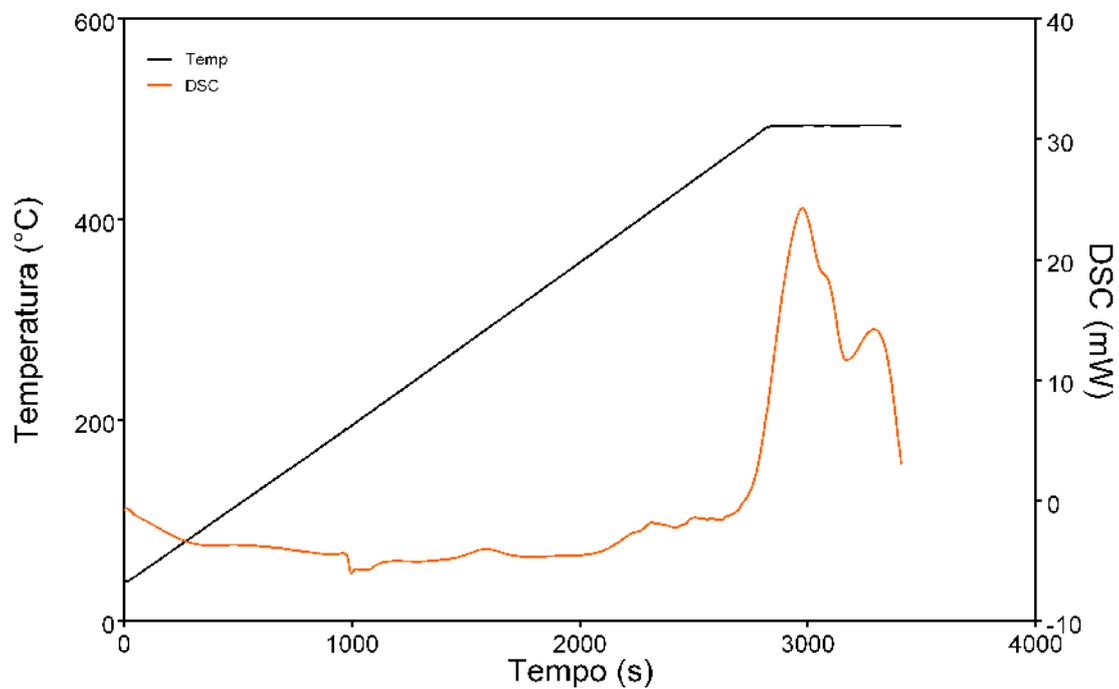
Figura 26 - DSC das micropartículas com Nitroprussiato de Sódio, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

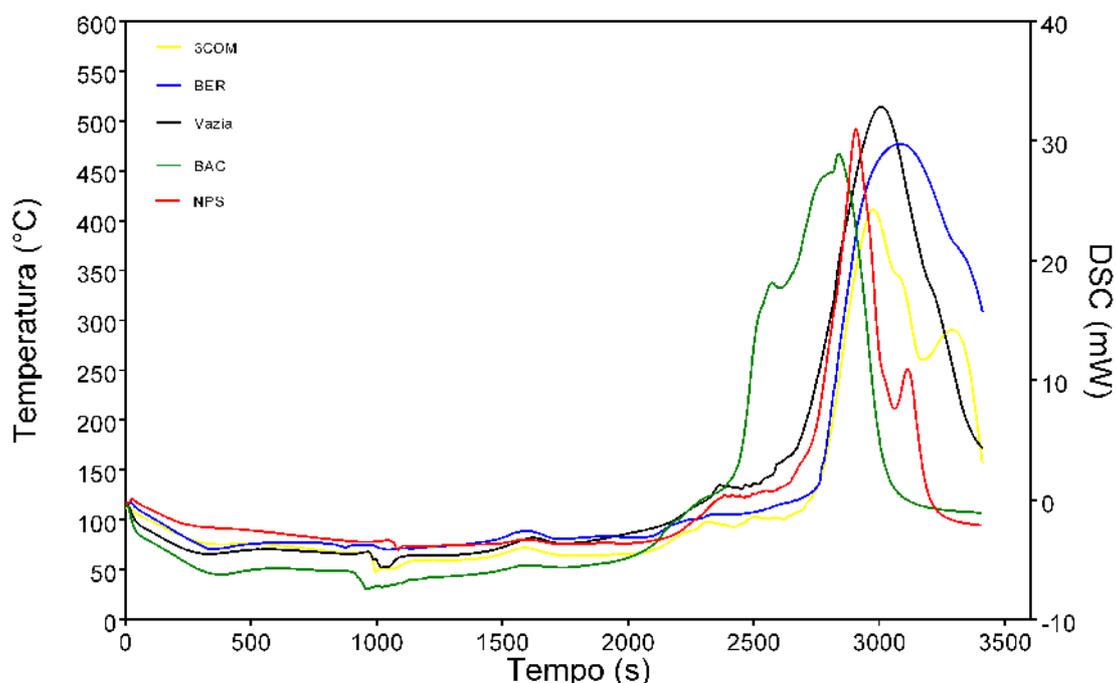
Após a análise DSC das micropartículas com os componentes da formulação em separado, realizamos a análise do perfil das micropartículas compostas por alginato, quitosana, bacitracina, berberina e Nitroprussiato (Figura 27), como podemos observar o mesmo ponto exotérmico (a) obtido nas partículas vazias, os patamares de elevação e estabilização no ponto “b” das partículas vazias, com berberina e com Nitroprussiato, e por fim o mesmo comprimento de onda (c) encontrado no perfil das micropartículas com Nitroprussiato.

Figura 27 - DSC da micropartículas com ALG_QUI_NPS_BER_BAC, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 28 - Curvas DSCs com micropartículas contendo: Berberina, Bacitracina de zinco e Nitroprussiato de sódio (3COM); Berberina (BER); somente as micropartículas sem fármacos (Vazia); Bacitracina de zinco (BAC) e com Nitroprussiato de sódio (NPS), sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio de 50 mL/min e razão de aquecimento de 5 °C/min, no intervalo de temperatura compreendido entre 30 e 150 °C.



Fonte: elaborada pelo autor.

A amostra composta por alginato, quitosana e berberina (● BER) absorveu calor em uma faixa praticamente constante de aproximadamente 85 °C (com a volatilização da água principalmente), após a temperatura elevou-se para 99,2 °C até 129 °C no período de tempo de 582 segundos, deste momento em diante a temperatura elevou-se em um evento exotérmico até a temperatura máxima de 476 °C, após houve a degradação da amostra.

Micropartículas compostas por alginato, quitosana e bacitracina (● BAC) submetidas a análise de DSC, apresentaram o mesmo comportamento da micropartículas vazias com um comprimento de onda endotérmico em 1027 segundos, a partir deste ponto temos três patamares (breves) de eventos exotérmicos o primeiro em 2253 s à temperatura de ~121 °C, o segundo em 2570 s à temperatura de ~339 °C, o terceiro patamar ocorreu em 2774 s à 452

°C, e pôr fim a amostra atingiu o comprimento de onda máximo de 470 °C aos 2845 segundos seguindo-se da degradação da amostra.

Este comportamento pode ser explicado pela molécula da bacitracina, pois a mesma é um polipeptídio (106–108), e estes possuem pontos de fusão e ebulição diferente para cada segmento da molécula.

Na linha (● NPS) está representado o perfil de micropartículas com alginato, quitosana e Nitroprussiato de Sódio (utilizado como doador de Óxido Nítrico), a amostra absorveu temperatura até os 2190 s à 77 °C, neste momento ocorreu um patamar de estabilização por 276 s a uma temperatura de aproximadamente de 125 °C, após elevou-se ao máximo de 487 °C aos 2905 s seguido de um período de perda de massa até o ponto de 3120 segundos à 249 °C onde podemos ver um comprimento de onda exotérmico, após seguiu-se da degradação da amostra.

Por fim podemos considerar após a análise da

Figura 28 e comparação dos perfis em separado, que a linha que representa os componentes (bacitracina, berberina e Nitroprussiato) agregados a matriz de alginato com quitosana (● 3COM) que as micropartículas são termicamente estáveis e apresentam as propriedades dos compostos (analisados de forma em separado) utilizados em sua formação, assim, os resultados nos mostram que as micropartículas possuem as características de estabilidade térmica necessárias para a aplicação em temperatura ambiente.

6.9 Análise dos espectros UV-vis dos componentes

As medidas de absorbância na região do UV-vis das soluções aquosas de bacitracina de zinco, berberina e Nitroprussiato de sódio nas concentrações de 1 mM foram obtidas pelo modo de varredura dentro da faixa espectral de 200 a 800 nm, com velocidade de escaneamento de 600 nm/min.

A utilização dos fármacos nas concentrações de 1 mM foi baseada nas referências encontradas onde o IC₅₀ da bacitracina utilizada como bactericida é de 0,01 mM (74,109) o da berberina (IC₅₀ em que apresentou atividade

bactericida) de 0,3 µg/ml (0,00081 mM) (79) nitroprussiato é 0,01 a 2,0 mM (79), assim para maior controle das velocidades de liberação optamos por manter as concentrações em 1 mmol para todos os fármacos.

Os valores das leituras dos picos de absorbância e intensidade dos fármacos conforme a Tabela 7 abaixo, foram utilizados na determinação do perfil de liberação dos fármacos no período de 5 horas de coletas de dados.

Tabela 7 - Dados referentes aos comprimentos de onda de absorbância (nm) característicos dos fármacos com intensidade em absorbância (A).

FÁRMACO	COMPRIMENTOS DE ONDA (NM)	CONCENTRAÇÃO (mM)	INTENSIDADE (A)
BACITRACINA DE ZINCO	254	1,00	0,1390
BERBERINA	344	1,00	0,0337
NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	260	1,00	0,6712

Comprimentos de onda de absorbância característicos dos fármacos.

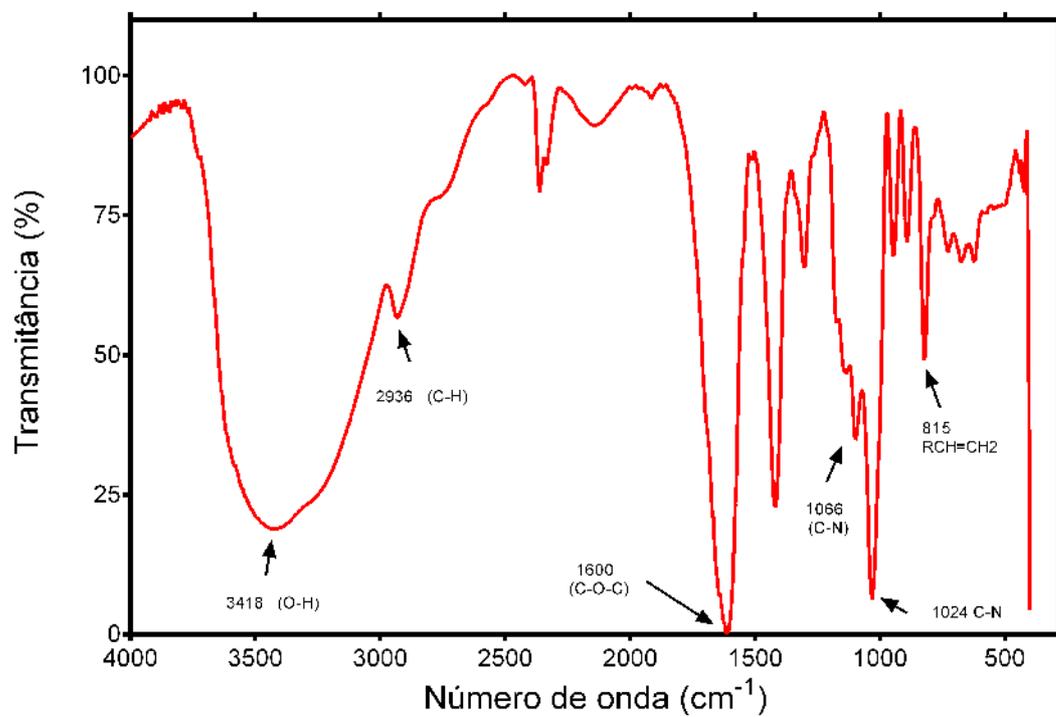
Fonte: elaborada pelo autor.

6.10 Análise de FTIR

A análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), é uma das técnicas mais utilizadas para caracterizar compostos químicos caracterizados com grau de pureza analítica, ou associados a outros compostos químicos (56,110).

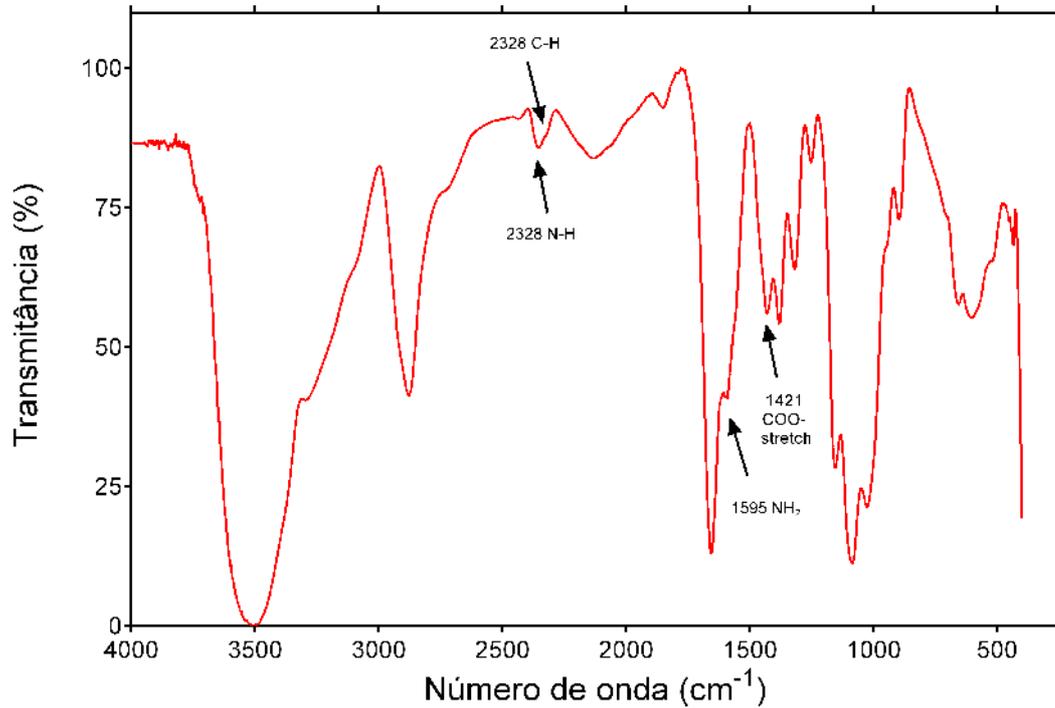
Podemos observar na Figura 29 o perfil FTIR do Alginato, nesta análise utilizou-se de 2 mg de alginato com aproximadamente 60 mg de KBr (Brometo de potássio). Os grupos funcionais do alginato de sódio foram identificados com base na literatura consultada (47,92,111,112), obtivemos as bandas típicas do alginato de sódio.

Figura 29 - Perfil FTIR do Alginato de sódio preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 30 - Perfil FTIR da Quitosana. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70,0 mg sendo 2,5 % de amostra.

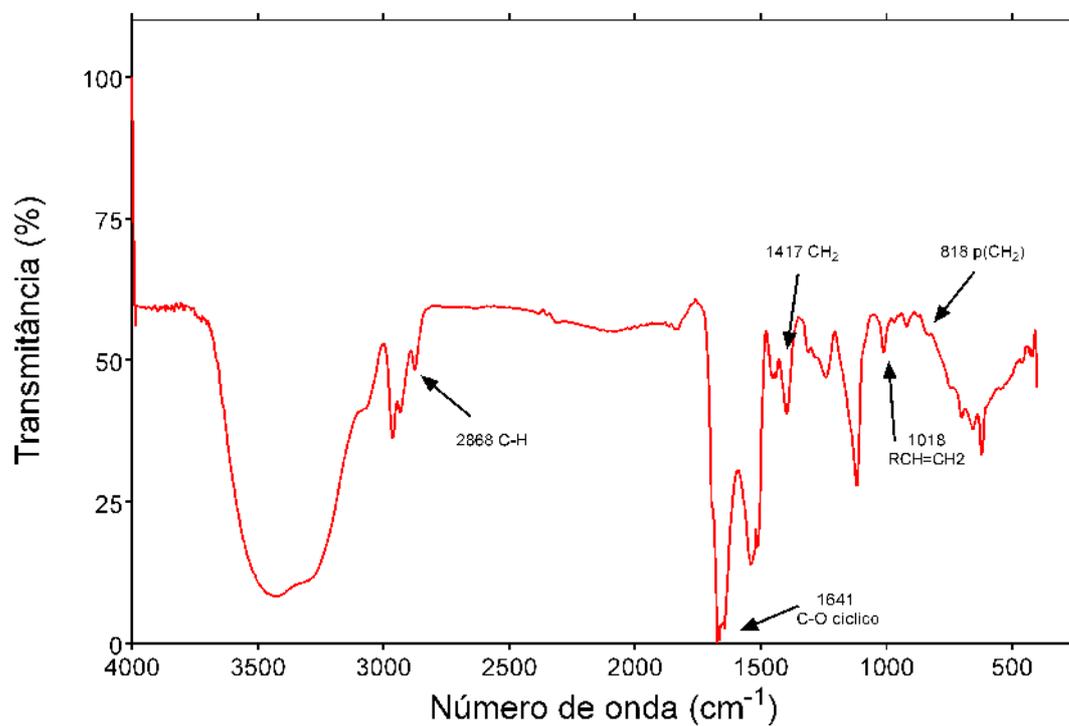


Fonte: elaborada pelo autor.

Analisando a

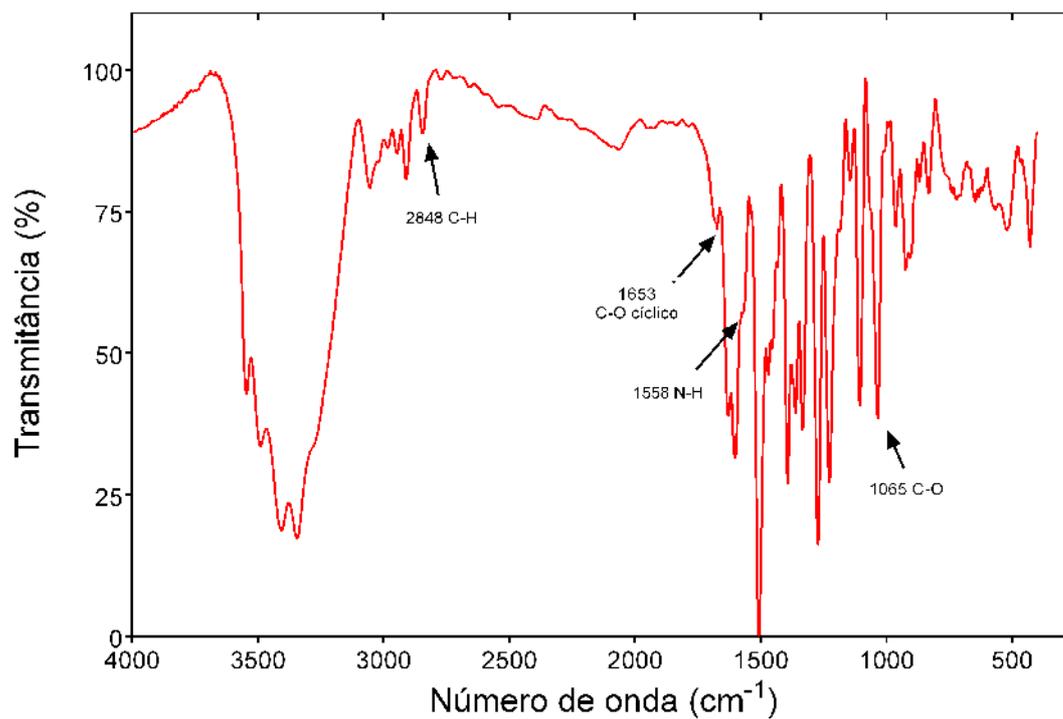
Figura 31, verificamos os três comprimentos de onda de comprimento de onda de ~1411, ~1018 e 815, característicos do fármaco Bacitracina conforme a Tabela 8, sugerindo se que o mesmo foi encapsulado com sucesso nas amostras analisadas e que os procedimentos de funcionalização superficial ocorreram como esperado.

Figura 31 - Perfil FTIR da Bacitracina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.



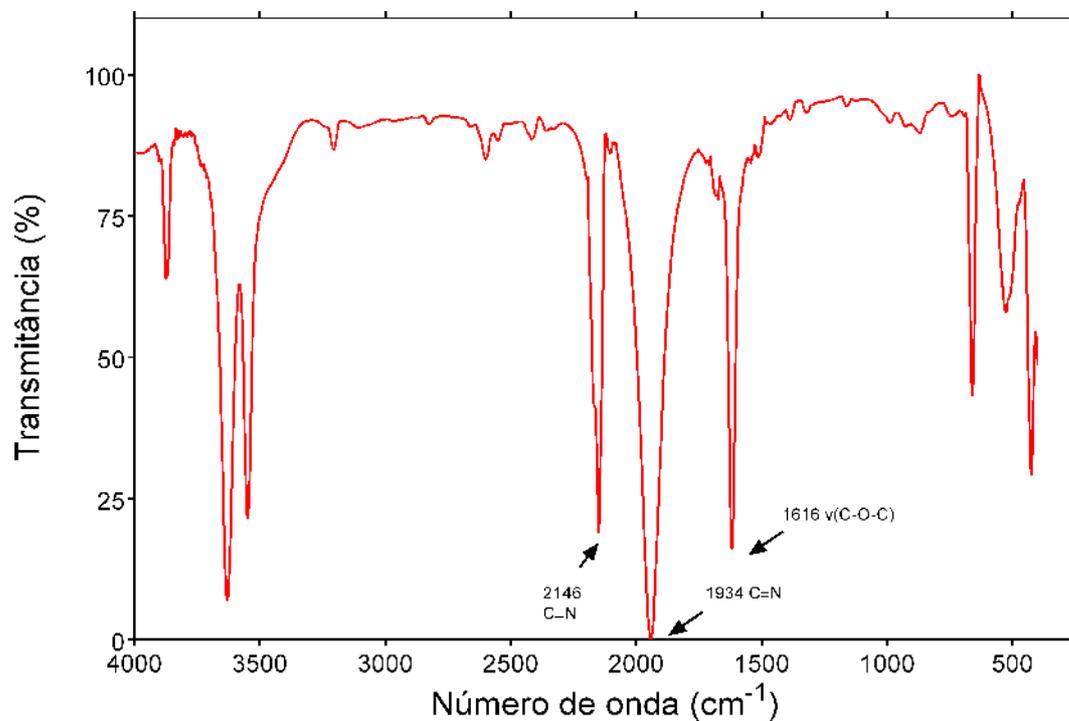
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 32 - Perfil FTIR da Berberina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.



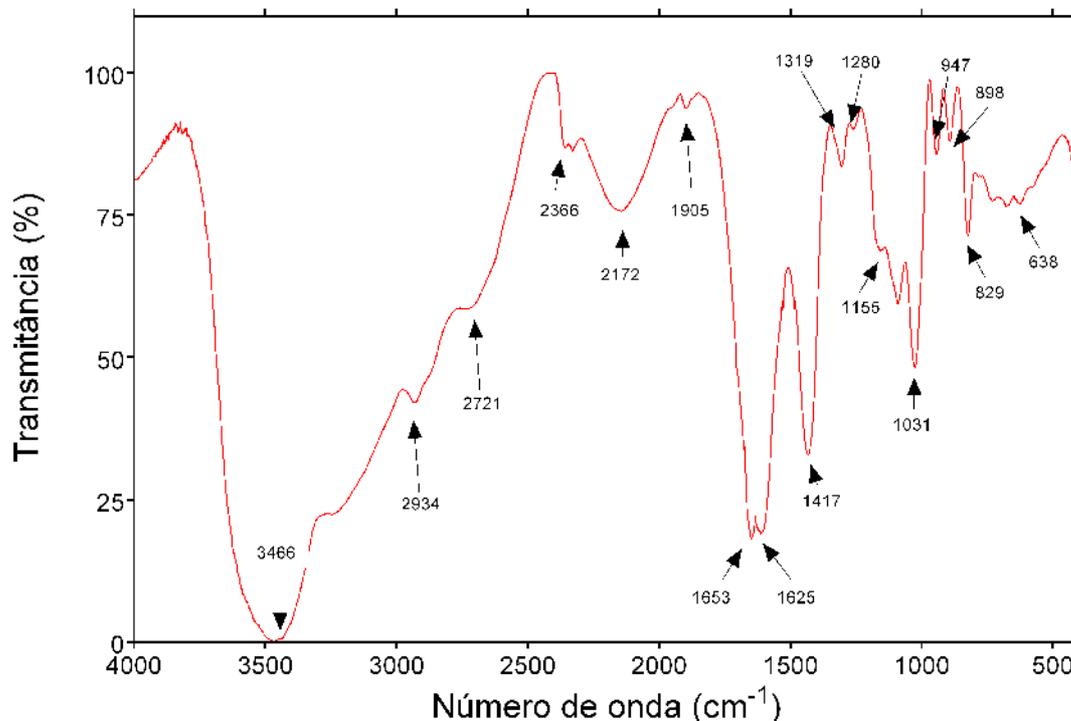
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 33 - Perfil FTIR do Nitroprussiato de Sódio. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.



Fonte: elaborada pelo autor.

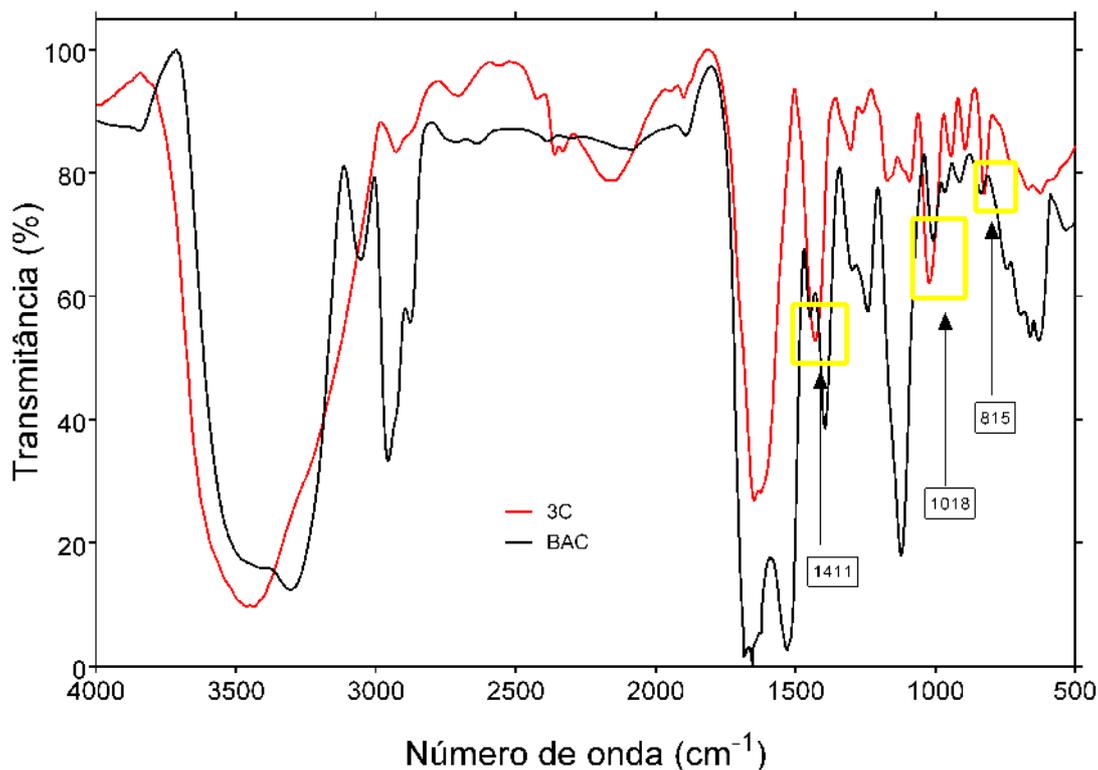
Figura 34 - Perfil FTIR da partícula com todos os componentes da formulação (ALG_QUI_NPS_BER_BAC), onde se visualiza os comprimentos de onda característicos da bacitracina. Foram preparadas pastilhas de KBr com aproximadamente 70 mg sendo 2,5 % de amostra.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nas análises de FTIR podemos verificar a mesma banda em aproximadamente 3500 cm^{-1} característico de ligação O-H, banda forte, larga, resultante da associação polimérica. A intensidade desta banda depende da concentração de umidade na amostra (113).

Figura 35 - Espectros infravermelhos de alginato de sódio, quitosana, bacitracina, berberina e Nitroprussiato de sódio (3C), e espectro da bacitracina (BAC). Os espectros de transmissão foram registrados usando pelo menos 40 varreduras com resolução de 4,0 cm^{-1} .



Fonte: elaborada pelo autor.

Na Tabela 8, encontram-se os grupos funcionais característicos dos fármacos utilizados, conforme as referências encontradas na área de estudo.

Tabela 8 - Transições identificadas nos fármacos em seu estado como recebido do fornecedor e nas micropartículas confeccionadas, identificação das bandas seguindo as referências consultadas.

FÁRMACO	Nº DE ONDA CM^{-1}	GRUPO FUNCIONAL CARACTERÍSTICO	REFERÊNCIAS CONSULTADAS
ALGINATO	3418	ν (O-H)	SUROJIT, B. (111)
	2936	ν (C-H)	PINHEIRO, W. (92)
	1600	ν (C-O-C)	HUINAN, C. (38)
	1066	C-N	

	1024	RCH=CH ₂	
	815	ρ(CH ₂)	
QUITOSANA	2328	N-H	PINHEIRO, W. (92)
	2318	C-H	HUINAN, C. (38)
	1595	ν (NH ₂);	
	1421	ν (COO-) stretch	
BACITRACINA DE ZINCO	1417	CH ₂	MING, L. (71)
	1018	RCH=CH ₂	
	818	ρ(CH ₂)	
BERBERINA	2848	ν (C-H)	PINHEIRO, W. (92)
	1683	ν (C=C, C=N)	BAHAR, M (78)
	1653	Estiramento	C-O
	1558	cíclico N-H	
	1065	ν (C-O)	
NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	1681	C=C	GASPARI, A. (114)
	1645	C=C	
	1506	C=C aromática	
MICROPARTÍCULAS COM TODOS COMPOSTOS	2328	N-H	BAHAR, M (78)
	2318	C-H	GASPARI, A. (114)
	1686	C=O	SUROJIT, B. (111)
	1683	ν (C=C, C=N)	PINHEIRO, W. (92)
	1635	C=C	HUINAN, C. (38)
	1658	N-H	MING, L. (71)
	1653	Estiramento	C-O
	1506	cíclico	
	1024	ν (C=C, C=N)	
	1018	RCH=CH ₂	
	1411	RCH=CH ₂	
	818	CH ₂	
	815	ρ (CH ₂)	
		ν (C-O-C)	

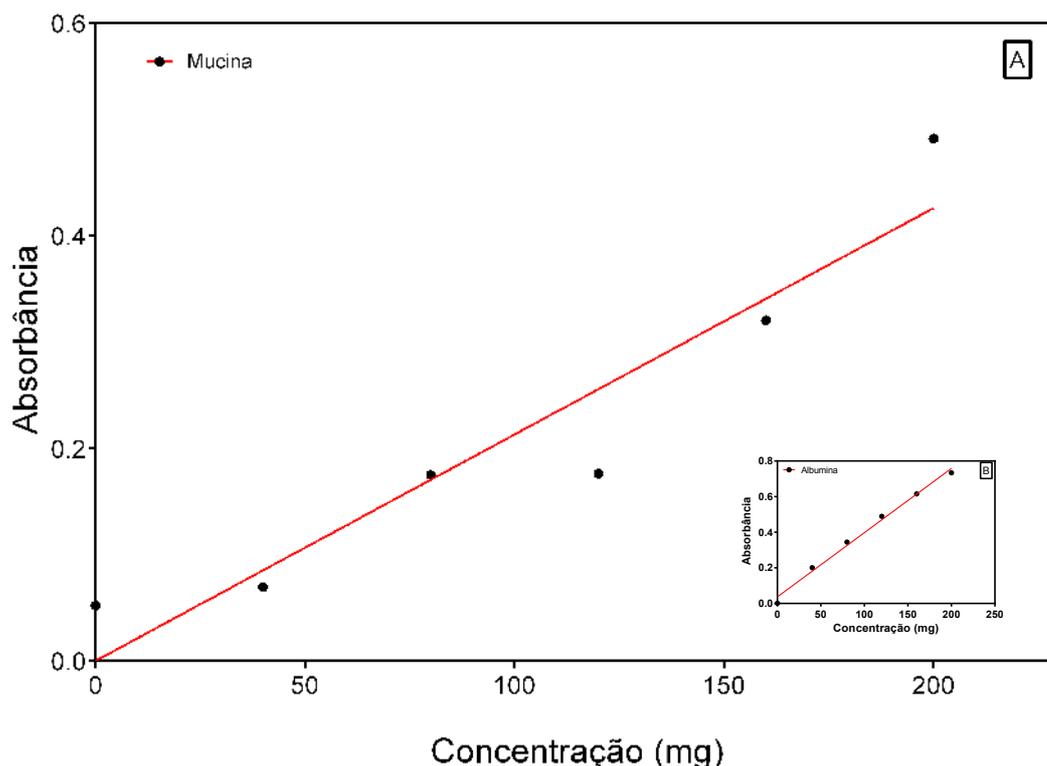
Fonte: elaborada pelo autor.

6.11 Teste de Bioadesão com Mucina

Para o ensaio de Bioadesão foi selecionada a amostra BAC_BER_NPS, a propriedade mucoadesiva das micropartículas foi analisada por meio da interação *in vitro* com a mucina (85) utilizando-se o método de Lowry.

A leitura dos espectros na região do visível foi realizado no comprimento de onda de 749 nm, e as concentrações calculadas a partir da equação da reta $y = 0,003607x + 0,03678$, obtidas por meio da curva de calibração com albumina de soro bovino (Figura 36).

Figura 36 - Gráfico de padrão de Mucina (A) e padrão Albumina (B).



Fonte: elaborada pelo autor.

A porcentagem de micropartículas aderidas a mucina foi de 34 ~ 66 %. Estes valores podem ser atribuídos a interação da quitosana com o alginato, pois segundo os trabalhos consultados (16,66,85,86), a mucina tem uma afinidade pelas ligações dos grupamentos amina da quitosana, carregadas positivamente, e as cargas negativas do alginato de sódio. As ligações que ocorrem entre os grupamentos amina da quitosana e os grupos carboxílicos do alginato, assim podem ser atribuídas a taxa aderência das micropartículas com a mucina aos valores do grau de desacetilação sofrido pela quitosana (16,66,85,86).

6.12 Análise da atividade antibacteriana *in vitro*

Os controles negativos funcionaram bem, o *S. aureus* Gram positivo e a *E. coli* Gram-negativa cresceram tanto no meio líquido como no sólido, micropartículas vazias não afetaram o crescimento bacteriano (

Figura 37).

O controle positivo Ampicilina e os compostos não encapsulados em estudo inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, exceto BAC que inibiu apenas *S. aureus*, como esperado, devido a sua ação restrita em bactérias Gram positivas.

A BER isolado não teve efeito bactericida em *S. aureus* e *E. coli*, mas mostrou efeito bacteriostático (

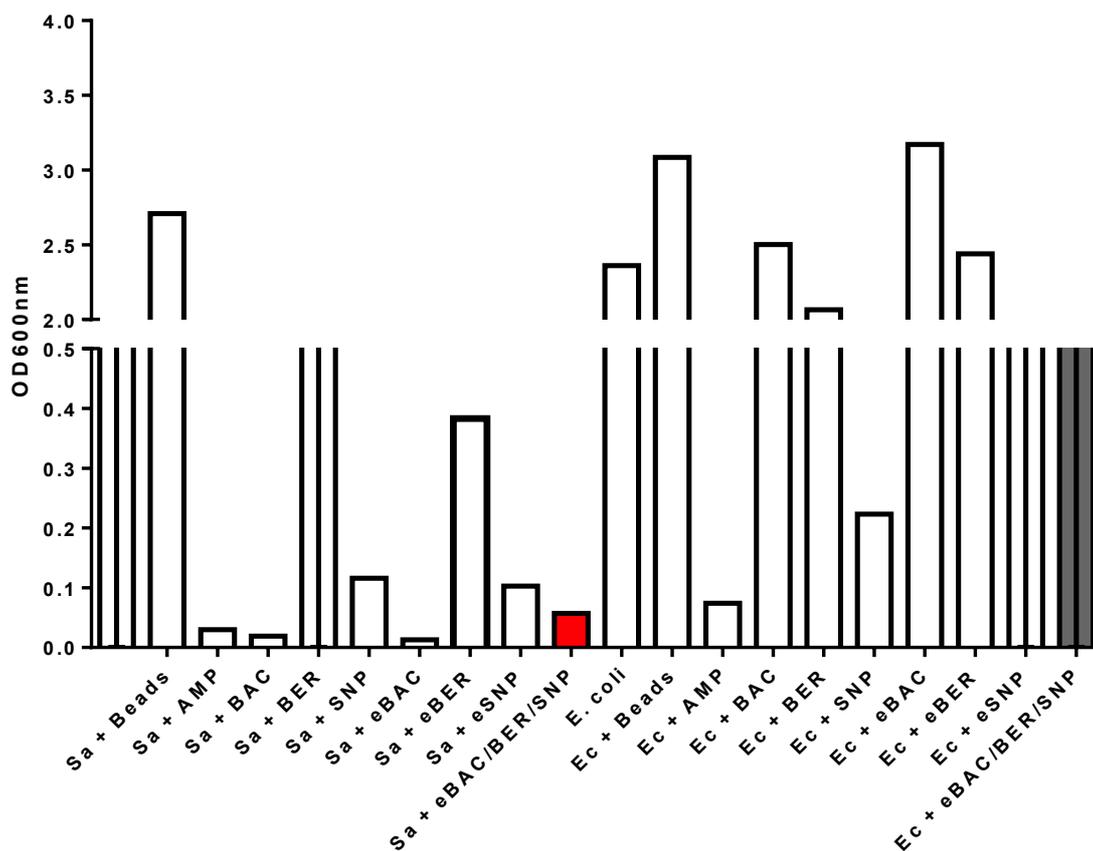
Figura 37) e ação bactericida moderada em *S. aureus* (

Figura 38) quando encapsulado em micropartículas.

As micropartículas com BAC e SNP tiveram efeito bacteriostático em *S. aureus*, mas apenas o SNP encapsulado teve algum efeito sobre *E. coli*.

Como observado pelo sistema proposto, os resultados mostraram uma atividade bacteriostática e bactericida sobre a bactéria *S. aureus*. Este resultado pode indicar que o sistema tem um uso futuro promissor como ferramenta para o controle de bacterioses em peixes.

Figura 37 - Avaliação da atividade bacteriostática. *S. aureus* (Sa) ou *E. coli* (Ec) foram incubados na presença de micropartículas vazias, compostos isolados Ampicilina (AMP), Bacitracina (BAC), Berberina (BER).

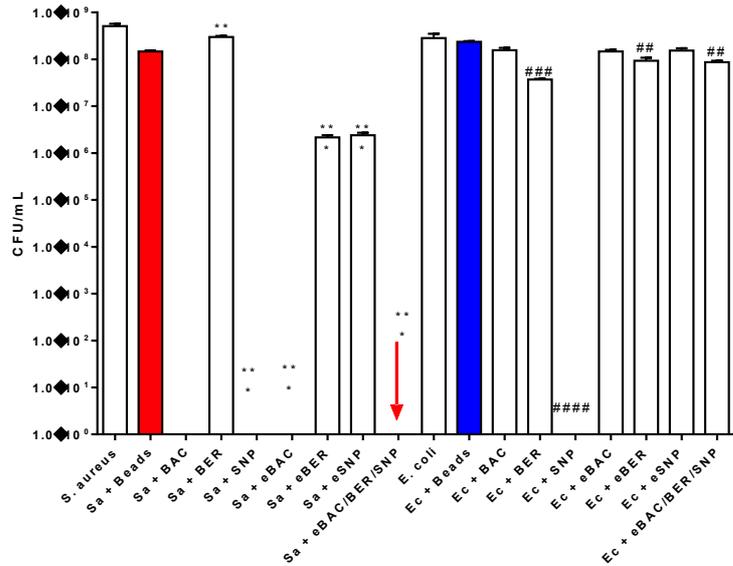


Fonte: elaborado pelo autor.

As micropartículas com bacitracina mantiveram o efeito bactericida sobre *S. aureus*, que também foi observado em compostos isolados como nitroprussiato de sódio e berberina. Na

Figura 38 é exibido o efeito bactericida no Eppendorf carregado com BER + BAC + SNP (seta vermelha).

Figura 38 - Avaliação da atividade bactericida. *S. aureus* (Sa) ou *E. coli* (Ec) foram incubados na presença de micropartículas vazias, compostos isolados Ampicilina (AMP), Bacitracina (BAC), Berberina (BER).



valores de P para Sa comparada com o controle Sa+Beads

** P=0.0004
 *** P=0.0007
 **** P= 0.0001

valores de P para Ec comparada com o controle Ec+Beads

P=0.005
 ### P=0.0004
 #### P= 0.0001

Fonte: elaborado pelo autor.

Na

Tabela 9 tem-se o teste de inibição de crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, onde é possível verificar o crescimento em Eppendorf com meio de cultura MS, as colônias iniciais seguiram a escala de turbidez de McFarland (115–117), após a análise estatística em relação ao controle com as micropartículas sem os fármacos (Sa + Beads e Ec + Beads), as micropartículas aplicadas a *S. aureus* avaliadas foram significativamente diferentes (Dunnett's teste $*p < 0,0001$). Em relação a inibição entre as formulações aplicadas a *E. coli*, não foi observado diferença estatística entre as formulações com todos os fármacos, a única formulação que apresentou efeitos bactericidas foram as micropartículas contendo apenas o fármaco nitroprussiato de sódio, conforme pode ser visto na

Figura 38.

Tabela 9 - Resultados da análise estatística de Dunnett's, com nível de significância de $P < 0,0001$.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Ec + Beads vs. E. coli	-4.667e+007	-1.548e+008 to 6.152e+007	No	ns	0.7081
Ec + Beads vs. Ec + BAC	8.000e+007	-2.818e+007 to 1.882e+008	No	ns	0.2042
Ec + Beads vs. Ec + BER	1.997e+008	9.148e+007 to 3.078e+008	Yes	***	0.0004
Ec + Beads vs. Ec + SNP	2.367e+008	1.285e+008 to 3.448e+008	Yes	****	< 0.0001
Ec + Beads vs. Ec + eBAC	9.000e+007	-1.818e+007 to 1.982e+008	No	ns	0.1269
Ec + Beads vs. Ec + eBER	1.433e+008	3.515e+007 to 2.515e+008	Yes	**	0.0073
Ec + Beads vs. Ec + eSNP	8.333e+007	-2.485e+007 to 1.915e+008	No	ns	0.1749
Ec + Beads vs. Ec + eBAC/BER/SNP	1.500e+008	4.182e+007 to 2.582e+008	Yes	**	0.0050

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Sa + Beads vs. S. aureus	-3.667e+008	-4.502e+008 to -2.831e+008	Yes	****	< 0.0001
Sa + Beads vs. Sa + BAC	1.467e+008	6.309e+007 to 2.302e+008	Yes	***	0.0006
Sa + Beads vs. Sa + BER	-1.533e+008	-2.369e+008 to -6.975e+007	Yes	***	0.0004
Sa + Beads vs. Sa + SNP	1.467e+008	6.309e+007 to 2.302e+008	Yes	***	0.0006
Sa + Beads vs. Sa + eBAC	1.467e+008	6.309e+007 to 2.302e+008	Yes	***	0.0006
Sa + Beads vs. Sa + eBER	1.445e+008	6.092e+007 to 2.281e+008	Yes	***	0.0007
Sa + Beads vs. Sa + eSNP	1.443e+008	6.069e+007 to 2.278e+008	Yes	***	0.0007
Sa + Beads vs. Sa + eBAC/BER/SNP	1.467e+008	6.309e+007 to 2.302e+008	Yes	***	0.0006

Fonte: elaborado pelo autor.

6.13 Análise do isolamento de bactérias em peixes

As amostras (Figura 39) foram processadas assim que chegaram no laboratório, sendo realizadas as diluições em água peptonada 0,1 % (H₂O_p) e inoculadas em meio padrão para contagem (PCA).

Após as 24 horas de inoculação iniciou-se os testes de identificação bioquímica (5,9,19,116,118–123) dos gêneros de bactérias presentes nos espécimes coletados, obtendo-se os seguintes resultados conforme a Tabela 10 abaixo:

Figura 39 - Peixes coletados, (A) peixe sem sinais sintomáticos, (B) peixe



encontrado com sinais sintomáticos e (C) peixe coletado já morto.

Fonte: autor

Tabela 10 - Testes de identificação realizados nas amostras coletadas dos peixes, seguindo os protocolos em vigência (115,116,118).

Testes	Amostras			
	Coco	Bacilo	Coco	Coco
Forma celular				
Coloração de Gram	+	-	+	+
KOH 40 %	-	-	+	-
Oxidase	-	-	-	-

Catalase	+	+	+	-
Oxidação	+	+	+	+
Fermentação	+	-	-	-
Glucose	+	+	-	+
Urease	-	+	-	+
Mcconkey	-	-	+	-
Citrato	+	-	-	+
Bactérias	<i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i>	<i>Nocardia</i> <i>sp.</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>sp.</i>	<i>Lactococcus</i> <i>sp.</i>

Fonte: elaborada pelo autor.

Alguns dos microorganismos coletados não puderam ser identificados com os testes disponíveis, mas, podemos perceber que nas amostras coletadas ocorre o predomínio de bactérias Gram-positivas.

Os resultados obtidos neste trabalho foram similares a outros relatos já descritos (5,9,19,116,118–123) para o gênero *Staphylococcus*. Alguns resultados nas reações bioquímicas do metabolismo de glicose, produção de uréase e reação em citrato de Simons, caracterizam as amostras como sendo do gênero *Staphylococcus sp.*, em nível de espécie, os resultados observados são semelhantes para as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. Warneri*, ou até alguma outra pertencente ao gênero.

Para os testes de antibiograma foram utilizadas as bactérias identificadas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, as culturas de microorganismos foram mantidas a 4 °C em glicerol.

As amostras foram recuperadas em caldo Mueller-Hinton (MH), e incubadas sem agitação durante 24 horas a 36 °C antes do teste. Posteriormente, os inóculos foram repicados em placas de ágar Mueller-Hilton 24 horas antes do teste. Foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina 0,85 % utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹).

A solução com as bactérias foi inoculadas em meio de cultura sólido de Mueller Hilton preparado no mesmo dia conforme especificações do fabricante, as placas contendo 20 ml de meio de cultura foram inoculadas em duplicatas com as cepas de *S. aureus* e *E. coli* conforme as normas internacionais para análise de microorganismos (120,121) e Beads utilizadas para o teste de

antibiograma foram pesadas obtendo-se Beads controle (sem fármacos) 0,5422; Beads com Bacitracina de zinco (BAC) 0,5236; Beads contendo Berberina (BER) 0,5035; Beads contendo Nitroprussiato de sódio (NPS) 0,5182 e Beads contendo os três componentes BER/BAC/NPS 0,5356 e como controle extra (positivo) foi utilizado a Ampicilina 50 ug/mL.

Após a inoculação das placas com *S. aureus* e *E. coli* e inserção dos discos de antibiograma contendo as Beads as placas permaneceram por 24 horas em estufa bacteriológica à 35 ± 2 °C. os dados coletados encontram-se na Tabela 11, abaixo:

Tabela 11 - Valores do diâmetro dos halos (em mm) obtidos nos testes de antibiograma.

Amostra	Halo de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Solução	micropartículas	Solução	micropartículas
CNSS	0	0	0	0
CPBAC	31,850 ± 0,495	32,520 ± 0,679	27,85 0± 0,495	26,750 ± 0,071
MPBAC	22,800 ± 0,849	16,250 ± 0,071	0	0
MPBER	12,550 ± 0,495	10,800 ± 0,990	0	0
MPNPS	9,850 ± 0,354	10,250 ± 0,071	0	0
MP3C	0	13,750 ± 2,051	0	0

Onde: Controle Negativo Solução Salina (CNSS); Controle Positivo Disco Padrão Bacitracina (CPBAC); micropartículas Bacitracina de Zinco (MPBAC); micropartículas Berberina (MPBER); micropartículas Nitroprussiato de Sódio (MPNPS); micropartículas com os três fármacos Bacitracina, Berberina e Nitroprussiato (MP3C).

Fonte: elaborada pelo autor.

Como era esperado as Beads não apresentaram efeitos de inibição nas placas contendo *E. coli*, pois a mesma é Gram-negativa e o antibiótico Bacitracina de zinco não apresenta efeitos em bactérias Gram-negativas, o antibiótico Ampicilina (controle positivo) de amplo espectro, como esperado,

apresentou efeitos bactericidas em *S. aureus* com halos de inibição de $32,520 \pm 0,679$ mm e $26,750 \pm 0,071$ mm em *E. coli*.

Como podemos observar na Tabela 11, obtemos resultados positivos comparando-se os valores dos resultados de inibição dos compostos em solução e os compostos encapsulados.

Figura 40 - Teste de antibiograma *S. aureus*, em meio de cultura de Mueller Hilton.

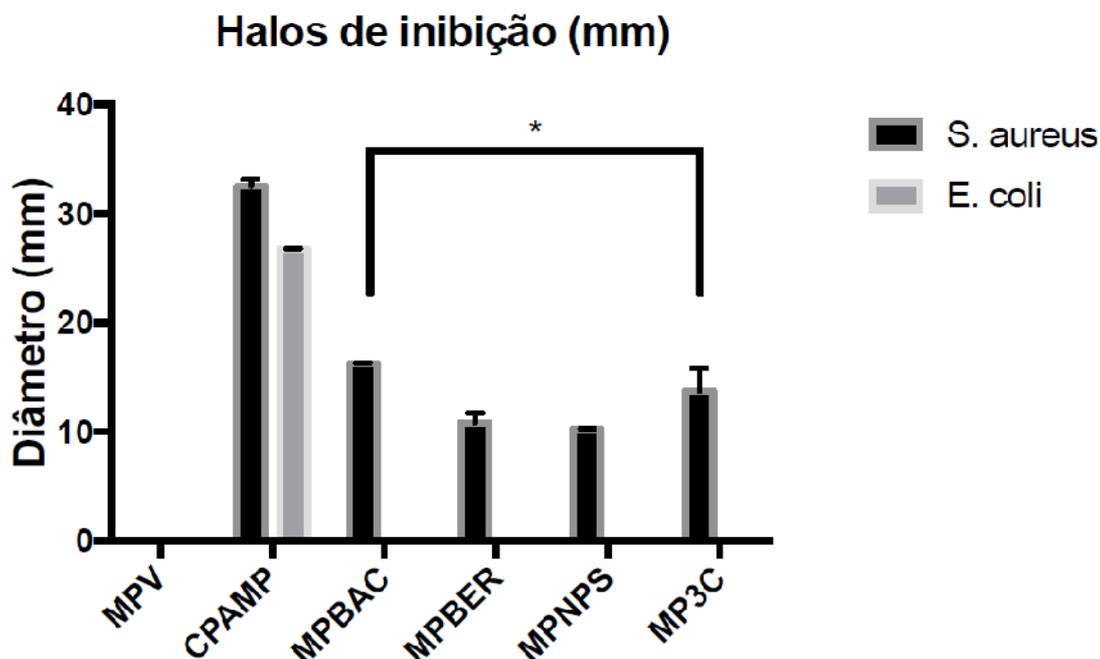


Fonte: autor

Os resultados dos testes de inibição (Figura 40), comprovam que os componentes utilizados na síntese das Beads continuam com sua ação bactericida depois de encapsulados, sendo uma alternativa para controle de bacterioses promissora.

A comparação entre os valores de halos de inibição mostrados na Figura 41, demonstram os efeitos dos fármacos utilizados, micropartículas com os componentes utilizados em separado apresentaram efeitos bactericidas nas culturas de *S. aureus* similares ao da Bacitracina de zinco em solução. Estes dados coletados demonstram que o antibiótico foi encapsulado e continua apresentando os efeitos desejados no tratamento de *S. aureus*. As amostras foram divididas em dois grupos: fármacos em solução e encapsulados nas Beads. Todos ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 41 - Halos de inibição (mm) formados em meio de cultura inoculados com *S. aureus* e *E. coli*.



Onde: micropartículas vazias (sem fármacos) (MPV); Controle Positivo Disco Padrão Ampicilina (CPAMP); micropartículas Bacitracina de Zinco (MPBAC); micropartículas Berberina (MPBER); micropartículas Nitroprussiato de Sódio (MPNPS); micropartículas com os três fármacos Bacitracina, Berberina e Nitroprussiato (MP3C).

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 12 - Resultados da análise estatística de Tukey's, com nível de significância de $P < 0,0001$.

Teste Múltiplo De Comparação De Tukey's	Diferença a Média	95,00% Ci Of Diff,	Significativo	Resumo	Valor P Ajustado
MPV VS. CPAMP	-29,64	-31,27 to -280	Sim	****	<0,0001
MPV VS. MPBAC	-8,125	-9,75 to -6,49	Sim	****	<0,0001
MPV VS. MPBER	-5,4	-7,03 to -3,76	Sim	****	<0,0001
MPV VS. MPNPS	-5,125	-6,75 to -3,49	Sim	****	<0,0001
MPV VS. MP3C	-6,875	-8,50 to -5,24	Sim	****	<0,0001
CPAMP VS. MPBAC	21,51	19,88 to 23,14	Sim	****	<0,0001
CPAMP VS. MPBER	24,24	22,6 to 25,87	Sim	****	<0,0001
CPAMP VS. MPNPS	24,51	22,88 to 26,14	Sim	****	<0,0001
CPAMP VS. MP3C	22,76	21,13 to 24,39	Sim	****	<0,0001
MPBAC VS. MPBER	2,725	1,09 to 4,35	Sim	**	0,0012
MPBAC VS. MPNPS	3	1,36 to 4,63	Sim	***	0,0005
MPBAC VS. MP3C	1,25	-0,38 to 2,88	Não	ns	0,1776
MPBER VS. MPNPS	0,275	-1,35 to 1,90	Não	ns	0,9915
MPBER VS. MP3C	-1,475	-3,10 to 0,15	Não	ns	0,0852
MPNPS VS. MP3C	-1,75	-3,38 to -0,11	Sim	*	0,0331

Onde: micropartículas vazias (sem fármacos) (MPV); Controle Positivo Disco Padrão Ampicilina (CPAMP); micropartículas Bacitracina de Zinco (MPBAC); micropartículas Berberina (MPBER);

micropartículas Nitroprussiato de Sódio (MPNPS); micropartículas com os três fármacos Bacitracina, Berberina e Nitroprussiato (MP3C).

Fonte: elaborada pelo autor.

Ainda na Figura 41 , tem-se o teste de inibição de crescimento das bactérias identificadas das amostras coletadas dos peixes, onde é possível verificar o diâmetro do halo de inibição, após a análise estatística em relação ao controle positivo CPAMP, as micropartículas avaliadas foram significativamente diferentes (Turkey's teste $*p < 0,0001$. Em relação a inibição entre as formulações, não foi observado diferença estatística, entre MPBAC vs. MP3C; MPBER vs. MPNPS e MPBER vs. MP3C, conforme Tabela 12.

7 DISCUSSÃO

A seguir serão discutidos os resultados obtidos da formulação do sistema de entrega de fármacos contendo o antibiótico bacitracina de zinco, o fitoterápico berberina e o Nitroprussiato de sódio como doador de óxido nítrico, encapsulados na matriz de alginato de sódio recobertas com quitosana.

As micropartículas foram formuladas, como descrito na sessão de material e métodos, onde obtivemos micropartículas com tamanhos de $797 \pm 0,0159 \mu\text{m}$ quando secas, e $2202 \pm 0,0498 \mu\text{m}$ quando totalmente intumescidas, demonstrando um aumento de volume de 197 vezes. A média de tamanho obtida pelo método de gelificação ionotrópica entre alguns dos pesquisadores foi para Boni (85) $701,292$ à $980,322 \mu\text{m}$; Amit (90,124) $1620 \pm 0,22 \mu\text{m}$; Reis (40,67) $10 \mu\text{m}$; Prezotti (39,69) $728,29$ à $924 \mu\text{m}$; Sum (97) $876,1$ à $1079,8 \mu\text{m}$; o agente reticulador utilizado pelos autores também foi o CaCl_2 , assim consideramos que as micropartículas confeccionadas estão dentro dos padrões obtidos como referência da literatura.

Além disso o tamanho depende do método de extrusão da solução de alginato na solução de quitosana, no nosso caso foi utilizada uma seringa com agulha de tamanho médio (23G 1'' (0,6 x 25 mm)) o que produziu micropartículas com tamanho, que consideramos, de fácil manuseio quando da inserção em rações para peixes de tanques ou podendo, ainda, ser oferecida na sua forma pura para peixes ornamentais, em trabalho futuro.

Além do tamanho das micropartículas outro fator de importância em relação a administração de fármacos por via oral, temos a carga superficial, após análise com Zetasizer, como esperado as micropartículas apresentaram um valor em torno de $+0,305 \text{ mV}$, devido aos grupos amino e carboxila da superfície atribuídos a quitosana, conforme relatado em trabalhos da literatura (95), a introdução de quitosana pode melhorar as propriedades bioadesivas das micropartículas à regiões específicas do trato gastrointestinal, principalmente o intestino delgado, íleo, e cólon, tendo efeitos no prolongamento do tempo de residência no sítio da aplicação e absorção (44,96).

É importante ressaltar que os valores obtidos dos comprimentos de onda de espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-vis), em relação as intensidades, identificamos os valores característicos que se devem as transições do tipo $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$ para o caso da bacitracina, no caso da Berberina o espectro apresenta transições do tipo $\pi\text{-}\pi^*$, $n\text{-}\pi^*$ da molécula, como já reportado por Bujdak, Ratulovska et. al. (125).

Os espectros de emissão de fluorescência apresentam picos característicos em 254 nm para a Bacitracina (72,74,108), 344 nm para a Berberina (52,76,126), e 260 nm para Nitroprussiato de sódio (39,114,127,128). Todos os valores citados encontram respaldo na literatura.

Para efeitos de leitura de absorvância nos testes de liberação dos fármacos utilizamos como referência o valor de absorvância da Berberina de 344 nm, pois, os valores encontrados para bacitracina de zinco e nitroprussiato são muito próximos 254 e 260 nm, respectivamente, tal procedimento se fez necessário para que não ocorresse sobreposição dos comprimentos de ondas de absorvância durante os ensaios de liberação, e como esperado os perfis de liberação e cinética química puderam ser analisados sem interferência entre os fármacos.

Com os valores de referência para identificação dos fármacos seguiu-se para as análises de eficiência de encapsulação dos fármacos. A eficiência de encapsulação foi obtida utilizando-se o método indireto que consiste no cálculo da concentração dos fármacos no sobrenadante.

A porcentagem de eficiência de encapsulamento obtida foi de $99\pm 0,5\%$. Este alto valor de eficiência obtido, pode ser devido à concentração de quitosana, resultando na formação de uma camada mais espessa na superfície das partículas, o que reduziu a possibilidade de lixiviação do medicamento durante a reticulação dos grânulos. Assim, finalmente, causou a retenção de mais partículas de fármaco na matriz de gel de alginato durante a preparação das partículas.

Na literatura encontramos diversos valores de eficiência de encapsulação utilizando-se de quitosana e alginato, que vão desde 80, a 86 % (26,64,97,105), também temos os valores de eficiência de 63 % para o uso

apenas da quitosana (40), e com alginato, sem adição de quitosana, foram obtidos valores entre 60 e 80 % de eficiência (63,107,129,130). Estes valores obtidos pelos autores, correspondem a fármacos diversos, com estruturas químicas diversas e muitas vezes ocorrem reações químicas entre os fármacos e o alginato ou quitosana durante a reticulação. No nosso caso os ensaios de FTIR (discutido mais adiante), demonstraram que não houve interação entre os fármacos utilizados e o alginato e quitosana durante e após a reticulação.

A morfologia da superfície das micropartículas foi obtida com um microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde obtivemos imagens que caracterizam a esfericidade e superfície rugosa (Figura 13), causadas pelo colapso parcial da rede polimérica durante a secagem, as quais estão de acordo com outros achados de pesquisa (27,38,64,68,85,97,131,132).

Fatores como a rugosidade das micropartículas tem uma grande influência no perfil de liberação dos fármacos *in vivo*, já que afetam a área de contato entre as micropartículas e as microvilosidades do intestino do organismo (123), este aspecto aliado a aderência do muco característico dos peixes, garante o tempo necessário para a liberação dos fármacos da matriz de alginato e quitosana.

Foi identificado o comprimento de onda semelhante em todos os perfis analisados, em aproximadamente 3500 cm^{-1} a intensidade desta banda está relacionada com a concentração de umidade na amostra (113), esta umidade é resultante do processo de secagem natural (sem uso de equipamento), onde um residual pode ser encontrado no interior das micropartículas (113).

A

Figura 31, verificamos os três comprimentos de ondas de comprimento de onda de ~ 1411 (CH_2), ~ 1018 ($\text{RCH}=\text{CH}_2$) e 815 ($\rho(\text{CH}_2)$), conforme as referências consultadas MING, L. (71–73), característicos do fármaco Bacitracina de zinco, conforme a Tabela 8, sugerindo se que o mesmo foi encapsulado com sucesso nas amostras analisadas e que os procedimentos de funcionalização superficial ocorreram como esperado.

As micropartículas contendo a formulação completa, apresentaram os grupamentos mencionados acima, o que sugere que os fármacos bacitracina

de zinco, berberina e nitroprussiato de sódio, foram encapsulados com sucesso nas amostras analisadas e que os procedimentos de funcionalização superficial ocorreram como esperado, ressaltando que ocorreu apenas o processo de encapsulamento onde os fármacos usados mantiveram suas propriedades químicas, física e farmacológicas inalteradas dentro da matriz polimérica.

Após a caracterização por FTIR as amostras foram submetidas a análise de Calorimetria de varrimento diferencial (DSC), com o objetivo de avaliar o perfil dos eventos térmicos. A amostra composta por alginato, quitosana e berberina, absorveu calor em uma faixa praticamente constante de aproximadamente 85 °C (com a volatilização da água principalmente), após este evento a temperatura elevou-se de 99.2 °C até 129 °C no período de tempo de 582 segundos, deste momento em diante a temperatura elevou-se em um evento exotérmico até a temperatura máxima de 476 °C, após houve a degradação da amostra.

Micropartículas compostas por alginato, quitosana e bacitracina, submetidas a análise de DSC, apresentaram o mesmo comportamento da micropartículas vazias com um comprimento de onda endotérmico em 1027 segundos, a partir deste ponto temos três patamares (breves) de eventos exotérmicos o primeiro em 2253 s à temperatura de ~121 °C, o segundo em 2570 s à temperatura de ~339 °C, o terceiro patamar ocorreu em 2774 s à 452 °C, e pôr fim a amostra atingiu o comprimento de onda máximo de 470 °C aos 2845 segundos seguindo-se da degradação da amostra. Este comportamento pode ser explicado pela molécula da bacitracina, pois a mesma é um polipeptídeo (106–108), e estes possuem pontos de fusão e ebulição diferente para cada segmento da molécula.

O perfil de micropartículas com alginato, quitosana e Nitroprussiato de Sódio (utilizado como doador de Óxido Nítrico), a amostra absorveu temperatura até os 2190 s à 77 °C, neste momento ocorreu um patamar de estabilização por 276 s a uma temperatura de aproximadamente de 125 °C, após elevou-se ao máximo de 487 °C aos 2905 s seguido de um período de perda de massa até o ponto de 3120 segundos à 249 °C onde podemos ver uma onda característica de evento exotérmico, após seguiu-se da degradação da amostra.

Por fim podemos considerar após a análise e comparação dos perfis em separado, que a linha que representa os componentes (bacitracina, berberina e Nitroprussiato) agregados a matriz de alginato com quitosana que as micropartículas são termicamente estáveis e apresentam as propriedades dos compostos (analisados de forma em separado) utilizados em sua formação, assim, os resultados nos mostram que as micropartículas possuem as características de estabilidade térmica necessárias para a aplicação em temperatura ambiente.

Os resultados para o perfil de intumescimento realizado em três soluções tampão, sendo: tampão acetato pH 5,0; citrato pH 6,2 e PBS pH 7,4, com os dados obtidos. Sabe-se que o fenômeno de intumescimento é regido por três parâmetros: a) a variação pela relação solvente-polímero; b) a variação conformacional causada pela redução no número de conformações das cadeias, em consequência de seu estiramento e c) a entalpia da mistura do solvente com o polímero (45,85,92).

O intumescimento é dependente do grau de interação entre as moléculas do solvente com as micropartículas, que pode ser relacionado em função da massa da matriz polimérica. Os parâmetros analisados foram de fração de água retida, percentual de hidratação, intumescimento e difusão onde podemos acompanhar os resultados na Tabela 4.

A intumescimento das micropartículas (D_{sw} na Tabela 4) é dependente da quantidade e da composição química da matriz formada, como a quitosana e o alginato apresentam relaxamento de cadeia em meio aquoso, a força mecânica na matriz diminui, permitindo o relaxamento e eventual ruptura causando permeabilidade dos fluidos polares. Dessa forma é possível concluir que ocorreu absorção do soluto, com o aumento médio de volume total intumescida (em relação as micropartículas secas) de até ~240 vezes em pH 6,2, ~197 vezes em pH 7,2 em duas horas imersas nos tampões, já as micropartículas só atingiram o intumescimento de ~196 após 4 horas de imersão.

Essa diferença quanto ao tempo de intumescimento total, pode ser atribuída as ligações do grupo amina da quitosana ($pK_a = 6,3-6,7$), que, em meio aquoso(42,62,64), faz com que a quitosana se solubilize no meio de

dissolução de pH 6,2 (Tabela 3) e 7,4. Já no pH 5,0, os grupos amina são facilmente protonados (62) impedindo a liberação do conteúdo de sua matriz.

Durante a análise de intumescimento pode ser percebido que as micropartículas que possuíam nitroprussiato de sódio em sua formulação, possuíam a característica de serem mais rígidas que as demais, essa característica pode ajudar a explicar o valor de eficiência obtido, além disso, à concentração de quitosana utilizada pode ter influenciado na formação de uma camada mais espessa na superfície das partículas, o que reduziu a possibilidade de lixiviação do medicamento durante a reticulação dos grânulos. Assim, finalmente, causou a retenção de mais partículas de fármaco na matriz de gel de alginato durante a preparação das partículas.

O ensaio do perfil de liberação foi realizado na própria cubeta do UV-VIS, utilizando como solvente as soluções tampão com pH's de 5,0, 6,2 e 7,4 visando simular a variação que ocorre ao longo do trato gastrointestinal. A quantidade de fármaco liberada foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível, no comprimento de onda correspondente ao comprimento de onda máximo absorção para cada fármaco, a coleta dos dados totalizou um período de cinco horas para cada amostra.

A velocidade de liberação dos fármacos, constituídos a base de polímeros hidrofílicos, é condicionada por um ou mais dos seguintes mecanismos cinéticos (111,133): Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica; Intumescimento ("swelling") do polímero com formação de uma camada de gel; Erosão do polímero intumescido.

A etapa de liberação dos fármacos a partir do sistema utilizado envolve a várias fases descritas, no primeiro contato com o meio de dissolução as micropartículas absorvem água, através dos poros do sistema matricial. Após a hidratação do sistema, ocorre a liberação imediata do fármaco existente a superfície da bead.

Com a penetração continua da solução tampão a camada mais interna (gelificada) vai lentamente se formando, e, com isso ocorre mais liberação dos fármacos na matriz, até que seu núcleo fique hidratado e libere o restante dos

fármacos, deste ponto em diante a camada mais externa começa a sofrer erosão e perda de material (100,133,134).

A liberação do fármaco a partir de sistemas poliméricos pode ser atribuída a diferentes mecanismos, tais como explosão inicial, interações polímero-fármaco, relaxamento de polímeros, hidrólise, erosão de polímeros, dissolução de fármacos, formação de fissuras e deformação, transporte através de poros controlados por água e transporte através do polímero (133–137). Existem vários modelos para representar os perfis de dissolução do fármaco em função do tempo (98,138,139).

Os modelos de liberação com as principais características e os fenômenos de liberação de fármacos mais bem descritos são: ordem zero, primeira ordem, segunda ordem, modelos Weibull, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Michaelis-Menten, Hill, Korsmeyer-Peppas e Higuchi, usado para analisar a cinética de liberação de acordo com o valor de r^2 (133–137). Após a aplicação dos modelos citados, identificamos que, em pH 5,0 o modelo cinético mais adequado é Higuchi, em pH 6,2, observa-se um modelo de ordem zero, enquanto em pH 7,4, os modelos Korsmeyer-Peppas e Weibull apresentam um bom ajuste. Com isso concluímos que as micropartículas são dependentes do intumescimento e erosão da matriz para que ocorra a liberação dos fármacos.

Realizados os testes de caracterização e perfil de liberação dos fármacos, realizamos o teste de adesão das micropartículas à mucina, com o objetivo de avaliar a adesão destas a parede celular do intestino delgado e íleo, e, até mesmo em brânquias de peixes. O teste foi realizado utilizando-se o método de Lowry (93), que apresenta limite de detecção de 0,7 mg. L⁻¹ e leituras de absorbância em comprimento de onda 750 nm.

Neste método, ocorre redução dos constituintes ativos do reagente Folin-phenol dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. Após a reação ocorrer, são obtidos os espectros das soluções, por meio do Espectrofotômetro (UV-vis), e estes comparados com a curva padrão da albumina.

Nos trabalhos de Ana Catarina Reis (40,67), foram realizados testes com mucina para verificar a adesão de nanopartículas de quitosana em mucina, a

pesquisadora obteve uma eficiência de 80 ~ 86 % de adesão, no nosso trabalho obtivemos valores de 34 ~ 66 %. Estes valores podem ser atribuídos a interação da quitosana com o alginato, pois segundo os trabalhos consultados (16,66,85,86), a mucina tem uma afinidade pelas ligações dos grupamentos amina da quitosana, carregadas positivamente, mas temos as ligações que ocorrem entre os grupamentos amina da quitosana e os grupos carboxílicos do alginato, assim podemos atribuir a taxa aderência das micropartículas com a mucina aos valores do grau de desaminação sofrido pela quitosana.

O teste de Bioadesão (16,39,41,42,61,64,70) com a mucina serve como indicador que as micropartículas poderão ser retidas no intestino nos testes posteriores *in vivo* com as Tilápias, neste tempo de retenção as micropartículas sofrerão o processo de intumescimento e após a liberação dos fármacos nos espécimes.

Por fim, foi realizado o teste de sensibilidade bacteriana *in vitro* para fins de caracterização de eficiência dos fármacos encapsulados, para este teste foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* estirpe J96 e *Staphylococcus aureus* estirpe ATCC 25923, conforme descrito na sessão 5.1.10 pg. 58.

As micropartículas Vazias foram usadas em meio MHB sem inóculo bacteriano, a fim de verificar a contaminação das micropartículas e também na presença de *E. coli* ou *S. aureus* para verificar qualquer atividade antibacteriana do material das micropartículas.

Os controles negativos *S. aureus* Gram positivo e a *E. coli* Gram-negativa cresceram tanto no meio líquido como no sólido, micropartículas vazias não afetaram o crescimento bacteriano.

O controle positivo Ampicilina e os compostos não encapsulados em estudo inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, exceto a Bacitracina de zinco que inibiu apenas *S. aureus*, como esperado devido a sua ação restrita em bactérias Gram positivas.

A Berberina isolada não teve efeito bactericida em *S. aureus* e *E. coli*, mas mostrou efeito bacteriostático e ação bactericida moderada em *S. aureus* quando encapsulado em micropartículas. As micropartículas com Bacitracina de zinco e Nitroprussiato de sódio tiveram efeito bacteriostático em *S. aureus*,

mas apenas o Nitroprussiato de sódio encapsulado teve algum efeito sobre *E. coli*. As micropartículas com bacitracina mantiveram o efeito bactericida sobre *S. aureus*, que também foi observado em compostos isolados como Nitroprussiato de sódio.

Nos testes com as bactérias isoladas dos peixes em tanque obtivemos resultados promissores nos meios sólidos em placas de testes de inibição (38,62,123,140). Corroborando os testes em meio líquido.

Como observado pelo sistema proposto, os resultados mostraram uma atividade bacteriostática e bactericida sobre a bactéria *S. aureus*. Este resultado pode indicar que o sistema tem um uso futuro promissor como ferramenta para o controle de bacterioses em peixes.

8 CONCLUSÕES

Neste trabalho apresentamos o método de produção de micropartículas de alginato recobertas com quitosana para transporte do sistema contendo o antibiótico bacitracina de zinco, o fitoterápico berberina e o doador de óxido nítrico Nitroprussiato de sódio. O método foi escolhido através de consultas as publicações de referência na área, por apresentar um custo relativamente baixo, não utiliza solventes tóxicos e apresenta um alto rendimento.

A produção das micropartículas ocorreu por geleificação ionotrópica, com eficiência de encapsulação dos fármacos de $99 \pm 0,5$ %. Assim podemos afirmar que a metodologia de produção das micropartículas pode ser considerada eficiente.

A análise de FTIR realizada com as micropartículas encapsuladas comparadas com os espectros dos fármacos, após análise com as referências encontradas na literatura, demonstra que os fármacos foram encapsulados com sucesso e não sofreram alterações em sua forma estrutural, mantendo as características farmacológicas.

Nas medidas de DSC obtidas pode-se observar que o ponto de fusão das micropartículas contendo todos os fármacos apresenta um valor abaixo dos valores obtidos com os fármacos em separado, na análise podemos notar que o gráfico apresenta as características de comprimentos de onda endotérmicos e exotérmicos dos fármacos em separado.

Com base nos cálculos de cinética química realizados com os dados coletados no perfil de liberação, classificamos que o modelo que mais se adapta ao pH 5,0 é Hixson-Crowell onde é indicada uma relação linear, onde apresenta uma liberação dos fármacos.

O teste de adesão com mucina obteve valores entre 34 ~ 66 % de adesão as micropartículas, este teste nos informa que as micropartículas uma vez ingeridas pelos peixes, terão uma trajetória mais lenta pelo trato digestivo, devido a interação de quitosana com a mucosa do intestino, garantindo assim, o tempo necessário para a liberação dos fármacos.

Os testes *in vitro* realizados com as bactérias isoladas de espécimes coletados em tanques de criação demonstraram que os fármacos foram encapsulados e apresentaram tanto efeitos bacteriostáticos como bactericidas.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

O processo de desenvolvimento de um sistema microparticulado para tratamento de bacteriose em peixes, tanto de aquário (ornamentais) e de sistemas de produção em tanques, deu apenas os primeiros passos, com a formulação inicial, caracterização e testes *in vitro*.

Em relação a formulação, é necessário o teste de micropartículas com diferentes formulações para obtermos os parâmetros de doses ideais, pois, os estudos foram realizados *in vitro* e os parâmetros *in vivo* sofrerão alterações, haja vista o organismo ser muito mais complexo.

Ao calcularmos a formulação (dosagem de fármacos nas micropartículas) ideal para o controle das bacterioses, iremos para a fase que compreende e forma de administração nos peixes, é necessário identificarmos (no caso de inserção na ração), o diâmetro da ração (regulagem da extrusora); quantidade de ração ingerida por cada indivíduo (para cálculo da dose ingerida).

Ainda, para melhorarmos este sistema, poderemos inserir um fármaco com atividade em bactérias gram-negativas, haja vista que o sistema desenvolvido tem efeitos em bactérias gram-positivas, neste caso teremos que repetir as análises de caracterização realizadas.

Este novo projeto leva em conta a necessidade do avanço de técnicas de diferentes tratamentos *in vivo* para cura de bacterioses em peixes criados na região norte do Brasil, sendo assim, o local da aplicação das micropartículas preparadas, será o Instituto Federal de Rondônia – IFRO Campus Colorado do Oeste, onde será fornecido: local, caixas d'água e equipamentos para desenvolvimento e fornecimento de ração, sistema de oxigenação e controle dos parâmetros da água, bem como os materiais e laboratórios para isolamento das bactérias das amostras.

Finalmente, com a parceria entre os profissionais da Universidade de Brasília – UNB em especial o *Campus Ceilândia* e o Instituto Federal de Rondônia – IFRO, este sistema poderá se tornar um novo produto de referência

para o controle de bacterioses em peixes, tanto de aquário quanto em tanques de criação.

REFERÊNCIAS

1. Brito TMD, Silva AMC. Taxa de sobrevivência de tilápia *Oreochromis niloticus* em tanque de decantação com águas salobras em sistema intensivo de cultivo. *Acta Fish Aquat Resour* [Internet]. 2014;2:50. Available from: <https://seer.ufs.br/index.php/ActaFish/article/view/3089>
2. Gastalho S, Silva GJ, Ramos F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: Health care impact. *Acta Farm Port*. 2014;3(1):29–45.
3. Boijink CDL, Brandão DA. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Ciência Rural*. 2001;31(3):503–7.
4. Costa BR, Rodrigues MCK, Rocha SF, Pohndorf RS, Larrosa APQ, Pinto LAA. Optimization of *Spirulina* sp. Drying in Heat Pump: Effects on the Physicochemical Properties and Color Parameters. *J Food Process Preserv* [Internet]. 2016 Oct 1;40(5):934–42. Available from: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12672>
5. Boufleuer ÉM dos S. Diversidade e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas em pisciculturas com diferentes densidades de estocagem [Internet]. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo.; 2015. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2006.03138.x>
6. Carraschi SP, Cruz C, Machado Neto JG, Castro MP, Bortoluzzi NL, Gírio ACF. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2011;63(3):579–83.
7. Estevinho BN, Lopes AR, Sousa V, Rocha F, Nunes OC. Microencapsulation of *Gulosibacter molinivorax* ON4T cells by a spray-drying process using different biopolymers. *J Hazard Mater* [Internet]. 2017;338:85–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389417303618>
8. Zago AC. Análise parasitológica e microbiológica de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede no reservatório de Água Vermelha - SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação [Internet]. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”; 2012. Available from: http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_me_2012_aline_zago.pdf
9. Santos DMS. Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão [Internet]. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista; 2010. Available from: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/104634?show=full>
10. Rodrigues E. Pesquisa de *Aeromonas* spp. em Tilápia (*Oreochromis niloticus*), cultivada no estado do Rio de Janeiro - Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana [Internet]. Universidade Federal Fluminense - UFF; 2007. Available from: http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/eliane_rodrigues_doutorado.pdf
11. Silva RML. Bactérias do gênero *Aeromonas* e indicadores de qualidade da água em pisciculturas da região da Baixada Ocidental Maranhense. Universidade Estadual Paulista. 2010.
12. Silva JLS da, Cavalcante DDH, Carvalho FCT de, Vieira RHSD, Sá MV do C e, Sousa

- OV de. Aquatic microbiota diversity in the culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bioflocs or periphyton: virulence factors and biofilm formation. *Acta Sci Anim Sci* [Internet]. 2016;38(3):233. Available from: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/31910>
13. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Oct 15;49(8):1248–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1086/605667>
 14. C. CF. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* [Internet]. 2006 May 24;8(7):1137–44. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
 15. MOREIRA HLMV. L., RIBEIRO, RP, ZIMMERMANN, S. Fundam da Mod aqüicultura-Canoas Ed ULBRA. 2001;199.
 16. BRACCINI GL. Resposta morfofuncional em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso do Núcleo Homeopático Homeopatia 100 ® Resposta morfofuncional em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso do Núcleo Homeopático Homeopatia 100 ®. 2011;103.
 17. Boscolo WR, Hayashi C, Soares CM, Furuya WM, Meurer F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. *Rev Bras Zootec*. 2007;30(5):1391–6.
 18. Queiroz JF De, Meio E, Boeira RC, Ambiente EM. Calagem e Controle da Acidez dos Viveiros de Aqüicultura [Internet]. Jaguariúna - SP; 1998. Available from: <http://www.cnpma.embrapa.br/aquisys/circular14.pdf>
 19. Ferraz De Queiroz J, Nicolella G, Wood CW, Elson Boyd C. Lime and soil acidity in fresh water fish ponds lime application methods, water and bottom soil acidity in fresh water fish ponds métodos de calagem, acidez da água e do sedimento do fundo de viveiros de piscicultura. *Sci Agric (Piracicaba)*. 2004;61(5):469–75.
 20. Rotta M. Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura [Internet]. Embrapa. Corumbá - MS; 2003. Available from: www.mrotta.cjb.net
 21. C. CF, P. GH, Alexandra T, Larisa I, Humberto D, Ana M, et al. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* [Internet]. 2013 Apr 10;15(7):1917–42. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>
 22. Abdel-Fattah M. El-Sayed. Tilapia culture [Internet]. 7th Floor. UK by Biddles Ltd KL, editor. Alexandria University, Alexandria, Egypt: CABI Publishing; 2006. 293 p. Available from: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20063084667>
 23. El-Sayed AFM. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture*. 1999;179(1–4):149–68.
 24. International Commission for the Microbiological Specifications of Foods (ICMSF). *Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management*. 1st ed. Springer Science+Business Media L, editor. Springer US; 2002. XIII, 362.
 25. Diniz RC, Silva* LWS and LCN da. Virtual screening for development of new effective compounds against *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 25, *Current Medicinal Chemistry*. 2018. p. 1. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/160757/article>
 26. Vidar Rúnarsson Ö, Holappa J, Malainer C, Steinsson H, Hjálmarsdóttir M, Nevalainen

- T, et al. Antibacterial activity of N-quaternary chitosan derivatives: Synthesis, characterization and structure activity relationship (SAR) investigations. *Eur Polym J* [Internet]. 2010;46(6):1251–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.03.001>
27. Yadav SK, Khan G, Bonde G V, Bansal M, Mishra B. Design, optimization and characterizations of chitosan fortified calcium alginate microspheres for the controlled delivery of dual drugs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* [Internet]. 2017;1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28830256>
 28. Viana JA, Mendonça FG. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. *Nutr Time* [Internet]. 2017;14(2):15. Available from: http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Artigo_414.pdf
 29. Schleifer KH, Fischer U. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1982;32(2):153–6.
 30. Schleifer K-H, Bell JA. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. *Bergey's Man Syst Bacteriol*. 2009;3:392.
 31. Food and Drug Administration. Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. *Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2012. 292 p.
 32. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J Pathog* [Internet]. 2011;2011:1–13. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/601905/>
 33. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)*. 2010;2(5):1148–65.
 34. Na C, Paulo RDE. Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em Tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso, Bahia. *Rev Bras Eng Pesca* [Internet]. 2006;1(1):75–90. Available from: <file:///C:/Users/obizan/Downloads/19-95-1-PB.pdf>
 35. Tahtat D, Mahlous M, Benamer S, Khodja AN, Oussedik-Oumehdi H, Laraba-Djebari F. Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013;58:160–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567292>
 36. Campos J, Varas-Godoy M, Haidar ZS. Physicochemical characterization of chitosan-hyaluronan-coated solid lipid nanoparticles for the targeted delivery of paclitaxel: a proof-of-concept study in breast cancer cells. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;02/10. 2017;12(5):473–90.
 37. Bravo-Osuna I, Andres-Guerrero V, Arranz-Romera A, Esteban-Perez S, Molina-Martinez IT, Herrero-Vanrell R. Microspheres as intraocular therapeutic tools in chronic diseases of the optic nerve and retina. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018/01/18. 2018;126:127–44.
 38. Chen H, Xing X, Tan H, Jia Y, Zhou T, Chen Y, et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;70:287–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116311018>
 39. Prezotti FG. Microesferas de Goma Gelana e Pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos [Internet]. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”; 2013. Available from: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/96236/000726339_20150816.pdf?se

quence=1

40. Reis ACBP. Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna [Internet]. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2008 [cited 2017 Jan 19]. Available from: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/213>
41. Silva MI do N, Nascimento MI do. Preparo e estudo fisico-químico e morfológico de hidrogel de alginato recoberto com quitosana contendo berberina [Internet]. 2015. Available from: <http://bdm.unb.br/handle/10483/10963>
42. Gai R. Modelagem Matemática e Computacional de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos baseado em Nanoestruturas [Internet]. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT; 2016. Available from: http://cassiopea.ipt.br/teses/2016_PI_Roberto_Gai.pdf
43. Ornellas N, Rodrigues L. Controlada De Fármacos Por Hidrogéis De Pva / Atapulgita. 2012;54.
44. Chourasia MK, Jain SK. Polysaccharides for Colon Targeted Drug Delivery. Drug Deliv J Deliv Target Ther Agents [Internet]. 2004;11(2):129–48. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717540490280778>
45. Aouada FA, Muniz EC, Vaz CMP, Mattoso LHC. Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poli(acrilamida) e metilcelulose. Quim Nova. 2009;32(6):1482–90.
46. Treenate P, Monvisade P. Crosslinker Effects on Properties of Hydroxyethylacryl Chitosan/Sodium Alginate Hydrogel Films. Macromol Symp [Internet]. 2017;372(1):147–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/masy.201600141>
47. Mokhena TC, Luyt AS, MOKHENA, T. C.; LUYT AS, Mokhena TC, Luyt AS. Electrospun alginate nanofibres impregnated with silver nanoparticles: Preparation, morphology and antibacterial properties. Carbohydr Polym [Internet]. 2017/11/11. 2017;165(1):304–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.019>
48. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. J Control Release [Internet]. 2006;114(1):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828914>
49. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Acta Pol Pharm [Internet]. 2010;67(3):217–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524422>
50. Deng F, Zhang Z, Yang C, Guo C, Lu G, Dang Z. Pyrene biodegradation with layer-by-layer assembly bio-microcapsules. Ecotoxicol Environ Saf [Internet]. 2017;138(July 2016):9–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.019>
51. Vittorino E, Giancane G, Manno D, Serra A, Valli L, Sortino S. Photofunctional multilayer films by assembling naked silver nanoparticles and a tailored nitric oxide photodispenser at water/air interface. J Colloid Interface Sci [Internet]. 2012;368(1):191–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.09.084>
52. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. Phyther Res [Internet]. 2016 Nov;30(11):1745–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5693>
53. Rhoads MK, Hauk P, Terrell J, Tsao C, Oh H, Raghavan SR, et al. Incorporating LsrK AI-2 Quorum Quenching Capability in a Functionalized Biopolymer Capsule. Biotechnol Bioeng. 2017;

54. Tsikas D, Pham VV, Suchy MT, Van De Ree MA, Huisman M V., Frölich JC, et al. No effects of atorvastatin (10 mg/d or 80 mg/d) on nitric oxide, prostacyclin, thromboxane and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients of the DALI study. *Pharmacol Res.* 2015;94:1–8.
55. Schäffer J, Kondratenko VA, Steinfeldt N, Sebek M, Kondratenko E V. Highly selective ammonia oxidation to nitric oxide over supported Pt nanoparticles. *J Catal.* 2013;301:210–6.
56. Leonhardt SESS, Stolle A, Ondruschka B, Cravotto G, Leo C De, Jandt KD, et al. Chitosan as a support for heterogeneous Pd catalysts in liquid phase catalysis. *Appl Catal A Gen [Internet].* 2010 [cited 2017 May 10];379(1–2):30–7. Available from: [http://www.sciencedirect-com.ez134.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926860X10001432](http://www.sciencedirect.com.ez134.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0926860X10001432)
57. Mendes PM de F. Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em magnetite para aplicações na entrega de fármacos antitumorais. 2013 Jun 20 [cited 2017 Sep 18];100. Available from: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/25516>
58. Nan F, Wu J, Qi F, Liu Y, Ngai T, Ma G. Uniform chitosan-coated alginate particles as emulsifiers for preparation of stable Pickering emulsions with stimulus dependence. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet].* 2014;456(1):246–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.017>
59. Jia R, Duan Y, Fang Q, Wang X, Huang J. Pyridine-grafted chitosan derivative as an antifungal agent. *Food Chem [Internet].* 2016;196:381–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.053>
60. Gomes CP, Ferreira Lopes CD, Duarte Moreno PM, Varela-Moreira A, Alonso MJ, Pêgo AP. Translating chitosan to clinical delivery of nucleic acid-based drugs. *MRS Bull [Internet].* 2014 Jan;39(01):60–70. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S088376941300314X
61. Lima CRM de. Estudos de adsorção de tetraciclina e cromoglicato em partículas de quitosana [Internet]. Universidade Federal Rio Grande do Norte - UFRN; 2013 [cited 2017 Sep 19]. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S088376941300314X
62. Rodrigues AP. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões [Internet]. Biblioteca Digital da Unicamp; 2008 [cited 2017 May 24]. Available from: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000443384&fd=y>
63. Ji J, Torrealba D, Ruyra À, Roher N. Nanodelivery Systems as New Tools for Immunostimulant or Vaccine Administration: Targeting the Fish Immune System. *Biology (Basel) [Internet].* 2015 Oct 19 [cited 2017 Oct 9];4(4):664–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492276>
64. Santos JC da C. “ Acilação da Quitosana e da N , N , N -Trimetilquitosana para Aplicação Potencial em Diagnóstico e Terapia Gênica .” UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG; 2015.
65. Köping-Höggård M, Vårum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stokke BT, et al. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Ther [Internet].* 2004 Oct 22 [cited 2017 May 11];11(19):1441–52. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.gt.3302312>
66. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release [Internet].* 2006;114(1):1–14.

Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33746474818&doi=10.1016%2Fj.jconrel.2006.04.017&partnerID=40&md5=5ce20ec2495492d3956297ccac4f124f>

67. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2006;2(1):8–21.
68. Bousalem N, Benmansour K, Ziani Cherif H. Synthesis and characterization of antibacterial silver-alginate - chitosan bionanocomposite films using UV irradiation method. *Mater Technol* [Internet]. 2017;32(6):367–77. Available from: <https://doi.org/10.1080/10667857.2016.1241856>
69. Prezotti FG, Cury BSF, Evangelista RC. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;113:286–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.021>
70. A.J. Friedman JMFPCGHCRPN. Sequential injection analysis system for the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Fenxi Huaxue.* 2004;32(10):1365–7.
71. Ming L, Epperson JD. Metal binding and structure – activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem.* 2002;91:46–58.
72. Economou NJ, Cocklin S, Loll PJ. High-resolution crystal structure reveals molecular details of target recognition by bacitracin. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013;110(35):14207–12. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1308268110>
73. Storms R, Strominger JL. Complex isoprenyl formation between pyrophosphates bacitracin peptides. *J Biol Chem.* 1973;248(11):3940–5.
74. Ming LJ, Epperson JD. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem.* 2002;91(1):46–58.
75. BRASIL. RELATÓRIO TÉCNICO da BACITRACINA. Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no 808, de 06 de novembro de 2003. 2004.
76. Cruz-Vega D, Verde-Star MJ, Salinas-Gonzalez NR, Rosales-Hernandez B, Estrada-Garcia I, Mendez-Aragon P, et al. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009;22(April 2008):557–9.
77. Paul MD. A Biosynthetic Approach [Internet]. Vol. 0471496405, Pharmaceutical Sciences. 2002. 486 p. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=iyzIMSPp-EMC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Medicinal+natural+products+A+Biosynthetic+Approach&ots=uOalm1smtN&sig=jBD3fswtkfqqpStuGo0U60wcc7A>
78. Bahar M, Deng Y, Zhu X, He S, Pandharkar T, Drew ME, et al. Potent antiprotozoal activity of a novel semi-synthetic berberine derivative. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2011;21(9):2606–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.01.101>
79. Schinella, Guillermo; Tournier, Horácio; Zaidenberg A. In vitro and in vivo activity of berberine on the blood trypomastigote from *Trypanosoma cruzi*. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromat* [Internet]. 2007;3(May):6. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/26604351%0AIn>
80. Mutoloki S, Munang'andu HM, Evensen Ø. Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction. *Front Immunol.* 2015;6(OCT):1–10.

81. Quinn JF, Whittaker MR, Davis TP. Delivering nitric oxide with nanoparticles. *J Control Release* [Internet]. 2015 May 10 [cited 2015 May 7];205:190–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.007>
82. Evig CB, Kelley EE, Weydert CJ, Chu Y, Buettner GR, Burns CP. Endogenous production and exogenous exposure to nitric oxide augment doxorubicin cytotoxicity for breast cancer cells but not cardiac myoblasts. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2004 May [cited 2017 Sep 11];10(3):119–29. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860304000576>
83. Tfouni E, Truzzi DR, Tavares A, Gomes AJ, Figueiredo LE, Franco DW. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2012;26(1):38–53.
84. Gomes AJ, Espreafico EM, Tfouni E. Trans-[Ru(NO)Cl(cyclam)](PF₆)₂ and [Ru(NO)(Hedta)] incorporated in PLGA nanoparticles for the delivery of nitric oxide to B16-F10 Cells: Cytotoxicity and phototoxicity. *Mol Pharm*. 2013;10(10):3544–54.
85. Boni FI. Microesferas de goma gelana reticulada para liberação controlada de fármacos. [Internet]. Repositório Institucional UNESP. 2014. p. 63. Available from: <http://hdl.handle.net/11449/124293>
86. Snyder JD, Allan Walker W. Structure and function of intestinal mucin: Developmental aspects. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1987 [cited 2017 Sep 25];82(3–4):351–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553025>
87. Kaygusuz H, Torlak E, Akın-Evingür G, Özen İ, von Klitzing R, Erim FB. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;105(Pt 1):1161–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28751050>
88. Sun Y, Liu Y, Liu W, Lu C, Wang L. Chitosan microparticles ionically cross-linked with poly(γ-glutamic acid) as antimicrobial peptides and nitric oxide delivery systems. *Biochem Eng J* [Internet]. 2015;95:78–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.022>
89. Ma N, Xu L, Wang Q, Zhang X, Zhang W, Li Y, et al. Development and evaluation of new sustained-release floating microspheres. *Int J Pharm*. 2008;
90. Nayak AK, Pal D. *Trigonella foenum-graecum* L. seed mucilage-gellan mucoadhesive beads for controlled release of metformin HCl. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;107(1):31–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.031>
91. Carbinatto FM. Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.
92. PINHEIRO WM. Elaboração de sistema sinérgico visando aplicações em nanobiotecnologia, baseado em microesferas de polímeros naturais contendo berberina e nanopartículas de ouro associada a doxorubicina. Vol. 1, Programa De Pós-Graduação Em Nanociência E Nanobiotecnologia. Universidade de Brasília - UNB; 2015.
93. SANTOS FR DOS. Método De Lowry: Validação E Estimativa Do Cálculo Da Incerteza. UNESP - Campus Araraquara; 2012.
94. Anvisa - Subcomitê de Comunicação com a Sociedade, Sistema Nacional de Controle de Medicamentos. Informe técnico sobre o Sistema Nacional de Controle de Medicamentos - Sincofarma Minas [Internet]. [cited 2017 Sep 29]. Available from: <http://www.sincofarmamg.org.br/noticias/anvisa-divulga-informe-tecnico-sobre-o-sistema-nacional-de-controle-de-medicamentos>

95. Chavda H, Modhia I, Mehta A, Patel R, Patel C. Development of bioadhesive chitosan superporous hydrogel composite particles based intestinal drug delivery system. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013;2013:11. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/563651/>
96. Nagarwal RC, Ridhurkar DN, Pandit JK. In Vitro Release Kinetics and Bioavailability of Gastroretentive Cinnarizine Hydrochloride Tablet. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2010;11(1):294–303. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1208/s12249-010-9380-5>
97. Sun X, Shi J, Xu X, Cao S. Chitosan coated alginate/poly(N-isopropylacrylamide) beads for dual responsive drug delivery. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jan 20];59:273–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.066>
98. R KA. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Sch Acad J PharmacyOnline) Sch Acad J Pharm* [Internet]. 2014 Aug 30 [cited 2018 Jun 28];3(5):388–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517313003451>
99. Medina JR, Salazar DK, Hurtado M, Cortés AR, Domínguez-Ramírez AM. Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system. *Saudi Pharm J*. 2014;22(2):141–7.
100. Cavalcanti IMF. Preparação , Caracterização E Cinética De Liberação in Vitro De Lipossomas Contendo B- Lapachona E Complexos De Inclusão B-Lapachona:2-Hidroxipropil-B-Ciclodextrina. 2010;104.
101. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2001;13(2):123–33. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098701000951>
102. Douglas A. Skoog, Donald M. West FJH. *FUNDAMENTOS DE QUIMICA ANALITICA*. 1997.
103. Hickok JR, Vasudevan D, Jablonski K, Thomasn DD. Oxygen dependence of nitric oxide-mediated signaling. *Redox Biol* [Internet]. 2013;1(1):203–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.11.002>
104. Godin B, Touitou E. Mechanism of bacitracin permeation enhancement through the skin and cellular membranes from an ethosomal carrier. *J Control Release* [Internet]. 2004 [cited 2017 Apr 18];94(2):365–79. Available from: [http://www.sciencedirect-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S016836590300484X](http://www.sciencedirect.com.ez54.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S016836590300484X)
105. Ding P, Huang K-L, Li G-Y, Liu Y-F. Preparation and properties of modified chitosan as potential matrix materials for drug sustained-release beads. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 11];41(2):125–31. Available from: <http://www.sciencedirect-com.ez134.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0141813007000050>
106. Potts AR, Psurek T, Jones C, Parris L, Wise A. Validation of a quantitative HPLC method for bacitracin and bacitracin zinc using EDTA as a mobile-phase modifier. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2012;70:619–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.06.016>
107. Haddar HO, Aziz GM, Al-Gelawi MH. Optimization of bacitracin production by *Bacillus licheniformis* B5. *Pakistan J Biol Sci*. 2007;10(6):972–6.
108. Sales AE, Takaki GM de C, Silva CAA da. Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite. *Exacta* [Internet]. 2011;9(2):231–40. Available from:

<http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=81021138008>

109. Selleckchem. Bacitracin Zinc Catalog No.S1791 [Internet]. Web. 2018 [cited 2018 Nov 26]. p. 1. Available from: <https://www.selleckchem.com/products/bacitracin-zinc.html>
110. Banerjee S, Siddiqui L, Bhattacharya SS, Kaity S, Ghosh A, Chattopadhyay P, et al. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jan 25];50(1):198–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.020>
111. Bera S, Dutta D. Encapsulation and release of a bacterial carotenoid from hydrogel matrix: Characterization, kinetics and antioxidant study. *Eng Life Sci*. 2017;17(7):739–48.
112. Souza Oliveira, H. , Pinheiro, W. , Biswaro, L. , Azevedo, R. , Gomes, A. and Lunardi, C. Gold Nanoparticle and Berberine Entrapped into Hydrogel Matrix as Drug Delivery System. *J Biomater Nanobiotechnol*. 2015;6(1):53–63.
113. Lopes WA, Fascio M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quim Nova* [Internet]. 2004 Aug [cited 2017 Oct 18];27(4):670–3. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400025&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
114. Gaspari APS. Considerações sobre a liberação fotoquímica de óxido nítrico , sensibilizada por corantes , a partir de um nitrosilo de rutênio [Internet]. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP; 2013. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-20122013-101907/pt-br.php>
115. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement [Internet]. 15^o. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), editor. Vol. 25. Wayne U.S.A.: The permission granted by NCCLS/CLSI is limited to distribution of M100-S15 by ANVISA; 2005. 177 p. Available from: www.clsi.org
116. Valeska T, Dantas M, Amaury S, De Oliveira A, Moura K, Arnaldo T, et al. Identificação Laboratorial de *Staphylococcus aureus* em Leite Bovino. 2013;
117. Elsner JJ, Berdicevsky I, Zilberman M. In vitro microbial inhibition and cellular response to novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics. *Acta Biomater* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2018 Jun 28];7(1):325–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706110003326?via%3Dihub>
118. Chapaval L, Aguiar VMP, Sousa APB De, Miranda KP De, Mororó AM, Magalhães DCT. Cultura, Crescimento e Identificação de Bactérias do Gênero *Staphylococcus aureus* em Leite de Cabra. 2009;5.
119. ANVISA. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. Vol. 23, Anvisa. 2003. 54 p.
120. Susceptibilidade TDE, Antimicrobianos AOS. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) Identificação bacteriana. 2018;54–63.
121. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição [Internet]. Vol. 23, Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. 2003. 1–58 p. Available from: http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf
122. Sperotto RA. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia

agroalimentar e de saúde humana. Editora Univates. 2014. 328 p.

123. Jatobá A, Vieira FDN, Neto CB, Silva BC, Maurício JLP, Jerônimo GT, et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. *Pesqui Agropecu Bras.* 2008;43(9):1201–7.
124. Kumar A, Castellano I, Patti FP, Palumbo A, Buia MC. Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric Oxide [Internet]*. 2015 Mar 17 [cited 2015 Apr 2];47:34–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2015.03.001>
125. Bujdák J, Ratulovská J, Donauerová A, Bujdáková H. Hybrid Materials Based on Luminescent Alkaloid Berberine and Saponite [Internet]. Vol. 16, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers; 2016. p. 7801–4. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/asp/jnn/2016/00000016/00000008/art00006>
126. Cui H-X, Hu Y-N, Li J-W, Yuan K, Guo Y. Preparation and Evaluation of Antidiabetic Agents of Berberine Organic Acid Salts for Enhancing the Bioavailability. *Molecules [Internet]*. 2018;24(1):103. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/1/103>
127. Maciag AE, Holland RJ, Cheng YSR, Rodriguez LG, Saavedra JE, Anderson LM, et al. Nitric oxide-releasing prodrug triggers cancer cell death through deregulation of cellular redox balance. *Redox Biol [Internet]*. 2013;1(1):115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.002>
128. Ciofani G, Genchi GG, Mazzolai B, Mattoli V. Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles. *Biochim Biophys Acta [Internet]*. 2014;1840(1):495–506. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135455>
129. Schoubben A, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C, Ricci M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chem Eng J.* 2010;160(1):363–9.
130. Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Permeability of alginate / sol – gel synthesized aminopropyl-silicate / alginate membrane templated by calcium-alginate gel. *J Memb Sci.* 2002;205:183–9.
131. He X, Sun Z, He K, Guo S. Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress. *Appl Microbiol Biotechnol [Internet]*. 2017;101(7):2779–89. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8070-y>
132. Thaya R, Vaseeharan B, Sivakamavalli J, Iswarya A, Govindarajan M, Alharbi NS, et al. Synthesis of chitosan-alginate microspheres with high antimicrobial and antibiofilm activity against multi-drug resistant microbial pathogens. *Microb Pathog [Internet]*. 2017/11/11. 2017;114(Supplement C):17–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017313591>
133. Lopes CM, Manuel J, Lobo S, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada□: polímeros hidrofílicos. *Rev Bras Ciências Farm [Internet]*. 2005;41(2):12. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n2/28035.pdf>
134. Mekkawy AI, El-Mokhtar MA, Nafady NA, Yousef N, Hamad MA, El-Shanawany SM, et al. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:759.
135. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release.* 1987;5(1):37–42.

136. Siepman J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64:163–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.028>
137. Viviane A, Brey S. Sistema de Liberação Controlada Baseado em Vesículas de poli (estireno- b -óxido de etileno) Carregadas com Adapaleno Inseridas em Filmes Poliméricos [Internet]. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFG; 2017. Available from: <https://ppgem.eng.ufmg.br/defesas/2531M.PDF>
138. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* [Internet]. 1983;15(1):25–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517383900649>
139. Agata Y, Iwao Y, Miyagishima A, Itai S. Novel mathematical model for predicting the dissolution profile of spherical particles under non-sink conditions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* [Internet]. 2010;58(4):511–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410634>
140. Amin, A. Ahmad, T. Khan MA, Amin A, Khan MA, Ahmad T. Optimized antimicrobial peptide (Bacitracin) production by immobilized and free cells and of *Bacillus Spp* GU215 using Wood chips and silicon polymer beads. *Pak J Pharm Sci* [Internet]. 2013;26(6):1077–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24191309>

ANEXOS

9.1 Autorização para coleta de peixes pelo Comitê de Ética da uso de Animais (CEUA)

9.2 Artigo publicado em revista de circulação internacional

PARECER CONSUBSTANCIADO
REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO Nº. 013/2019

I – Identificação do projeto: Produção e avaliação de sistemas de liberação de fármacos funcionalizados, para controle de bacterioses

1. **Pesquisador Responsável:** Odair Antônio Barbizan
2. **Unidade/Órgão do Pesquisador:** Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia, IFRO – *Campus* Colorado do Oeste
3. **Pesquisadores Participantes:** Anderson de Jesus Gomes (Universidade de Brasília – UNB)
4. **Unidade onde será realizado:** “Pesqueiro do Roque” e “Pesqueiro do Lupatin”, Vilhena-RO.

II – Parecer da CEUA: Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (CEUA-IFRO), após análise da proposta de experimento intitulada “**Produção e avaliação de sistemas de liberação de fármacos funcionalizados, para controle de bacterioses**”, bem como do atendimento das considerações sugeridas por esta Comissão, considerou a mesma “**APROVADA**”. Além das adequações sugeridas a seguir, recomenda-se observar e adotar as normas de bem-estar animal, e de acordo com o disposto na Lei nº.11.794 de 08/10/2008 e Resolução Normativa nº01 de 09/07/2010/CONCEA, aguardamos o relatório final.

III – Pendências: -----

IV- Data da Reunião: 17/04/2019.

V- Vigência deste parecer: 03/05/2019 até 31/12/2019

Colorado do Oeste, 03 de Maio de 2019.



Túlio Otávio Jardim D'Almeida Lins

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/IFRO)
PORTARIA Nº1939/REIT- CGAB/IFRO, DE 28 DE AGOSTO DE 2018

Multidrug Core–Shell Bead: A System for Bacterial Infection Treatment in Fish

Journal of Polymers and the Environment

November 2019, Volume 27, Issue 11, pp 2395–2407 | Cite as

- Anderson J. Gomes (1) Email author (ajgomes@unb.br) View author's OrcID profile (View OrcID profile)
- Odair A. Barbizan (1) (2)
- Caroline C. Lessa (1)
- Tatiana A. Campos (3)
- Herick S. Muller (3)
- Vicente P. Martins (3)
- Claire N. Lunardi (1)

1. Laboratory of Photochemistry and Nanobiotechnology, Centro Metropolitano, University of Brasilia, , Brasilia, Brazil

2. Federal Institute of Rondonia, , Colorado do Oeste, Brazil

3. Instituto de Instituto Ciências Biológica, Universidade de Brasilia, , Brasilia, Brazil

Original paper

First Online: 23 July 2019

- 44 Downloads

Abstract

This study was developed to improve the durability and bioavailability of polymer matrix containing the antibacterial agent's bacitracin (BAC), berberine (BER) and sodium nitroprusside (SNP), an ionotropic gelation method was successfully applied to prepare alginate/chitosan core–shell beads. The structure and properties of different core–shell beads were characterized by scanning electron microscopy (SEM), zeta potential, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermal analysis (DSC), swelling tests, bioadhesive assay, release kinetic profile and antibacterial/antibacteriostatic activity in bacterial model. The morphology of beads was investigated by SEM, display relatively spherical shape and revealed rough surface was also observed the appearance of cracks probably caused by partial collapsing of the polymer network during drying. The diameter means particle size observed was around 1.04 ± 0.13 μ m, the particles showed a neutral value, around $+ 0.305$ mV. Using UV–Vis technique was observed a high entrapment efficiency of compounds BAC, BER and SNP ($> 95\%$) in the alginate/chitosan core–shell beads. As demonstrated, there is increase in the swelling degree in pH 6.2. The drug release profile showed a pH-dependent release kinetics. At pH 5.0 the most suitable kinetic model is Higuchi, at pH 6.2 a zero-order model is observed, while at pH 7.4 the Korsmeyer–Peppas model present a good fit. The presence of compounds on beads was confirmed using FTIR analyses, and the results indicated that there is no interaction between drugs and vehicle used in the formulation. We can consider after DSC analysis that beads containing BAC, BER and SNP are thermally more stable than separate formulations having the characteristics required for application at room temperature. The release system produced has physical characteristics that allow the storage of the drugs for long periods of time maintaining their chemical and pharmacological properties unchanged. The percentage of adhesion displayed value of 66%, that indicates the improvement in adherence time on the absorbing surfaces to improves drug bioavailability and effectiveness of compounds. In this study is displayed the additive effect between BAC, BER and SNP shown the potential application of compound combinations as an efficient, novel therapeutic tool for antibiotic-resistant bacterial infections. These results indicate that the proposed strategy improves drug bioavailability and effectiveness of compounds in the treatment of fish.

Keywords

Bacitracin Berberine Sodium nitroprusside Alginate/chitosan core–shell bead
This is a preview of subscription content, [log in](#) to check access.

Notes

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from the University of Brasilia, the Coordination for the Improvement of Higher Educational Personnel (CAPES code 001), the Federal District Research Foundation (FAPDF), the Scientific and Technological Development Foundation (FINATEC), program PIQ and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). A.J.G. and C.N.L. conceived and designed the research. O.A.B (PhD student) and C.C.L (undergraduate student) carried out the experiments, worked on the characterization analyses and helped to write the article. A.J.G was responsible for helping in the characterization tests and for guiding the analyses of physico-chemical data. C.N.L. performed SEM assays. A.J.G. interpreted the results, T.A.C. and H.S.M. helped to perform the biological tests. V.P.M was responsible for support in the antimicrobial assays. O.A.B performed fish antimicrobial assays. A.J.G. and C.N.L wrote the manuscript. The authors declare no competing financial interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Kotob MH, Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Abdelzaher M, El-Matbouli M (2016) Vet Res 47(1):98