



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

DAVI DE LACERDA CORIOLANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DA ASSOCIAÇÃO DA POLIMIXINA B LIVRE
COM O ÁCIDO ÚSNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA
REVESTIDO COM QUITOSANA FRENTE A BACTÉRIAS
GRAM NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES**

Recife
2023

DAVI DE LACERDA CORIOLANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E
ANTIBIOFILME DA ASSOCIAÇÃO DA POLIMIXINA B LIVRE
COM O ÁCIDO ÚSNICO ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA
REVESTIDO COM QUITOSANA FRENTE A BACTÉRIAS
GRAM NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador (a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador (a): Jaqueline Barbosa de Souza

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Coriolano, Davi de Lacerda.

Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme da associação da polimixina B livre com ácido úsnico encapsulado em lipossoma revestido com quitosana frente a bactérias Gram-negativas multirresistentes / Davi de Lacerda Coriolano. - Recife, 2023.

41 p. : il., tab.

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Coorientador(a): Jaqueline Barbosa de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Infecções bacterianas. 2. Nanotecnologia. 3. Nanocarreadores. 4. Resistência à antimicrobianos. I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro. (Orientação). II. Souza, Jaqueline Barbosa de. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

DAVI DE LACERDA CORIOLANO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DA
ASSOCIAÇÃO DA POLIMIXINA B LIVRE COM O ÁCIDO ÚSNICO
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMA REVESTIDO COM QUITOSANA
FRENTE A BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS MULTIRRESISTENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 24/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Dedico este trabalho a mim, por não ter desistido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, a professora Isabella, por ter me dado a oportunidade de fazer ciência, por todo apoio e ensinamentos. A minha coorientadora, Jaqueline, por ter me auxiliado em minha jornada na nanotecnologia e pela troca de conhecimentos, que só agregaram. Aos colegas de laboratório que auxiliaram durante os experimentos. A meus amigos que sempre me apoiaram durante toda a graduação e a minha mãe e meu pai, por terem me fornecido todo suporte necessário e nunca terem desistido de mim.

Também gostaria de agradecer ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI/UFPE/CNPq) e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação (Propesqi).

CORIOLOANO, D. L. **Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme da associação da polimixina B livre com ácido úsnico encapsulado em lipossoma revestido com quitosana frente a bactérias Gram-negativas multirresistentes.** 2023. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

Infecções bacterianas representam um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Foi estimado, que 7,7 milhões de mortes no ano de 2019 foram associadas a infecções bacterianas, em sua maioria causadas por Gram-negativos resistentes. A resistência aos antimicrobianos é estimulada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e é exacerbada por fatores de virulência como o biofilme. Nesse sentido, uma abordagem terapêutica inovadora é necessária e a terapia combinada mostra-se como uma alternativa para o tratamento. A associação da polimixina B (PMB) e do ácido úsnico (AU) é uma alternativa, entretanto o AU possui limitações. Essas limitações podem ser sanadas com sua encapsulação em lipossomas revestidos com quitosana (QUI). Assim, nosso objetivo foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da associação da polimixina B com o ácido úsnico encapsulado em lipossomas revestidos com quitosana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a PMB. A preparação do lipossoma foi realizada pela hidratação do filme lipídico e a caracterização físico-química através da análise do tamanho de partícula (TP), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e pH. Para determinar o teor de AU e a eficiência de encapsulação (EE%) nas formulações foi usada a espectrofotometria. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada utilizando os métodos de microdiluição em caldo e checkerboard e a atividade antibiofilme através do método cristal violeta. O Lipo-AU-Qui teve TP de $136,6 \pm 5,1$, PDI de 0,465, PZ de +28, pH de 5, teor de $98,9 \pm 0,3\%$ e eficiência de encapsulação (%EE) de $99,94 \pm 0,1\%$. A associação Lipo-AU-Qui + PMB apresentou interações positivas, diminuindo as CIMs de PMB em 16-128 vezes, e as do Lipo-AU-Qui em 2-4 vezes. Das 10 cepas testadas, 9 produziram biofilme. Dessas, 6 cepas foram escolhidas para avaliar a atividade antibiofilme. A combinação Lipo-AU-Qui + PMB foi capaz de inibir entre 76,25-100% da formação de biofilme, assim mostrando que a

combinação é eficiente, potencializa a atividade antibacteriana e antibiofilme, além de reverter resistência.

Palavras-chave: Infecções bacterianas. Nanotecnologia. Nanocarreadores. Resistência à antimicrobianos.

CORIOLOANO, D. L. **Evaluation of the antibacterial and antibiofilm activities of the association of free polymyxin B with usnic acid encapsulated in a chitosan-coated liposome against multiresistant Gram-negative bacteria.** 2023. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Bacterial infections represent one of the biggest public health problems worldwide. It was estimated that 7.7 million deaths in 2019 were associated with bacterial infections, mostly caused by resistant Gram-negative bacteria. Antimicrobial resistance is mainly due to the indiscriminate use of antimicrobials and is exacerbated by virulence factors such as biofilm. In this sense, an innovative therapeutic approach is needed and combined therapy is shown to be an alternative treatment. The association of polymyxin B (PMB) and usnic acid (UA) is an alternative, however, UA has limitations. These limitations can be overcome with its encapsulation in liposomes coated with chitosan (CHI). Thus, our objective was to develop, characterize and evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of the association of PMB with UA encapsulated in CHI-coated liposomes against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* resistant strains. Liposome preparation was performed by resuspension of the lipid film, physicochemical characterization through analysis of particle size (PS), polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP), and pH. To determine the UA content and the encapsulation efficiency (EE%) in the formulations, spectrophotometry was used. The evaluation of the antibacterial activity was carried out using the methods of microdilution in broth and checkerboard, and the antibiofilm activity through the crystal violet method. Lipo-AU-Qui had PS of 136.6 ± 5.1 , PDI was 0.465, ZP was +28, pH was 5, the content was $98.9 \pm 0.3\%$, and encapsulation efficiency (%EE) of $99.94 \pm 0.1\%$. The association Lipo-AU-Qui + PMB showed positive interactions, decreasing the MICs of PMB by 16-128, and those of Lipo-AU-Qui by 2-4 times. Out of the 10 strains tested, 9 produced biofilm. Out of these strains, six were chosen to evaluate the antibiofilm activity. The Lipo-AU-Qui + PMB combination was able to inhibit between 76.25-100% of biofilm formation, thus showing that the combination is efficient, exacerbates antibacterial and antibiofilm activity, and reverses resistance.

Key words: Bacterial infections. Nanotechnology. Nanocarriers. Antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – LIPO-AU-QUI. 24
- Figura 2** – Atividade antibiofilme do AU, PMB, LIPO-AU-QUI, AU + PMB e LIPO-AU-QUI + PMB. 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação de Lipo-AU-Qui.	26
Tabela 2 – Atividade antibacteriana da PMB, AU, Lipo-AU-Qui, AU + PMB e Lipo-AU-Qui + PMB.	27
Tabela 3 – Avaliação da interação entre AU + PMB e Lipo-AU-Qui + PMB.	28
Tabela 4 – Avaliação da produção de biofilme	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	INFECÇÕES BACTERIANAS	13
2.2	BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	14
2.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA	15
2.4	BIOFILME	16
2.5	PMB	17
2.6	AU	18
2.7	LIPOSSOMAS	19
2.8	QUI	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4	METODOLOGIA	20
4.1	PREPARAÇÃO DO LIPO-AU-QUI	20
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO LIPO-AU-QUI	21
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO LIPO-AU-QUI	21
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO LIPO-AU-QUI ASSOCIADO A PMB	22
4.5	MÉTODO CHECKERBOARD	22
4.6	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS BACTERIANOS	23
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	23
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO LIPO-AU-QUI	24
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	26
5.3	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	29
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME	30

6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas representam um dos maiores problemas de saúde pública mundial que continua a crescer todos os anos (MURRAY *et al.*, 2022). Pois, estas infecções têm se mostrado cada vez mais persistentes ao longo do tempo, desencadeando obstáculos como o prolongamento de internações, falha no tratamento, altos índices de morbimortalidade e aumento nas despesas dos sistemas de saúde e hospitais (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017).

Foi estimado, que 7,7 milhões de mortes no ano de 2019 foram associadas a infecções bacterianas ocasionadas por um grupo de 33 patógenos suscetíveis e resistentes a antimicrobianos, que em sua maioria se apresentavam como Gram-negativos (IKUTA *et al.*, 2022). No cenário atual, as infecções por bactérias gram-negativas, principalmente por cepas resistentes, são cada vez mais prevalentes, sendo facilmente isoladas em infecções do trato urinário, infecções intra-abdominais, pneumonia e septicemia (HO; TAMBYAH; PATERSON, 2010; MORRIS; CERCEO, 2020). Desse modo, insere-se o problema da resistência bacteriana, que se caracteriza como a principal causa dessa emergência em saúde pública.

O aumento da resistência bacteriana se dá principalmente pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, que abrange seu uso excessivo, terapia empírica inadequada, atrasos no diagnóstico, bem como o abandono do tratamento. Surtindo efeito direto no surgimento de bactérias multidrogas resistentes (MDR), que se espalham majoritariamente em unidades de terapia intensiva, causando falha nos tratamentos e desencadeando esse problema emergente (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; MORRIS; CERCEO, 2020).

Além da contribuição do uso inadequado de antibióticos para a resistência bacteriana, fatores de virulência como a capacidade de produção de biofilme, que muitos bacilos Gram-negativos apresentam, também é um importante agente para o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos (ARCIOLA *et al.*, 2018). Nesse sentido, torna-se necessário uma abordagem terapêutica inovadora como a terapia combinada antimicrobiana que associa agentes antibacterianos convencionais e produtos naturais. A terapia combinada representa uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas, sendo empregadas com o objetivo de melhorar o sucesso

terapêutico (VASCONCELOS et al., 2020).

Nesse contexto, destaca-se a PMB, um polipeptídeo catiônico cíclico produzido pelas cepas de *Bacillus polymyxa* com ação através da alteração da membrana plasmáticas em bactérias Gram-negativas (YU et al., 2015; VARDAKAS; FALAGAS, 2016). Além da PMB, destaca-se o AU, um produto natural oriundo do metabolismo secundário de líquens, que apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade antibacteriana, antibiofilme e potencial sinérgico com antimicrobianos do mercado (COSTA et al., 2020). Todavia, apesar da combinação apresentar caráter promissor, o AU apresenta limitações como a baixa solubilidade aquosa, alta toxicidade e dificuldade de alcançar o alvo desejado (FRANCOLINI et al., 2019).

Para sobrepor essas limitações, torna-se uma alternativa viável a utilização de sistemas de liberação controlada, uma vez que esses sistemas possibilitam uma terapêutica eficiente e segura para a administração de fármacos, redução dos efeitos colaterais e entrega no alvo desejado (AGHDAM et al., 2019).

Dentre os nanocarreadores utilizados como sistemas de liberação controlada, os lipossomas se destacam pela sua natureza anfifílica, pois têm capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos no seu compartimento aquoso e fármacos hidrofóbicos na bicamada lipídica (BOZZUTO, MOLINARI, 2015; STHERBERG et al., 2017).

Além disso, os lipossomas possibilitam a funcionalização de sua superfície, podendo ser revestidos com carboidratos, como a QUI, que também apresenta atividade antibacteriana (DUAN et al., 2019). Dessa forma, encapsular o AU em lipossomas revestidos com quitosana e associá-lo a PMB pode ser uma nova abordagem terapêutica promissora frente a infecções bacterianas causadas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a PMB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS

Infecções bacterianas são condições localizadas ou sistêmicas que resultam de uma exposição a bactérias ou a suas toxinas de forma sintomática ou

assintomática. Na atualidade, essas infecções são um grande fardo para saúde pública por afetarem cada vez mais pessoas, principalmente pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva e profissionais de saúde, acometendo sítios com a pele, o trato gastrointestinal, trato respiratório e o trato urinário (VELÔSO; CAMPELO; DE SÁ 2017; BRAGA *et al.*, 2018). As infecções por Gram-negativos estão entre os mais significativos problemas de saúde pública atual.

2.2 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Em 1884, Hans Christian Gram desenvolveu um método de diferenciação de bactérias, utilizando um complexo cristal violeta-iodo e uma contra coloração de safranina, onde as bactérias Gram-positivas são coradas de violeta ou roxo e as bactérias Gram-negativas não são capazes de reter o complexo cristal violeta-iodo e contrastam a coloração com safranina para dar uma cor rosa (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020; THAIRU; NASIR; USMAN, 2014).

Esse método dividiu as bactérias em 2 grupos, as Gram-negativas e Gram-positivas, uma vez que há diferenças entre a composição das paredes celulares bacterianas de ambos os grupos (MALANOVIC; LOHNER, 2016). As bactérias Gram-negativas possuem um envelope que consiste em três camadas. A primeira camada é a membrana externa, uma barreira celular externa de proteção, que é composta por um folheto interno de fosfolipídios e um folheto externo de lipopolissacarídeo, também conhecidos como endotoxina. Além de possuírem as proteínas da membrana externa, como as porinas, que permitem a passagem de pequenas moléculas como aminoácidos (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

A segunda camada é uma fina parede celular de peptidoglicano impressada entre as membranas interna e externa (EICHENBERGER; THADEN, 2019). o peptidoglicano é um exoesqueleto rígido responsável por determinar a forma da célula e consiste em uma unidade repetida de dissacarídeo ácido N-acetilglucosamina-N-acetilmurâmico (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020). A terceira camada é a membrana interna ou membrana citoplasmática, uma bicamada fosfolipídica responsável pela estrutura, transporte e funções biossintéticas da célula (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

Essas bactérias representam um dos mais significativos problemas de saúde pública, causando infecções em vários locais do corpo, incluindo trato urinário, trato respiratório inferior, trato biliar e corrente sanguínea (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020; EICHENBERGER; THADEN, 2019). Entre as Gram-negativas,

dois grupos de bactérias são os mais comuns, as *Enterobacteriaceae* e as Gram-negativas não fermentadoras (OLIVEIRA; REAGAERT, 2019).

As bactérias Gram-negativas não fermentadoras (BGNNF) se caracterizam pela incapacidade de fermentar açúcares para gerar energia para suas funções celulares vitais. Elas formam um heterogêneo de *Proteobacteria*, que apresenta grande relevância, uma vez se apresentam como microrganismos oportunistas, causando infecções graves e fatais (GAJDÁCS; BURIÁN; TERHES, 2019; OLIVEIRA; REAGAERT, 2019).

Neste grupo estão inclusas, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, o complexo *Burkholderia cepacia* (BCC), *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*, além de alguns gêneros menos frequentemente isolados, como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Brevimundus*, *Elisabethkingia*, *Flavobacterium*, *Ralstonia*, entre outros (GAJDÁCS; BURIÁN; TERHES, 2019). Todavia, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* são as bactérias que apresentam maior importância clínica, devido ao mal prognóstico acarretado pelos crescentes índices de resistência a antimicrobianos apresentados por cepas dessas bactérias (EL CHAKHTOURA *et al.*, 2018).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade da bactéria de sobreviver mesmo após exposição a antimicrobianos. Quando a bactéria é exposta a antimicrobianos diversas vezes, pode-se ocorrer transformações, modificação de genes e consequentemente apresentação de mecanismos de resistência (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; KHAMENEH *et al.*, 2016). A resistência entre as BGNNF resulta de mutações em genes cromossômicos e transferências horizontais de plasmídeos carregando genes de resistência (RUPPÉ; WOERTHER; BARBIER, 2015).

Os mecanismos de resistência mais comumente apresentados pelas BGNNF são as mutações nos sítios de ligação do antimicrobiano, inativação enzimática de antimicrobianos e alteração das proteínas ou porinas da membrana externa, resultando na redução da permeabilidade e bomba de efluxo (HO; TAMBYAH; PATERSON, 2010; MUNITA; ARIAS, 2016).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de bactérias que necessitam de novos antibióticos urgentemente, devido aos altos índices de resistência a antimicrobianos. As BGNNF, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* ficaram no topo da lista, apresentando estado crítico (WHO, 2017).

Nos últimos anos foi observado uma crescente prevalência de cepas *P. aeruginosa* MDR e extensivamente resistente à fármacos (XDR), com taxas entre 15% e 30% em algumas regiões do mundo. Essa alta prevalência de resistência à antimicrobianos que as cepas de *P. aeruginosa* expressam, tem relação parcial com sua resistência intrínseca, onde esse microrganismo naturalmente mostra uma maior propensão de expressar genes como cefalosporinase *AmpC*, *MexAB-OprM* e *MexXY*, que são responsáveis pela resistência a várias classes de antimicrobianos (HORCAJADA *et al.*, 2019).

Além disso, cepas de *P. aeruginosa* expressam menor permeabilidade da membrana externa em relação a outras Gram-negativas, possuem capacidade adquirida de causar infecção por meio da manipulação das interações entre o patógeno e o hospedeiro e excelente capacidade de desenvolver resistência frente a fármacos, como carbapenêmicos, polimixinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, entre outros, através da aquisição de mutações cromossômicas (*gyrA*, *parR*, *parS*) (HORCAJADA *et al.*, 2019; PACHORI; GOTHALWAL; GANDHI, 2019).

As cepas de *A. baumannii* possuem algumas semelhanças com as de *P. aeruginosa*, uma vez que também apresentam resistência intrínseca. Dessa maneira, também possuem altas taxas de cepas MDR, quando comparadas com algumas outras Gram-negativas. Esse microrganismo apresenta resistência principalmente a betalactâmicos, carbapenêmicos, fluoroquinolonas e mais recentemente polimixinas (IBRAHIM *et al.*, 2021; VÁZQUEZ-LÓPEZ *et al.*, 2020).

2.4 BIOFILME

Além desses mecanismos de resistência, as bactérias Gram-negativas podem ser produtoras de biofilme, um fator de virulência que promove a evasão da resposta imune do hospedeiro e garante a colonização e disseminação bacteriana. Biofilme pode ser definido como agregados de colônias microbianas envolvidas em uma matriz polissacarídica com proteínas e DNA (VASUDEVAN, 2014; HOLBLEY *et al.*, 2015). O biofilme é um sistema complexo composto por conjuntos de bactérias encapsuladas em uma matriz de substância polimérica extracelular tridimensional ligados a superfícies, que oferece maior estabilidade, segurança, nutrientes e oxigênio a esses microrganismos, protegendo-os de estresses químicos, físicos, do ambiente e do sistema imune, logo aumentando o potencial de sobrevivência e persistência dessas bactérias (BOUDAREL *et al.*, 2018).

Os biofilmes são formados a partir de três estágios específicos, sendo o primeiro a fixação superficial, seguido pela agregação de células para formação de microcolônias e a diferenciação para uma forma maturada, chegando à estrutura final do biofilme. Esse biofilme utilizará de diferentes mecanismos para se proteger, incluindo a difusão prejudicada de antibióticos, ativação da bomba de efluxo, indiferença a medicamentos, enzimas degradadoras de antibióticos, baixa expressão de proteínas, fatores de crescimento diminuídos, comunicação intercelular, expressão de mecanismos genéticos específicos para o biofilme, diferenças fenotípicas e presença de células persistentes, assim contribuindo para o aumento da resistência (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; ROY *et al.*, 2018).

Observa-se que a formação de biofilme é um fator chave na virulência de microrganismos relacionados com infecções crônicas, estando presente em 65-80% das infecções bacterianas recorrentes e agravando ainda mais o quadro clínico de pacientes, acarretando muitas vezes em falha do tratamento e óbito, logo necessita-se da implementação de novas terapias, como uso da PMB (VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

2.5 PMB

Uma classe importante de antimicrobianos utilizada para o tratamento de infecções ocasionadas por bactérias Gram-negativas são as polimixinas, especialmente a PMB. A PMB é um polipeptídeo catiônico cíclico administrado por via intravenosa, intramuscular e intratecal, utilizado para o tratamento de infecções do trato urinário, sepse e meningite, que ressurgiu na prática clínica devido aos altos índices de morbimortalidade nas infecções causadas por bactérias Gram-negativas MDR ou XDR, em especial por *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (AVEDISSIAN *et al.*, 2019; FALAGAS *et al.*, 2021).

Produzida pelo processo de fermentação da bactéria de solo "*Bacillus polymyxa*", a PMB é formada por um anel heptapeptídeo com alta porcentagem de ácido 2,4-diaminobutírico e uma cadeia lateral de tripeptídeos associada por uma ligação amida a um ácido graxo (HUANG *et al.*, 2020; VARDAKAS; FALAGAS, 2016; RIGATTO, FALCI; ZAVASCKI, 2019).

A polimixina B tem seu mecanismo de ação na membrana externa, ligando-se aos lipopolissacarídeos (LPS) e na membrana citoplasmática, ligando-se aos fosfolípidos, agindo de forma similar a detergentes catiônicos simples. A PMB

promove uma interação eletrostática que desloca os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , estabilizadores da parede celular, possibilitando a entrada no espaço periplasmático, consequentemente destruindo a integridade da membrana interna, levando à perda do conteúdo celular, ocasionando a morte da bactéria (YU *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2017).

Mesmo a PMB sendo a última linha de tratamento contra bacilos Gram-negativos MDR e XDR, tem-se relatado crescentes taxas de resistência. Essa resistência se dá pela modificação da estrutura da membrana externa, afetando diretamente a ação da PMB, que se liga aos LPS da mesma (SRINIVAS; RIVARD, 2017). Desse modo, torna-se importante a utilização de uma terapia antibacteriana com associação de um agente antimicrobiano convencional a um produto natural. Pois, produtos naturais apresentam potencial de atuação em sinergia com medicamentos utilizados na terapêutica, reduzindo a possibilidade de resistência bacteriana e a dose necessária para atingir o efeito desejado, ocasionando redução dos efeitos colaterais (VASCONCELOS *et al.*, 2020). Nesse contexto, o ácido úsnico (AU), aparece como uma opção terapêutica.

2.6 AU

O AU [2, 6-diacetil-7, 9-di-hidroxi-8, 9 b-dimetil-dibenzofurano-1, 3(2H, 9bH)-Diona] é um metabólito de líquen secundário isolado em 1844 (CAKMAK; GÜLÇİN, 2019). Ele possui um esqueleto de dibenzofurano único e é comumente encontrado em fungos liquenizados dos gêneros *Usnea* e *Cladonia* (LUZINA; SALAKHUTDINOV, 2018). Esse composto apresenta atividades farmacológicas, incluindo antiviral, antifúngica, antiinflamatória, analgésica, antibacteriana e antibiofilme (FERRAZ-CARVALHO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2020).

A atividade antibacteriana do AU se dá pela inibição da síntese de RNA e alongamento da replicação do DNA (ANTONENKO *et al.*, 2019; MACIĄG-DORSZYŃSKA; WĘGRZYN; GUZOW-KRZEMIŃSKA, 2014). A atividade antibiofilme se dá pela diminuição da capacidade de adesão, redução da espessura dos biofilmes maturados e por limitar nutrientes (NITHYANAND *et al.*, 2015; POMPILIO *et al.*, 2016).

Além disso, o AU também tem demonstrado capacidade de intensificar a atividade antibacteriana de fármacos comerciais (ARAÚJO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2020). Contudo, apesar de promissor, o AU apresenta baixa solubilidade aquosa

com a formação de agregados cristalinos, assim como hepatotoxicidade, dificultando sua aplicação na clínica, tornando-se necessário o desenvolvimento de uma alternativa que reduza esses problemas (FRANCOLINI *et al.*, 2019; BATTISTA *et al.*, 2020). Portanto, o desenvolvimento de uma alternativa para superar as limitações da PMB e do AU, assim como permitir a entrega desses agentes antibacterianos no alvo desejado é necessária.

2.7 LIPOSSOMAS

No sentido de superar limitações, uma alternativa viável é a utilização de nanocarreadores, pois eles possibilitam uma terapia eficiente e segura para a administração de fármacos, com a redução dos efeitos colaterais. Dentre os nanocarreadores, destacam-se os lipossomas (AGHDAM *et al.*, 2019).

Os lipossomas, descobertos por Alec Bangham em 1960, são vesículas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas com um ou mais compartimentos aquosos, que são capazes de incorporar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (AKBARZADEH *et al.*, 2013; SHTENBERG *et al.*, 2018).

Esses nanocarreadores são biocompatíveis, biodegradáveis, protegem os fármacos, possuem baixa toxicidade, direcionam a entrega do fármaco ao local da doença e aumentam a solubilidade e a biodisponibilidade de medicamentos, sendo ideal para veiculação de fármacos com limitações (BOZZUTO, MOLINARI, 2015; SHAH *et al.*, 2020).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com algumas características, como a lamelaridade (DARAEI *et al.*, 2016; HAS; SUNTHAR, 2020). Em relação a lamelaridade eles podem ser: lipossomas unilamelares (Uma bicamada lipídica separa a fase aquosa interna e externa), multilamelares (Presença de muitas bicamadas) e oligolamelares (Presença de algumas bicamadas) (HAS; SUNTHAR, 2020).

As bicamadas podem ter suas superfícies revestidas e funcionalizadas para suprir problemas como à degradação, agregação e fusão de vesículas lipossomais, justificando a utilização de revestimentos com biopolímeros, como a quitosana, que além de sanar esses problemas, também apresenta atividade antibacteriana (SEBAALY *et al.*, 2021).

2.8 QUI

A quitosana é um polissacarídeo formado por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina com grupamento amino, tornando-a um composto catiônico. A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina, oriunda, principalmente, do exoesqueleto de crustáceos (ALI, AHMED, 2018; CHOI; NAM; NAH, 2016; SENEL, YUKSEL, 2020).

Por possuir carga catiônica, a QUI tem maior solubilidade em água quando está em meio ácido. Devido ao grupo amina protonado nos resíduos glicosídicos repetidos, apresenta propriedades como bioadesão, biocompatibilidade, biodegradabilidade. Além de permitir a liberação do fármaco nas células bacterianas (ALI, AHMED, 2018; SEBAALY *et al.*, 2021). Assim, encapsular AU em lipossomas revestidos com quitosana e associá-lo a PMB pode ser uma nova abordagem terapêutica promissora frente a infecções bacterianas causadas por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a PMB.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme da associação da polimixina B com o ácido úsnico encapsulado em lipossomas revestidos com quitosana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a PMB.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU (LIPO-AU-QUI);
- Caracterizar o LIPO-AU-QUI quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de LIPO-AU-QUI e associação com a PMB.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DO LIPO-AU-QUI

O LIPO-AU-QUI foi preparado pelo método de hidratação do filme lipídico

seguido de sonicação. Para preparação do lipossoma, colesterol, AU, fosfatidilcolina e Tween 80 foram solubilizados em solvente orgânico sob agitação magnética. Em seguida, o filme lipídico foi formado pela evaporação dos solventes à pressão reduzida. O filme lipídico formado foi ressuspensionado com tampão fosfato (pH= 7.4) formando espontaneamente lipossomas multilamelares grandes que foram posteriormente sonicados para obtenção de lipossomas unilamelares pequenos (CAVALCANTI *et al.*, 2011). Para o revestimento com QUI dos lipossomas contendo AU, a QUI foi solubilizada em ácido acético glacial a 1%, e submetida a agitação constante por 1h e 30 min. Os lipossomas foram adicionados gota a gota na solução de quitosana e foram mantidos sob agitação magnética por 45 minutos (ALSHAMSAN *et al.*, 2019).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO LIPO-AU-QUI

O Lipo-AU-QUI foi submetido à caracterização físico-química através da análise do TP, PDI, PZ e pH como previamente descrito por Cavalcanti *et al.* (2011). As dispersões do lipossoma foram dimensionadas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Para análise do TP, a dispersão lipossomal foi diluída em água ultrapura. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (nm). O PZ dos lipossomas foi medido após a diluição da dispersão de lipossomas em uma solução de NaCl 1 mM. A carga superficial dos lipossomas (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH do lipossoma foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnocon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO LIPO-AU-QUI

Para determinar o teor de AU nas formulações, a formulação lipossomal AU foi diluída em CH₃OH, centrifugada durante 10 minutos e o sobrenadante, mensurado por espectrofotometria. Os resultados foram expressos em percentual a partir da média das absorbâncias. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes. A EE% do AU foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de lipossomas foram inseridas

nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 1h. Uma alíquota da amostra filtrada foi diluída em CH₃OH. O teor de AU foi mensurado por espectrofotometria e os resultados foram expressos em percentual a partir da média das absorbâncias (CAVALCANTI *et al.*, 2011). Os dados de eficiência de encapsulação de PMB foram calculados usando a equação descrita abaixo:

$$\% \text{ EE} = \text{Total de AU} - \text{filtrado de AU} \times 100 / \text{Total de AU}$$

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO LIPO-AU-QUI ASSOCIADO A PMB

A atividade antibacteriana *in vitro* do Lipo-AU-QUI, AU, PMB, PMB+AU e Lipo-AU-QUI+PMB foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Inicialmente foi distribuído caldo Mueller-Hinton em cada poço das placas. Em seguida, foram adicionados Lipo-AU-Qui e PMB através de diluição seriada e por fim as suspensões bacterianas das cepas A15, A25, A71, A72, A76, Pa18, Pa46, Pa56, Pa57, Pa78. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm. Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.5 MÉTODO CHECKERBOARD

Para avaliar a interação entre o AU e PMB, e Lipo-AU-Qui e PMB (Sigma-Aldrich®) frente às 10 cepas foi realizado o método Checkerboard (SOPIRALA *et al.*, 2010). Inicialmente, 95 µL de caldo Mueller-Hinton foi adicionado a cada poço de placas de 96 poços. Para obter a CIM final e diluições com valores inferiores à CIM dos respectivos compostos, adicionou-se PMB no eixo X e o AU e LIPO-AU no eixo Y. Finalmente, a concentração bacteriana foi ajustada para uma densidade de 0,5 na escala McFarland para obter a concentração final de 10⁵ UFC/poço. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controles de crescimento, contendo apenas o meio de cultura e o inóculo, enquanto os poços da coluna 12 foram utilizados como controles estéreis, contendo apenas o meio de cultura. As microplacas foram incubadas a 35 ± 2°C por 24 horas e após este período, a leitura foi realizada a 620 nm.

Para classificar o tipo de interação entre os compostos, o índice de concentração inibitória fracionada (FIC) foi calculado de acordo com a equação FIC

= $FICa + FICb = (Ca/MICa) + (Cb/MICb)$, onde Cb e Ca são os valores de MIC dos compostos combinados e MICa e MICb são os MIC dos compostos isolados. Os valores obtidos na equação FIC foram interpretados de acordo com a classificação proposta por Sopirala e colaboradores (2010): sinérgico ($FICI \leq 0,5$), aditivo ($0,5 > FICI \leq 1,0$), indiferente ($1 > FICI \leq 4,0$) e antagônico ($FICI > 4,0$).

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME PELOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados bacterianos produtores de biofilme foram identificados através do método do cristal violeta (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000). Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição e posteriormente foram adicionadas as suspensões bacterianas (10^5 UFC/mL) dos isolados clínicos, e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e, em seguida, as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e ácido acético glacial 30% foi adicionado em cada poço. Em seguida, a análise do resultado foi realizada por espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como controle negativo.

As cepas foram classificadas em quatro categorias baseado nos valores de ODs (Densidades ópticas) dos biofilmes bacterianos, em comparação com valor da ODc (Densidade óptica do controle): não aderente se $OD \leq ODc$; fraca produção de biofilme se $ODc < OD \leq 2 \times ODc$; produção moderada de biofilme se $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$; ou forte produção de biofilme se $4 \times ODc < OD$ (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000). Experimentos independentes em triplicata foram realizados em diferentes dias.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A atividade antibiofilme de Lipo-AU-QUI frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes a PMB foi realizada através do método do cristal violeta (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000). Inicialmente foi distribuído caldo triptona de soja (TSB) + glicose em cada poço das placas de microdiluição.

Em seguida foi adicionado às soluções de Lipo-AU-QUI, AU, PMB, PMB+AU e Lipo-AU-QUI+PMB através de diluição seriada e posteriormente foram adicionadas as suspensões bacterianas. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com tampão fosfato pH 7,4. As placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente. Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e ácido acético glacial 30% foram adicionados em cada poço. Em seguida a análise do resultado foi realizada através de espectrofotômetro a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram estatisticamente analisados e expressos em média $\pm$ desvio padrão. A comparação da média dos grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) aplicando o teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância usado nos testes foi de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO LIPO-AU-QUI

O Lipo-AU-Qui (Imagem 1) foi formulado e caracterizado. Os resultados da caracterização estão expressos na tabela 1.

Figura 1: Lipo-AU-Qui.



Fonte: Própria (2023)

O tamanho de partícula é um dos aspectos principais que influenciam a farmacocinética, distribuição tecidual e depuração de uma formulação, além de ter bastante influência em processos fisiológicos como acumulação e absorção hepática, difusão tecidual, extravasamento tecidual e excreção renal (DANAEL *et al.*, 2018). No nosso estudo, o tamanho da partícula foi de $136,6 \pm 5,1$ nm, assim, o lipossoma é capaz de atravessar e/ou penetrar em vasos fenestrados no endotélio hepático por ser ≤ 150 nm e ser distribuído para a medula óssea, baço e sinusóides hepáticos por capilares descontínuos, portanto podendo ser utilizado para entrega sistêmica (KRAFT *et al.*, 2014).

Quanto ao potencial zeta, a formulação apresentou carga superficial positiva, devido à interação eletrostática dos grupos de ácidos graxos livres e fosfato dos lipídeos, que apresentam carga levemente negativa, com grupamentos aminas da quitosana (NH_3^+), que apresentam carga positiva, portanto conferindo uma carga superficial positiva para os lipossomas, favorecendo repulsão eletrostática mais forte entre as partículas e acarretando em uma melhor estabilidade para a formulação (NAHR *et al.*, 2018; BASHIRI *et al.*, 2020).

Além disso, o Lipo-AU-Qui apresentou pH ácido, já que a quitosana é um polímero catiônico, que apresenta em sua estrutura química grupos amino na posição C_2 do anel de piranose da molécula, sendo este fator o principal para conferir carga positivamente à formulação e consequentemente ocasionar uma redução no pH da formulação (SHARILATINIA; JALALI, 2018).

O teor de AU no Lipo-AU-Qui foi de $98,9 \pm 0,3\%$, enquanto a % EE foi de $99,94 \pm 0,1\%$, demonstrando que o método de encapsulação utilizado neste estudo é eficiente. Devido o seu carácter hidrofóbico, o AU se inclui na bicamada lipídica do lipossoma, facilitando o processo de encapsulação e consequentemente aumentando a %EE (FRANCOLINI *et al.*, 2019; BATTISTA *et al.*, 2020).

No estudo de Lira *et al.* (2009) e Cavalcanti *et al.* (2018) observou-se um teor de AU acima de 90% e %EE próximo a 99% em lipossomas convencionais. Já no estudo de Nunes e colaboradores (2016) encapsulou-se o AU em membrana à base de gelatina contendo o lipossoma e encontrou-se uma %EE de 93,75%, assim como

no de Francolini *et al.* (2019), que encapsulou AU em lipossomas glicosilados e obteve uma % EE de 89%. Assim mostrando que nossos resultados corroboram com dados descritos na literatura. Além disso, os altos índices de teor e eficiência de encapsulação dos fármacos em formulações são fatores essenciais para um tratamento eficiente frente a infecções bacterianas causadas por bactérias Gram negativas multidroga resistente (ALOMRANI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019).

Tabela 1: Caracterização quanto ao tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação de Lipo-AU-Qui

Formulação	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	Teor (%)	%EE
Lipo-AU-QUI	136,6 ± 5,1	0,465	+28 ± 0,8	5,0	98,9 ± 0,3	99,9 ± 0,1

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-AU-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando AU.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana da PMB, AU, Lipo-AU-Qui e das combinações AU + PMB e Lipo-AU-Qui + PMB foram testadas (Tabela 2). As CIMs de PMB encontradas frente às 5 cepas de *P. aeruginosa* ficaram entre 8-32 µg/mL, já frente às cepas de *A. baumannii* as CIMs foram superiores a 32 µg/mL, sendo todas as cepas resistentes conforme os pontos de corte do CLSI ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$ = resistente)(CLSI, 2021). As CIMs de AU encontradas frente às 5 cepas de *P. aeruginosa* ficaram entre 250-500 µg/mL, já frente às cepas de *A. baumannii* as CIMs foram superiores a 500 µg/mL.

As CIMs do Lipo-AU-Qui encontradas frente às 10 cepas testadas ficaram entre 125-500 µg/mL, ocorrendo uma redução das CIMs quando o AU foi encapsulado. No estudo de Cavalcanti *et al.* (2018), utilizando lipossomas contendo AU, resultados semelhantes aos do nosso estudo também foram encontrados. Os lipossomas contendo AU apresentaram CIMs de 2 a 4 vezes menores em relação ao AU livre, quando testados frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

No estudo de Lira *et al.* (2009), utilizando lipossomas contendo AU frente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, também foi observado uma redução da CIM do lipossoma contendo AU em relação ao AU livre. Onde a CIM do lipossoma

contendo AU foi em torno de 10% menor do que a do AU livre, assim mostrando que a encapsulação do AU é eficaz e capaz de exacerbar sua atividade antibacteriana. Ademais, esse padrão também se manteve quando o AU livre e o Lipo-AU-QUI foram testados em associação com a PMB, onde o Lipo-AU-Qui associado com a PMB apresentou uma redução das CIMs em relação a combinação AU+PMB livres.

Tabela 2: Atividade antibacteriana da PMB, AU, Lipo-AU-Qui, AU + PMB e Lipo-AU-Qui + PMB

Bactérias	PMB	AU	Lipo-AU-Qui	AU + PMB	Lipo-AU-Qui + PMB
CIM (µg/mL)					
Pa18	8	500	125	500/8	31,25/0,0625
Pa46	32	250	125	250/32	31,25/2
Pa56	8	250	250	250/8	125/0,0625
Pa57	32	500	500	500/32	250/0,25
Pa78	32	500	250	500/32	125/0,25
A15	>32	>500	125	500/32	62,5/0,25
A25	>32	>500	500	500/32	250/0,25
A71	>32	>500	500	500/32	250/8
A72	>32	>500	500	500/32	250/8
A76	>32	>500	500	500/32	125/0,5

A: *Acinetobacter baumannii*; AU: Ácido úsnico; CIM: Concentração Inibitória Mínima; Lipo-AU-Qui: Lipossoma encapsulando ácido úsnico revestido com quitosana; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; PMB: Polimixina B.

A combinação AU + PMB manteve as mesmas CIMs encontradas quando os agentes foram testados isoladamente, apresentando interação indiferente frente às 10 cepas testadas (FICI = 2) (Tabela 3). Resultados semelhantes aos encontrados

no estudo de Costa *et al.* (2020) testando a combinação AU + PMB frente a isolados clínicos de *A. baumannii* e de Ferraz-Carvalho *et al.* (2016) com a associação entre AU e isoniazida frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

A combinação Lipo-AU-Qui + PMB foi testada no nosso estudo e constatou-se interações positivas frente a todas as cepas testadas, sendo 7 interações aditivas e 3 interações sinérgicas, logo mostrando que encapsulação do AU pode interagir melhor com fármacos comerciais, como a PMB, e induzir uma diminuição das CIMs.

No estudo de Ferraz-Carvalho *et al.* (2016) é testado uma formulação de Au encapsulado em lipossoma junto a isoniazida frente a isolados clínicos de *M. tuberculosis* e a interação apresentada é indiferente. Portanto, evidenciando que a atividade antibacteriana do LIPO-AU-QUI em associação com a PMB pode se mostrar mais eficaz a associações com o AU livre e com o AU encapsulado em combinação com outros fármacos. No nosso estudo, as CIMs de PMB diminuíram de 16-128 vezes quando testada em conjunto com o Lipo-AU-Qui, e as CIMs do Lipo-AU-Qui em associação com a PMB diminuíram entre 2-4 vezes, mostrando o quão promissora é essa combinação.

Tabela 3: Avaliação da interação entre AU + PMB e Lipo-AU-Qui + PMB.

Bactérias	AU + PMB CIM (µg/mL)	FICI	Interação	Lipo-AU-Qui + PMB CIM (µg/mL)	FICI	Interação
Pa18	500/8	2	Indiferente	31,25/0,0625	0,257	Sinergia
Pa46	250/32	2	Indiferente	31,25/2	0,312	Sinergia
Pa56	250/8	2	Indiferente	125/0,0625	0,507	Aditivo
Pa57	500/32	2	Indiferente	250/0,25	0,507	Aditivo
Pa78	500/32	2	Indiferente	125/0,25	0,507	Aditivo
A15	500/32	2	Indiferente	62,5/0,25	0,507	Aditivo
A25	500/32	2	Indiferente	250/0,25	0,507	Aditivo

A71	500/32	2	Indiferente	250/8	0,75	Aditivo
A72	500/32	2	Indiferente	250/8	0,75	Aditivo
A76	500/32	2	Indiferente	125/0,5	0,26	Sinergia

A: *Acinetobacter baumannii*; AU: Ácido úsnico; CIM: Concentração Inibitória Mínima; FICI: Índice de concentração inibitória fracionada; Lipo-AU-Qui: Lipossoma encapsulando ácido úsnico revestido com quitosana; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; PMB: Polimixina B.

5.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Foi avaliada a capacidade de produção de biofilme de 10 cepas (Tabela 4), onde a *A. baumannii* 25 (A25) apresentou produção de biofilme forte, a *P. aeruginosa* 57 (Pa57) apresentou produção fraca, e as demais apresentaram produção moderada. Das 10 cepas, 3 cepas de *P. aeruginosa* que produzem biofilme moderadamente foram escolhidas, e 3 cepas de *A. baumannii* que produzem biofilme fortemente e moderadamente foram escolhidas para a avaliação da atividade antibiofilme.

A produção de biofilme é cada vez mais comum em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes. No estudo de Gurung *et al.* (2013), avaliando a produção de biofilme de 109 isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, foi reportado que 46 cepas produziram biofilme, sendo 30 cepas de *A. baumannii* e 16 de *P. aeruginosa*. Além disso, houve uma relação entre a resistência e a produção de biofilme, relação essa, que também foi apresentada no nosso estudo, onde 9 das cepas resistentes a PMB apresentaram produção de biofilme moderada ou forte.

Tabela 4: Avaliação da produção de biofilme

Bactérias	Produção de biofilme
Pa18	Moderada
Pa46	Moderada
Pa56	Moderada
Pa57	Fraca

Pa78	Moderada
A15	Moderada
A25	Forte
A71	Moderada
A72	Moderada
A76	Moderada

A: *Acinetobacter baumannii*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

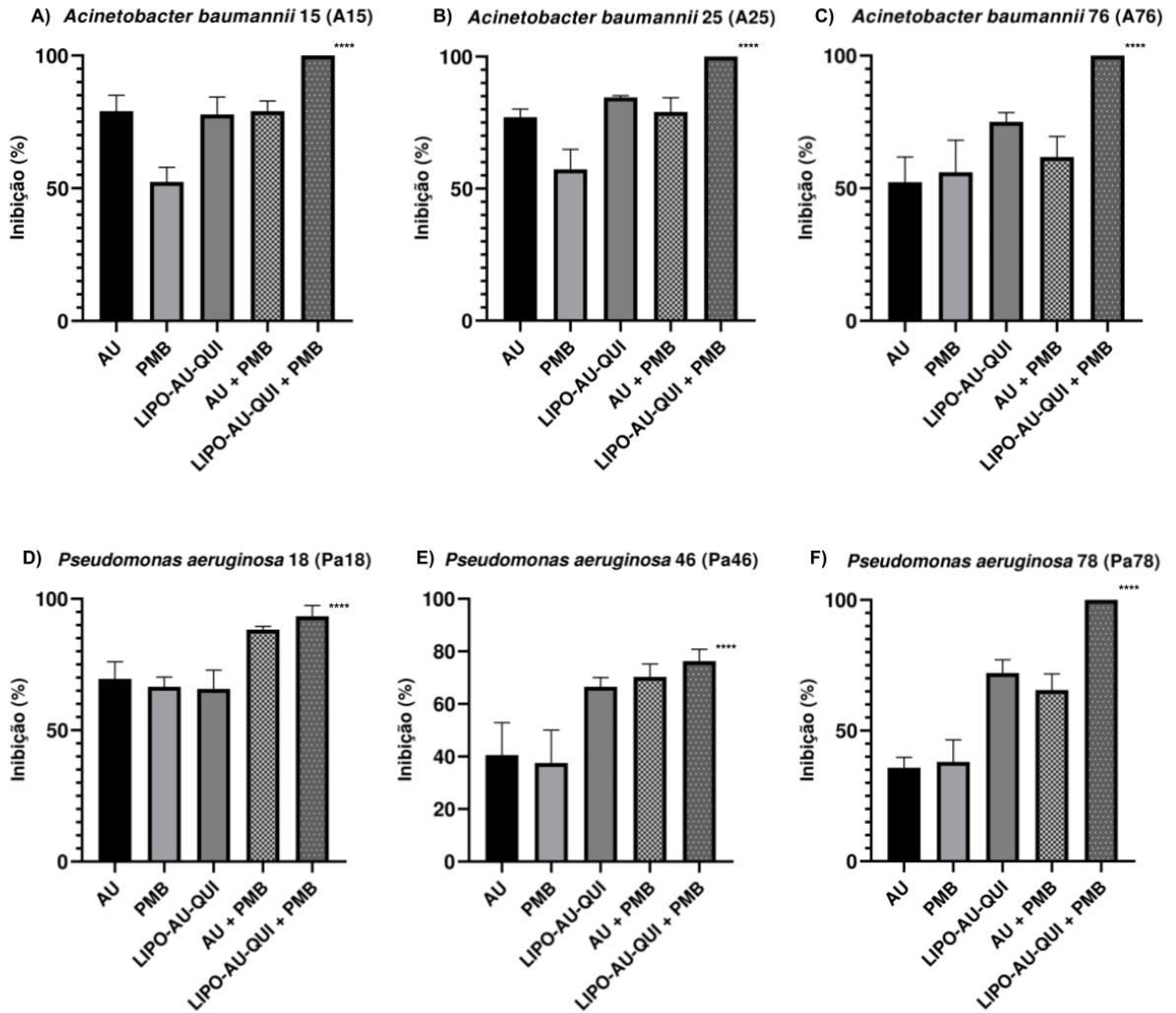
A atividade inibitória da formação de biofilme das 5 amostras e combinações foi testada frente às 6 cepas que apresentaram uma maior capacidade de formar biofilme. Nesse experimento foi avaliado a porcentagem de inibição da produção de biofilme utilizando as CIMs de cada composto e combinação previamente encontradas (Figura 2). O AU foi capaz inibir entre 35,75% e 79% a produção de biofilme das 6 cepas testada, a PMB inibiu entre 37,5% a 66,5%, o Lipo-AU-Qui inibiu entre 65,6% e 84,5%, a combinação AU + PMB inibiu entre 61,75% e 88,25% e a combinação Lipo-AU-Qui + PMB inibiu entre 76,25% e 100%.

No estudo de Francolini *et al.* (2019) avaliando a atividade antibiofilme de um lipossoma glicosilado contendo AU frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, foi relatado que a formulação lipossomal contendo AU apresentou uma maior inibição da formação de biofilme do que o AU livre, indicando que lipossomas contendo AU facilitam a penetração na matriz do biofilme e melhoram a atividade antibiofilme.

A atividade inibitória da combinação Lipo-AU-Qui + PMB foi significativamente superior ($p < 0,0001$) a todas as outras testadas no nosso estudo, chegando a inibir a produção de 4 cepas em 100%. Em nosso conhecimento não há estudos na literatura que associam lipossomas contendo AU com fármacos comerciais para a avaliação da atividade antibiofilme, sendo nosso estudo o primeiro a reportar e apresentar resultados promissores.

Figura 2: Atividade antibiofilme do AU, PMB, LIPO-AU-QUI, AU + PMB e LIPO-AU-QUI + PMB.

Valores de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) foram considerados significativos.



Fonte: Própria (2023)

6 CONCLUSÃO

Os nanocarreadores, em especial os lipossomas, apresentam uma ótima alternativa para a encapsulação de fármacos e produtos naturais. No presente estudo, a formulação Lipo-AU-Qui foi desenvolvida e caracterizada, apresentando características físico-químicas aceitáveis, além de uma alta eficiência de encapsulação. A combinação Lipo-AU-Qui + PMB foi capaz reduzir as CIMs dos compostos, mostrando interações aditivas e sinérgicas frente a cepas testadas, além de apresentarem melhores resultados do que a combinação com o AU livre, sendo capaz até de inibir a formação do biofilme em até 100%.

REFERÊNCIAS

- AGHDAM, M. A. et al. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. **Journal of Controlled Release**, 2019.
- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 102, 2013.
- ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, n. 1, p. 273-286, 2018.
- ALOMRANI, A. et al. The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 603-611, 2019.
- ALSHAMSAN, A. et al. Exploring anti-MRSA activity of chitosan-coated liposomal dicloxacillin. **Journal of Microbiological Methods**, v. 156, n. 1, p. 23-28, 2018.
- ANTONENKO, Y. N. et al. Mechanism of action of an old antibiotic revisited: Role of calcium ions in protonophoric activity of usnic acid. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1860, n. 4, p. 310-316, 2019.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. **Natural Product Research**, v. 29, n. 23, p. 2167-2180, 2015.
- ARCIOLA, C. R., CAMPOCCIA, D., MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397-409, 2018.
- AVEDISSIAN, S. N. et al. A review of the clinical pharmacokinetics of polymyxin B. **Antibiotics**, v. 8, n. 1, p. 31, 2019.
- BASHIRI, S. et al. Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity. **LWT**, v. 119, n. 1, p. 108836, 2020.

BATTISTA, S. et al. Correlation of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Liposomes Loaded with (+)-Usnic Acid. **ChemPlusChem**, v. 85, n. 5, p. 1014-1021, 2020.

BOUDAREL, H. et al. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2018.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975, 2015.

BRAGA, I. A. et al. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 99, n. 3, p. 318-324, 2018.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.

CAKMAK, K. C.; GÜLÇİN, İ. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-An activity-structure insight. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1273-1280, 2019.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332-340, 2011.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. Interaction study between vancomycin and liposomes containing natural compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.

CHOI, C.; NAM, J.; NAH, J.. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 33, p. 1-10, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st Edition (M100-S31)**. Wayne, PA, 2021.

COSTA, S. D. J. et al. Synergistic Effect between Usnic Acid and Polymyxin B against Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, p. 1-9, 2020.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DARAEI, H. et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.

DUAN, C. et al. Chitosan as a preservative for fruits and vegetables: a review on chemistry and antimicrobial properties. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 4, n. 1, p. 11-21, 2019.

EL CHAKHTOURA, N. G. et al. Therapies for multidrug resistant and extensively drug-resistant non-fermenting gram-negative bacteria causing nosocomial infections: a perilous journey toward 'molecularly targeted' therapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 16, n. 2, p. 89-110, 2018.

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant Gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 37, 2019.

FALAGAS, M. E. et al. Clinical use of intravenous polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: an evaluation of the current evidence. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 342-359, 2021.

FERRAZ-CARVALHO, R. S. et al. Effects of the encapsulation of usnic acid into liposomes and interactions with antituberculous agents against multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 330-334, 2016.

FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 453, 2017.

FRANCOLINI, I. et al. Glucosylated liposomes as drug delivery systems of usnic acid to address bacterial infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. 1, p. 632-638, 2019.

GAJDÁCS, M.; BURIÁN, K.; TERHES, G.. Resistance levels and epidemiology of non-fermenting gram-negative bacteria in urinary tract infections of inpatients and outpatients (RENFUTI): a 10-year epidemiological snapshot. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 143, 2019.

GURUNG, J. et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 17, n. 4, p. 214, 2013.

HAS, C.; SUNTHAR, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 30, n. 4, p. 336-365, 2020.

HO, J.; TAMBYAH, P. A.; PATERSON, D. L. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 546-553, 2010.

HOBLEY, L. et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 5, p. 649-669, 2015.

HORCAJADA, J. P. et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, p. e00031-19, 2019.

HUANG, J. et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems *PhoPQ* and *PmrAB*. **Future Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 445-459, 2020.

IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 10, p. 6987-6998, 2021.

IKUTA, K. S. et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221-2248, 2022.

JORGE, P. et al. A network perspective on antimicrobial peptide combination therapies: the potential of colistin, polymyxin B and nisin. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 6, p. 668-676, 2017.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KHAMENEH, B. et al. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 32-42, 2016.

KRAFT, J. C. et al. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 29-52, 2014.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510-543, 2014.

LIRA, M. C. B. et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2009.

LUZINA, O. A.; SALAKHUTDINOV, N. F. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: A patent review (2000–2017). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 28, n. 6, p. 477-491, 2018.

MACIĄG-DORSZYŃSKA, M.; WĘGRZYN, G.; GUZOW-KRZEMIŃSKA, B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by

inhibition of RNA and DNA synthesis. **FEMS microbiology letters**, v. 353, n. 1, p. 57-62, 2014.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 936-946, 2016.

MORRIS, S.; CERCEO, E. Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 196, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NAHR, F. K. et al. Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: Preparation, characterization and antimicrobial activity. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 1-8, 2018.

NITHYANAND, Paramasivam et al. Usnic acid inhibits biofilm formation and virulent morphological traits of *Candida albicans*. **Microbiological Research**, v. 179, p. 20-28, 2015.

NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1-2, p. 473-482, 2016.

OLIVEIRA J.; REAGAERT W. C. Gram Negative Bacteria. In: **StatPearls**. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2019.

PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDH I, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & Diseases**, v. 6, n. 2, p. 109-119, 2019.

POMPILIO, A. et al. Evaluation of antibacterial and antibiofilm mechanisms by usnic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 1315-1338, 2016.

RIGATTO, M. H.; FALCI, D. R.; ZAVASCKI, A. P. Clinical Use of Polymyxin B. In: LI, J.; NATION, R.; KAYE, K. **Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside**. Ed. 1. New York: Springer, Cham. p. 197-218.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

RUPPÉ, É.; WOERTHER, P.; BARBIER, F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. **Annals of Intensive Care**, v. 5, p. 1-15, 2015.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605-619, 2015.

SEBAALY, C. et al. Chitosan-coating effect on the characteristics of liposomes: A focus on bioactive compounds and essential oils: A review. **Processes**, v. 9, n. 3, p. 445, 2021.

SENEL, S.; YUKSEL, S. Chitosan-based particulate systems for drug and vaccine delivery in the treatment and prevention of neglected tropical diseases. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 1, n. 1, p. 1-31, 2020.

SHAH, S. et al. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 154, p. 102-122, 2020.

SHARILATINIA, Z.; JALALI, A. M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, n. 1, p. 194-2020, 2018.

SHTENBERG, Y. et al. Mucoadhesive alginate pastes with embedded liposomes for local oral drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 62-69, 2018.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4678-83, 2010.

SRINIVAS, P.; RIVARD, K. Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, p. 1-9, 2017.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

THAIRU, Y.; NASIR, I. A.; USMAN, Y.. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. **Sub-Saharan African Journal of Medicine**, v. 1, n. 4, p. 168, 2014.

VASCONCELOS, N. G. et al. Antibacterial activity and synergism of the essential oil of *Nectandra megapotamica* (L.) flowers against OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 3, p. 260-268, 2020.

VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. **Journal Microbiology Experimental**, v.1, n. 3, p. 1-16, 2014.

VARDAKAS, K. Z.; FALAGAS, M. E. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant gram-negative infections: a systematic review and meta- analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 233-238, 2017.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. et al. *Acinetobacter baumannii* resistance: a real challenge for clinicians. **Antibiotics**, v. 9, n. 4, p. 205, 2020.

VELÔSO, D. S.; CAMPELO, V.; DE SÁ, T. L. B. Incidência de infecções bacterianas e o perfil antimicrobiano utilizado no tratamento dos pacientes de um hospital de ensino. **Revista Interdisciplinar Ciências e Saúde - RICS**, v. 4, n. 2, p. 19-28, 2017.

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743-1750, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **"WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed"**. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=The%20most%20critical%20group%20of,Enterobacteriaceae%20\(including%20Klebsiella%2C%20E.>](https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=The%20most%20critical%20group%20of,Enterobacteriaceae%20(including%20Klebsiella%2C%20E.>)>. Acesso em: 07 abr. 2023.

YU, Z. et al. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. **BioMed Research International**, v. 1, Article ID 679109, p. 1-11, 2015.

ZHANG, Y. et al. Gallic acid liposomes decorated with lactoferrin: Characterization, in vitro digestion and antibacterial activity. **Food Chemistry**, v. 293, p. 315-322, 2019.