



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR/CCEN**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**  
**CELULAR E MOLECULAR**

**JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PIOCIANINA COMO**  
**COBERTURA ANTIBIOFILME FÚNGICO**

**JOÃO PESSOA**

**2019**

**JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PIOCIANINA COMO  
COBERTURA ANTIBIOFILME FÚNGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Coorientadora: Prof. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

**JOÃO PESSOA**

**2019**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586p Silva, Jonas Emanuel Guimaraes da.

Produção de nanopartículas de piocianina como cobertura antibiofilme fúngico / Jonas Emanuel Guimaraes da Silva. - João Pessoa, 2019.

69 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

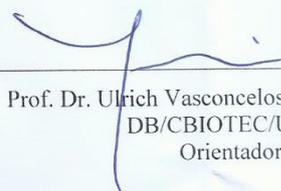
1. Biodeterioração. 2. Fenazinas naturais. 3. Nanossistemas. 4. *Aspergillus niger*. 5. *Penicillium* sp. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II. Kretzschmar, Elisângela Afonso de Moura. III. Título.

UFPB/BC

Jonas Emanuel Guimarães da Silva

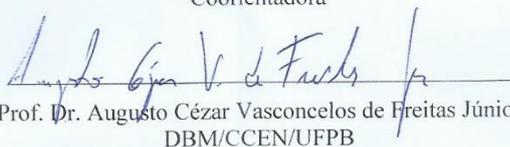
Produção de nanopartículas de piocianina como cobertura antibiofilme fúngico

Dissertação apresentada ao PPGBCM  
como requisito para a obtenção de  
Mestre em Ciências (Biologia Celular e  
Molecular). Aprovação em 16/08/2019.

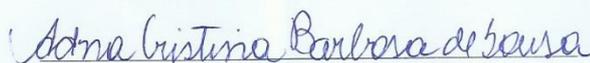


Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
DB/CBIOTEC/UFPB  
Orientador

Profª Drª Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar  
DB/CBIOTEC/UFPB  
Coorientadora



Prof. Dr. Augusto César Vasconcelos de Freitas Júnior  
DBM/CCEN/UFPB



Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa  
DBCM/CBIOTEC/UFPB

João Pessoa

2019

## DEDICATÓRIA

*À Deus, pela força e coragem durante essa caminhada.*

*A meus pais e noiva pelo apoio incondicional.*

*“De tempos em tempos, os homens tropeçam na verdade, mas a maioria deles se levanta e segue a diante como se nada tivesse acontecido”.*

*WINSTON CHURCHILL*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Ulrich Vasconcelos pela paciência, conselhos, solicitude, apoio e por realizar um excelente trabalho em sua profissão.

A minha coorientadora prof. Dra. Elisângela Moura pela enorme contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Ian Porto e professora Dra. Adna Sousa pela contribuição para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Eliton Medeiros, por ser tão solícito quanto ao uso das dependências do Laboratório de Materiais e Biosistemas LAMAB e ao técnico do laboratório Dr. Lucas Ricardo pelo apoio na realização de experimentos fundamentais.

A professora Márcia Rosa por aceitar e me acompanhar na realização do estágio docência

Aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo para realização desse meu sonho pessoal.

A minha noiva pela confiança, palavras de conforto, apoio, paciência e por todo amor ao longo dessa caminhada.

Ao Grupo LAMA e LANNI, todos que fazem parte, pelo companheirismo e apoio.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia e Departamento de Biologia Molecular.

Aos meus colegas de mestrado, em especial Tarcísio e Ray pelo auxílio na realização dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular UFPB, professores e funcionários que fazem parte dessa equipe.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SILVA, Jonas Emanuel Guimarães da. Produção de Nanopartículas de Piocianina como Cobertura Antibiofilme Fúngico. João Pessoa, 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

## RESUMO

A piocianina é um pigmento de origem bacteriana, com ação antibacteriana e antifúngica dependente da concentração. Logo, este trabalho teve como objetivo produzir, caracterizar e avaliar uma cobertura contendo nanopartículas de piocianina como agente antibiofilme frente a espécies fúngicas isoladas de uma parede externa pintada. Inicialmente foram isolados seis fungos de cinco gêneros, foram identificados: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Tricophyton*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da piocianina foi conhecida em *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em 140 µg/mL. As nanopartículas com e sem piocianina foram preparadas pelo método de nanoprecipitação. Os sistemas foram caracterizados quanto: pH, eficiência de encapsulação, morfologia, tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta. A avaliação da atividade antibiofilme ocorreu em corpos de prova de dolomita nas condições com e sem imersão em caldo Sabouraud-Dextrose 2%. Após, o número de células foi estimado pela técnica dos tubos múltiplos e por inspeção visual. As formulações desenvolvidas apresentaram bons aspectos morfológicos. Os valores da caracterização foram satisfatórios variando de 581,9 a 668,7 (tamanho); 0,33 a 0,57 (polidispersão); -4,40 a -5,37 (potencial zeta) e 6,15 a 6,24 (pH). O melhor resultado da eficiência de encapsulação foi 56%. Nos ensaios com os corpos de prova imersos, a população fúngica atingiu valores de  $\approx 10^3$ - $10^4$  NMP/100µL/cm<sup>2</sup>. Na condição não imersa foi observada uma redução da colonização fúngica nos corpos de prova que possuíam a cobertura de nanopartículas de piocianina comparado ao grupo controle. Os resultados demonstraram a viabilidade da formulação em termos biotecnológicos. Contudo, são necessários estudos posteriores para otimização desta cobertura.

**Palavras Chave:** Biodeterioração, Fenazinas naturais, Nanossistemas, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp.

SILVA, Jonas Emanuel Guimarães da. Produção de Nanopartículas de Piocianina como Cobertura Antibiofilme Fúngico. João Pessoa, 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular – Microbiologia) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

## ABSTRACT

Pyocyanin is a pigment of bacterial origin, with concentration-dependent antibacterial and antifungal action. Therefore, this work aimed to produce, characterize and evaluate a covering containing pyocyanin nanoparticles as an antibiofilm agent against fungal species isolated from a painted external wall. Initially, six fungi of five genera were isolated: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* and *Tricophyton*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of pyocyanin was known in *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. at 140 µg/mL. Nanoparticles with and without pyocyanin were prepared by the nanoprecipitation method. The systems were characterized as: pH, encapsulation efficiency, morphology, particle size, polydispersion and zeta potential. Antibiofilm activity was evaluated in dolomite specimens under conditions with and without immersion in Sabouraud-Dextrose 2% broth. Afterwards, the number of cells was estimated by multiple tube technique and by visual inspection. The formulations developed presented good morphological aspects. The characterization values were satisfactory ranging from 581.9 to 668.7 (size); 0.33 to 0.57 (polydispersion); -4.40 to -5.37 (zeta potential) and 6.15 to 6.24 (pH). The best result of encapsulation efficiency was 56%. In tests with immersed specimens, the fungal population reached values of  $\approx 10^3$ - $10^4$  NMP / 100µL / cm<sup>2</sup>. In the non-immersed condition, a reduction in fungal colonization was observed in the specimens that had the coverage of pyocyanin nanoparticles compared to the control group. The results demonstrated the viability of the formulation in biotechnological terms. However, further studies are needed to optimize this coverage.

**Key words:** Biodeterioration, Natural phenolines, Nanosystems, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BDA – Batata dextrose ágar

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentrações Inibitória Mínima

EE – Eficiência de Encapsulação

EPS – Exopolissacarídeo

EROS – Espécies reativas de oxigênio

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Intelectual

LAMA - Laboratório de Microbiologia Ambiental

LAMAB - Laboratório de Materiais e Biosistemas

LANNI - Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia Industrial

LSR - Laboratório de Solidificação Rápida

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

NMP - Número-Mais-Provável

NP's – Nanopartículas poliméricas

PCA - Ácido fenazino-1-carboxílico

PCL - Poli caprolactona

PDI – Polidispersão

PhzM – Metil transferase dependente de S-adenosilmetionina

PhzS - Mono-oxigenase flavina dependente de FAD

PLGA - Poli ácido lático-co-ácido glicólico

PMMA – Polimetil metacrilato

PVA- Poli álcool vinílico

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

UV – Ultravioleta

ζ – Potencial Zeta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Componentes da parede celular de fungos

**Figura 2** – Modelo de desenvolvimento de biofilme em fungos filamentosos

**Figura 3** – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas

**Figura 4** – Representação da preparação de nanopartículas

**Figura 5** – Monômero da cadeia do polimetil metacrilato.

**Figura 6** – Estrutura química da piocianina oxidada e reduzida.

**Figura 7** – Passos da biossíntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figura 8** – Vista parcial do Centro de Biotecnologia com destaque a parede de coleta.

**Figura 9** – Aspectos da área de coleta.

**Figura 10** - Colônias fúngicas da parede externa do prédio anexo do Centro de Biotecnologia da UFPB

**Figura 11** – Isolados fúngicos

**Figura 12** – Aspectos microscópicos dos isolados fúngicos

**Figura 13** – Aspectos macroscópicos da formulação

**Figura 14** – Aspectos da nanopartícula branca na escala nanométrica

**Figura 15** – Aspectos da nanopartícula branca na escala micrométrica

**Figura 16** – Aspectos da nanopartícula de piocianina na escala nanométrica

**Figura 17** – Aspectos da nanopartícula de piocianina na escala micrométrica

**Figura 18** – Aspectos do desenvolvimento de *Aspergillus niger* no corpo de prova de dolomita

**Figura 19** – Aspectos do desenvolvimento de *Penicillium* sp. no corpo de prova de dolomita

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima da piocianina frente isolados fúngicos

**Tabela 2** – Concentração Fungicida Mínima da piocianina frente isolados fúngicos

**Tabela 3** – Características das nanopartículas brancas ao longo de 90 dias

**Tabela 4** – Características das nanopartículas de piocianina ao longo de 90 dias

**Tabela 5** – Caracterização das nanopartículas brancas ao longo de 90 dias: tamanho, polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$ ).

**Tabela 6** – Caracterização das nanopartículas de piocianina ao longo de 90 dias: tamanho, polidispersão (PDI) e potencial zeta ( $\zeta$ ).

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Biologia dos Fungos.....	15
1.2	Formação de biofilmes em paredes .....	17
1.2.1	Biofilmes fúngicos.....	19
1.3	Nanopartículas.....	21
1.3.1	Polimetil metacrilato (PMMA).....	24
1.4	Piocianina .....	26
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1	Objetivo Geral .....	29
2.2	Objetivos Específicos .....	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Local da realização do trabalho.....	30
3.2	Fungos filamentosos: Coleta .....	30
3.3	Isolamento e identificação dos fungos filamentosos.....	31
3.4	Piocianina e curva padrão.....	32
3.5	Ensaio microbiológicos.....	32
3.5.1	Obtenção do inóculo.....	32
3.5.2	Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). .....	32
3.6	Preparação das nanopartículas.....	33
3.6.1	Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme: corpos de prova imersos .....	34
3.6.2	Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme: corpos de prova não imersos.....	35
3.7	Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade das nanoestruturas .....	35
3.7.1	Morfologia, tamanho e distribuição da partícula.....	35
3.7.2	Determinação do potencial Zeta.....	36
3.7.3	Estabilidade dos sistemas .....	36
3.7.4	Determinação da taxa de encapsulação da molécula nas nanopartículas .....	36
4.	RESULTADOS .....	37
4.1	Fungos filamentosos.....	37
4.2	Atividade Biológica (CIM e CFM) .....	39
4.3	Formulação e Caracterização das Nanopartículas.....	39
4.4	Ensaio de caracterização e estabilidade das nanopartículas .....	43

4.5	Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme: corpos de prova imersos .....	44
4.6	Ensaio <i>in vitro</i> da formação do biofilme: corpos de prova não imersos.....	45
5.	DISCUSSÃO.....	46
6.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS .....	53
	APÊNDICE A – Cadastro dos isolados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) .....	66
	APÊNDICE B – Curva de calibração da piocianina .....	67
	APÊNDICE C – Difração de raios X do cupom de dolomita .....	68
	APÊNDICE D – Depósito da patente.....	69

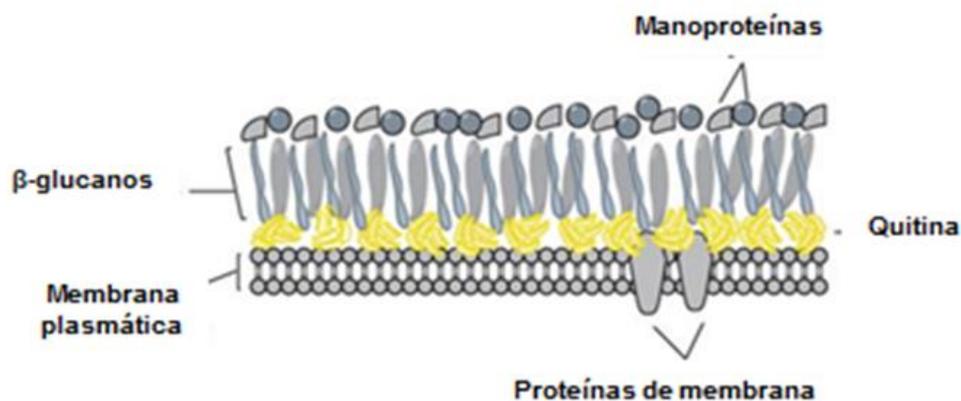
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Biologia dos Fungos

Os fungos (*Eukarya*) são organismos heterotróficos cuja principal característica diz respeito à sua natureza saprófita, isto é, depende da matéria orgânica em decomposição para seu desenvolvimento (SOLINO, 2017).

A parede celular dos fungos (Figura 1) é uma estrutura complexa e dinâmica, composta principalmente por uma camada protetora de quitina, localizada mais próxima da membrana plasmática, bem como glucanos  $\alpha$  e  $\beta$  (principalmente  $\beta$ ) e manoproteínas em sua superfície. A composição e organização da parede celular dos fungos variam de acordo com a espécie (FREE, 2013; GOW et al., 2017) e sua membrana celular segue o modelo do mosaico fluido, tendo o ergosterol como seu esteroide constituinte.

**Figura 1** - Componentes da parede celular de fungos



Fonte: Modificado de Vega e Kalkum (2012).

A assimilação de nutrientes pelos fungos, característica que definiu a criação do Reino, ocorre por meio da digestão enzimática extracelular de moléculas orgânicas complexas oferecidas pelo meio, possuindo habilidade para utilizar quase todos os tipos de fontes de carbono para seu desenvolvimento. Esta característica fisiológica particular faz dos fungos, seres adaptados para o crescimento apical sobre superfícies (ALEXOPOULOS, 1996).

Estes organismos podem ser de dois tipos morfológicos: célula única (leveduras), que possuem duas formas de reprodução: a fase assexuada que ocorre por brotamento, único ou múltiplo, formando os blastoconídios (leveduras), e a fase sexuada por esporos sexuais, os ascósporos, este último processo não tão frequente (ANVISA, 2004; BRASIL, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017), e multicelulares (bolores ou fungos filamentosos), os

fungos filamentosos são microrganismos mais desenvolvidos e, possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada e não septada (cenocítica). As hifas são estruturas alongadas, cilíndricas ou tubulares, dotadas de parede celular externamente à membrana plasmática. O conjunto de hifas da origem ao micélio, o qual se diferencia para diversos fins, dentre os quais o micélio vegetativo e o reprodutivo (aéreo), que se encarregam das funções básicas e cruciais para a formação e manutenção do fungo em um ambiente (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Os fungos possuem relações benéficas com a espécie humana, por exemplo: (1) na decomposição e reciclagem de matéria orgânica; (2) no aproveitamento do seu metabolismo, obtendo-se produtos com valor agregado, tais como, antibióticos, esteroides e enzimas alimentares, fermentados lácteos, bebidas, bioetanol; (3) no consumo direto como alimento, como os cogumelos e na composição de queijos; e (4), como controle biológico contra pragas (ROSS; MORGAN; HILL, 2002; BOURDICHON et al., 2012; MADIGAN et al., 2016; TAMANG; WATANABE; HOLZAPFEL, 2016; TAKAHASHI et al., 2017).

Entretanto, os fungos são mais associados às relações negativas e mais atenção é dada neste sentido. Os fungos participam dos processos de deterioração de alimentos, da produção de metabolitos tóxicos, especialmente em grãos e patógenos de vegetais, causando perdas econômicas (SANTOS; VARAVALLO, 2011; SOUZA et al., 2017). Adicionalmente, os fungos podem ser responsáveis por síndromes de hipersensibilidade, bem como se comportar como patógenos oportunistas em humanos, especialmente nas micoses da pele, mucosas e vias aéreas, podendo evoluir para óbito em indivíduos imunocomprometidos (DEACON, 2006; BRASIL, 2009).

Os fungos filamentosos são considerados organismos ubíquos e se propagam na natureza a partir dos seus habitats (BERNARDI; NASCIMENTO, 2005). A reprodução dos fungos ocorre por meio dos esporos de natureza sexual ou assexual, os quais ficam no solo, plantas e em suspensão no ar, essa dispersão ocorre especialmente em consequência da grande produção de elementos de disseminação, os propágulos, representados por esporos, conídios, como também fragmentos do micélio vegetativo (DEGOBBI; GAMBALE, 2008). Ao atingirem um meio favorável os propágulos fúngicos, absorvem água e nutrientes e então germinam, dando origem às hifas, que posteriormente se diferenciarão no micélio. As espécies sofrem variações na incidência conforme a localidade, sazonalidade, grau higroscópico do ar entre outros (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; KHAN; KARUPPAYIL, 2012).

Os fungos dispersos pelo ar atmosférico são denominados fungos anemófilos, os quais pertencem a diversos gêneros. Os fungos anemófilos se desenvolvem em quase todos os substratos, orgânicos ou inorgânicos, especialmente se forem úmidos. Matrizes inorgânicas tais como paredes, podem ser colonizadas à medida que recebem poeira, servindo como substrato de crescimento (KHAN; KARUPPAYIL, 2012). Dessa forma, paredes exteriores podem se caracterizar como um local propício para a colonização fúngica.

A preocupação com esse tipo de crescimento não é apenas uma questão de estética, uma vez que os fungos são considerados os principais deteriorantes da superfície pintada (SHIRAKAWA et al., 2002; ISHFAQ et al., 2015). Esta colonização também é uma questão de saúde pública, visto que os propágulos fúngicos são facilmente respiráveis, podendo ocasionar doenças ligadas ao sistema respiratório (ADAN; SAMSON, 2011; KHAN; KARUPPAYIL, 2012).

As espécies fúngicas anemófilas ao se instalarem em locais propícios podem se desenvolver em uma comunidade microbiana organizada, conhecida como biofilmes. Estas estruturas atribuem maior resistência aos elementos estressantes presentes no meio, e em longo prazo contribui para com o comprometimento da estrutura de diversos materiais, tais como concreto, em função dos produtos de seu metabolismo (ERICH et al., 2016). Dentre os gêneros mais comuns em paredes, destacam-se *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Esses organismos estão frequentemente relacionados à degradação de superfícies de concreto, como ao desenvolvimento de reações alérgicas e doenças relacionadas ao trato respiratório (CARMO et al., 2007; GIANNANTONIO et al., 2009; SOUZA et al., 2010; ISHFAQ et al., 2015).

## **1.2 Formação de biofilmes em paredes**

O termo biofilme é atribuído a uma comunidade microbiana séssil irreversivelmente ligada a um substrato biótico ou abiótico, podendo ser composto por populações de uma única ou mais espécies, envolvidas por uma substância polimérica extracelular (EPS) (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; MONDS; O'TOOLE, 2009). No seu interior ocorre intenso metabolismo, coordenado por um sistema de comunicação intercelular, densidade celular dependente ou *Quorum-sensing*, permitindo a manutenção de todo o sistema e garantindo a variabilidade fenotípica e trocas genéticas (DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002).

A formação de biofilmes é um processo acumulativo, dinâmico e geralmente não uniforme. Sua composição e distribuição variam significativamente, sendo governadas pelo

tipo de material ao qual está agregado. Algumas condições são essenciais para que isto ocorra, por exemplo, a natureza do substrato, disponibilidade de matéria orgânica, presença de água na forma líquida ou vapor, responsável pela veiculação dos nutrientes no interior do biofilme (TELEGDI, 2000; STOODLEY et al., 2002; BRANDA et al., 2005; HERRERA; VIDELA, 2009).

Estruturalmente, as células deixam uma condição móvel planctônica e ficam firmemente presas a uma superfície ou a outras células dentro de uma matriz exopolimérica. A alteração no fenótipo das células em um biofilme, com relação à sua forma planctônica, possibilita uma maior tolerância aos estresses químicos, biológicos ou físicos. É amplamente aceito que os microrganismos na natureza raramente sobrevivam como células solitárias, em favor da vida em biofilmes. Acredita-se que a formação de biofilmes é tão prevalente que é provável que seja uma característica selecionada positivamente muito cedo na evolução microbiana para a sobrevivência em ambientes diversos (HARDING, 2009).

Na natureza, a demanda de nutrientes é de certa forma limitada, e sob estas condições o crescimento em biofilme apresenta vantagem. Uma das vantagens mais facilmente identificadas para os microrganismos que vivem em biofilmes reside em sua matriz que funciona como uma barreira de proteção física. Desta forma, forças hidrodinâmicas serão menos eficazes em removê-los, além de ser uma proteção que permite aos microrganismos que vivem nos biofilmes resistir a fatores como a falta de nutrientes, alterações de pH, presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ação de antimicrobianos (HARDING et al., 2009; VAN DIJCK et al., 2018). Ainda que cresçam mais lentamente que os microrganismos planctônicos, os biofilmes são seguramente mais eficientes, uma vez que conseguem utilizar com mais eficiência todos os nutrientes existentes (AZEVEDO, 2012).

O biofilme, como definido, é uma forma de proteção que permite a manutenção dos microrganismos em ambientes hostis, tais como uma parede de concreto exposta ao sol. Quando já formado, os exopolímeros facilitam a adesão de outros microrganismos, a retenção de água e o acúmulo de substâncias inorgânicas que servem de alimento para os organismos autotróficos. Os biofilmes podem exibir diversas colorações de acordo com a comunidade presente e/ou seus produtos de excreção. Entretanto, são frequentemente entre o verde e o preto, devido à elevada concentração de organismos com clorofila (algas, cianobactérias, líquens) ou à presença de fungos que produzem pigmentação. Os organismos fotossintéticos, em particular, as algas e as cianobactérias são considerados os primeiros colonizadores de um substrato inorgânico, quando não há disponibilidade de nutrientes no local, dependendo

apenas da luz, dióxido de carbono e água. Esta é a razão pela qual os biofilmes fotoautotróficos são geralmente a fase inicial da formação de um biofilme mais complexo. Quando há presença de fungos, o poder de penetração do biofilme no substrato é maior devido às hifas, por apresentarem elevada capacidade de perfuração entre minerais e também intraminerais (MILLER et al., 2009; RAMAGE et al., 2009; AZEVEDO, 2012).

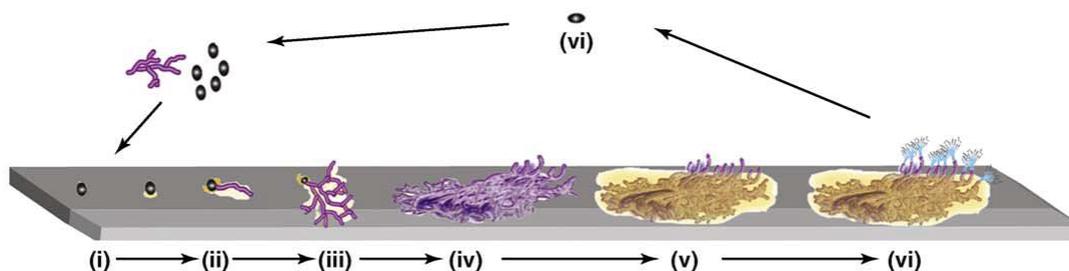
### **1.2.1 Biofilmes fúngicos**

Os micologistas têm observado que entre praticamente todos os fungos não existe a sua forma livre e sim, agrupada formando biofilmes, ocorrendo em tecidos vivos, bem como superfícies inanimadas, tais como dispositivos implantáveis (próteses e cateteres) e paredes de concreto (RAMAGE et al., 2009; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SINGH; SHIVAPRAKASH; CHAKRABARTI, 2011; NUNES et al., 2013).

Os fungos leveduriformes e filamentosos possuem potencial de desenvolvimento na natureza na forma planctônica ou sésil. A forma planctônica possui mais de uma estrutura, por exemplo, esporos sexuais, esporos assexuais (conídios), esporângios e fragmentos de hifa. Essas formas dispersantes são flutuantes no ar, apresentando uma forte dependência da disseminação aérea. Por outro lado, a forma sésil caracteriza-se pelo desenvolvimento fúngico em uma miríade de substratos, fixados por uma matriz polissacarídica (RAMAGE et al., 2012).

Com o intuito de elucidar os estágios da formação e como base algumas observações experimentais, Harding et al., (2009) estabeleceram modelos para descrever o desenvolvimento e as características do biofilme dos fungos filamentosos. Sendo esse um modelo preliminar dividido em seis etapas (Figura 2):

**Figura 2** – Modelo de desenvolvimento de biofilme em fungos filamentosos.



(i) Adsorção, (ii) Fixação ativa, (iii) Microcolônia I, (iv) Microcolônia II, (v) Desenvolvimento do biofilme maduro e (vi) Fase de dispersão ou planctônica. Fonte: Harding et al. (2009)

A 1ª etapa é a adsorção do propágulo que é caracterizada pela deposição de esporos ou propágulos, tais como fragmentos de hifas ou esporângios. Este passo envolve contato do organismo com a superfície; a 2ª é a adesão dos fungos filamentosos inclui a secreção de substâncias adesivas, equivale à adesão irreversível no modelo empregado nos biofilmes bacterianos; 3ª é conhecida como microcolônia I, fase caracterizada pelo alongamento apical e ramificação das hifas, crescimento da secreção de exopolissacarídeos, permitindo o crescimento da colônia para aderir firmemente ao substrato; 4ª é a microcolônia II – ocorre a maturação inicial, com formação de uma rede de hifas compactadas ou micélio. As hifas são envoltas pelo exopolissacarídeo e canais para transporte de água são formados; 5ª é a maturação, quando são formados os corpos de frutificação, células esporogênicas, esclerócios; 6ª e última etapa é a dispersão, nesta fase os esporos são dispersos e podem atuar como novos propágulos, reiniciando o ciclo (HARDING et al., 2009).

A limpeza mecânica e ação de agentes antimicrobianos são os métodos mais utilizados no controle de biofilmes fúngicos. Segundo a Diretiva Europeia (1998), biocidas, tais como os produtos oriundos da mistura de isotiazolinas e compostos fenólicos, são “substâncias ativas ou preparações, que contenham uma ou mais substâncias ativas, e que se destinam a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar a ação de um microrganismo prejudicial por mecanismo químico ou biológico” [SIC]. A aplicação eficaz de biocidas deve considerar diversos fatores: conhecimento do microrganismo a eliminar; Seleção da concentração correta do biocida; Determinação da frequência de dosagem; Monitorização do controle dos microrganismos através de análise e processamento de informação; Monitorização da adesão microbiana a superfícies (AZEVEDO, 2012).

Sabe-se que as aplicações atuais de agentes biocidas oferecem proteção por um curto período de tempo (NORDSTIERNA et al., 2010) e a maioria dos compostos utilizados nesta função são tóxicos ao ambiente, limitando as concentrações máximas permitidas (NOWACK; BUCHELI, 2007). Assim, a utilização de sistemas nanométricos empregando compostos

bioativos aparece como uma alternativa a esses problemas, ocasionando liberação gradual do princípio ativo, prologando o seu tempo de ação ao diminuir sua lixiviação (JÄMSÄ, et al., 2013). Aditivos com potencial biocida comumente aplicados como nanossistemas em coberturas são as partículas de prata (RAI, 2009; FIORI, et al., 2017). Porém, este metal possui elevada toxicidade aos fibroblastos humanos nas concentrações empregadas como agente antimicrobiano (PANACEK, et al., 2009). Coberturas são revestimentos, como tintas e vernizes, que podem ser utilizados com função decorativa ou protetora (RISCHBIETH; MARSON, 1961; GHOSH, 2006). Além disso, existem as coberturas antimicrobianas que são utilizadas para proteger as superfícies contra microrganismos indesejáveis, podendo serem capazes de prevenir a formação de biofilme ou erradicar os já estabelecidos (ÜNAL, 2018).

### **1.3 Nanopartículas**

A nanociência é a ciência que estuda os fenômenos científicos que ocorrem na escala de tamanhos nanométricos e trata de questões importantes com potencial para novas aplicações tecnológicas. O termo nanotecnologia é mais comumente utilizado, quando o objetivo está nas aplicações. A nanotecnologia é considerada uma área promissora da pesquisa científica, demonstrando um forte crescimento nos últimos anos, sendo um campo multidisciplinar que integra disciplinas como física, química e biologia (KRUMMENACKER; LEWIS, 1995).

Dentre os cientistas e estudiosos ligados à nanotecnologia nos tempos modernos destaca-se o físico estadunidense Richard Feynman, condecorado com o Nobel de física, em 1959. E este ano é por muitos considerado o marco inicial da nanotecnologia, quando Feynman na reunião da American Physical Society, discutiu as possibilidades, vantagens e mudanças com a obtenção de materiais em nanoescala (MELO; PIMENTA, 2004).

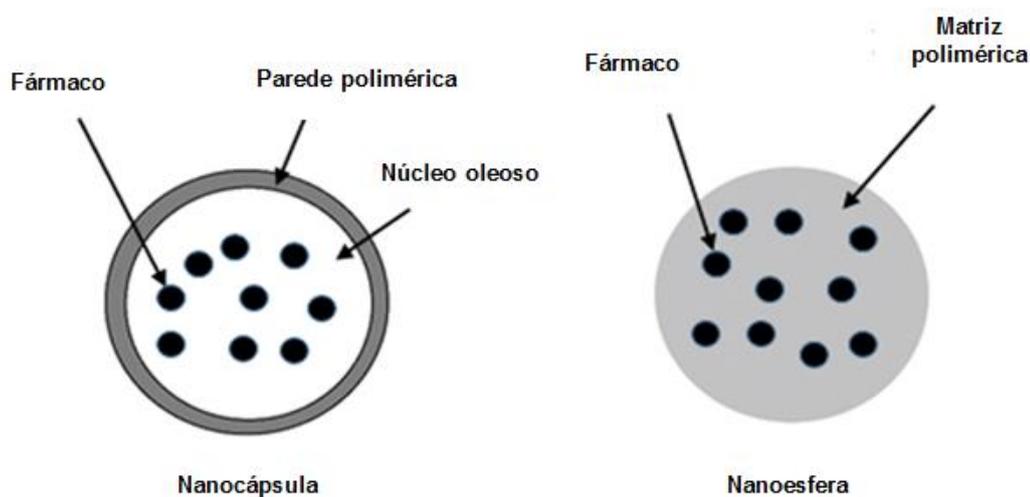
A nanotecnologia possui potenciais aplicações nos mais variados ramos da ciência e tecnologia atuais, e pode ser definida como a produção, caracterização e aplicação de estruturas e dispositivos em escala nanométrica. O nanômetro (nm) é uma unidade de medida que corresponde à bilionésima ( $10^{-9}$ ) parte do metro. Por meio dela é visto o maior potencial de fabricar materiais com propriedades bem definidas e pré-estabelecidas, não encontradas em materiais convencionais, uma vez que as propriedades em escala nanométrica diferem significativamente daquelas em uma escala maior, como por exemplo, a propriedade de alta relação superfície/volume dos sistemas nanoestruturados (DURÁN, 2006).

As nanopartículas poliméricas (NP's) são sistemas coloidais, podendo ser compostas por polímeros naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não (SCHAFFAZICK et al., 2003). De acordo com o método pelo qual são sintetizadas, as NP's apresentam diferenças morfológicas e estruturais (Figura 3) e podem ser diferenciadas em:

1) Nanocápsulas: constituídas por um núcleo líquido, podendo ser oleoso ou aquoso, envolto por uma parede polimérica. A molécula a ser transportada pode estar encapsulada no núcleo ou adsorvida à parede polimérica. (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al, 2010; RAO; GECKELER, 2011).

2) Nanoesferas: compostas por uma matriz sólida composta por polímero, em que a substância carregada encontra-se aderida ou adsorvida na matriz (RAO; GECKELER, 2011).

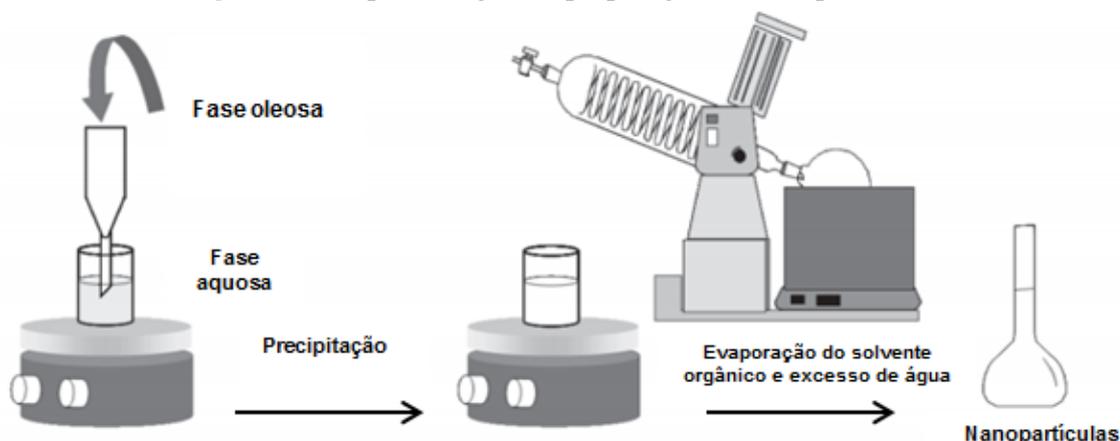
**Figura 3** – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Modificado de Khalil et al. (2017).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a preparação das nanopartículas poliméricas. De um modo geral, estes métodos podem ser divididos em duas categorias principais: os baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (REIS et al., 2006; MORA-HUERTAS et al., 2010), ou as técnicas baseadas na precipitação de polímeros pré-formados (Figura 4).

**Figura 4** – Representação da preparação de nanopartículas



Fonte: Modificado de Guterres et al. (2007)

O método da precipitação de polímeros pré-formados é uma técnica na qual existe uma fase orgânica que conta com a presença do polímero e o seu solvente específico, e uma fase aquosa, composta por um não solvente, para o polímero utilizado, associado com um surfactante ou copolímero, que servirá para aumentar o poder de solubilização do polímero na fase aquosa quando ocorrer à mistura de fases, evitando a agregação. A peculiaridade dessa técnica está no fato do polímero estar dissolvido com o princípio ativo numa mistura de solventes (fase orgânica). Assim, esta mistura é vertida lentamente em meio aquoso sob agitação, o que resulta na deposição do polímero formando o nanossistema (REIS et al., 2006; MILADI et al., 2016). Após a mistura das duas fases, o polímero precipita na interface pela redução de sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos solventes favorece a formação de nanogotas, as quais servem como núcleo para que ocorra precipitação do polímero (FESSI et al., 1989). A partir disso, nota-se surgimento imediato de uma suspensão leitosa, desde a formação das nanopartículas.

A caracterização físico-química das nanopartículas envolve vários aspectos, tais como, tamanho e distribuição das partículas, determinação do potencial Zeta ou potencial de superfície das partículas, determinação do pH, quantificação do princípio ativo associado às nanoestruturas e avaliação da estabilidade da formulação em função do tempo de armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORA-HUERTAS et al., 2010).

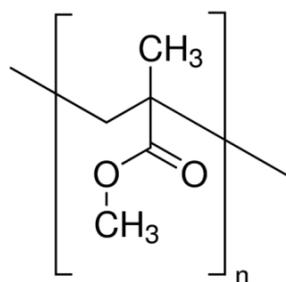
De acordo com a área de pesquisa é necessário buscar a utilização de polímeros que possam atender as necessidades do objetivo. Na área biomédica existe uma utilização acentuada dos polímeros Poli caprolactona (PCL) ou poli (ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA)). Já na utilização de nanopartículas com biocidas para ambientes externos existe a utilização do polimetil metacrilato (PMMA), devido a sua boa resistência a intempéries

naturais e fraca degradação quando exposto a raios UV (BRYDSON, 1999; STRONG, 2000; CAMPO, 2006; OSSWALD et al., 2006;).

### 1.3.1 Polimetil metacrilato (PMMA)

O PMMA faz parte da família dos polímeros acrilatos, conhecidos como acrílicos. O composto é um polímero orgânico de cadeia linear, com ligação entre monômeros por meio de ligações covalentes entre os carbonos saturados. Este polímero (Figura 5) apresenta grupos metila e carbonila em sua estrutura (YOUNG, 1992). O PMMA é formado pela polimerização em bloco, emulsão ou suspensão do ácido metacrílico (BRYDSON, 1999; CAMPO, 2006).

**Figura 5** – Monômero da cadeia do polimetil metacrilato



Fonte: Sigma Aldrich<sup>1</sup>

O PMMA é um polímero não biodegradável, entretanto, biocompatível, isto é, que não produz efeitos indesejáveis sobre os tecidos biológicos, utilizado em aplicações que requerem estruturas estáveis e mecanicamente estáveis (JESSY; IBRAHIM, 2014). O PMMA possui características observáveis em todas as formas do material, independente do processo de polimerização. São elas: alta termoplasticidade, insolubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos, boa resistência às intempéries, alta rigidez dielétrica, baixa densidade e biocompatibilidade, dentre outras (CALLISTER, 2013).

O PMMA passou a ser utilizado em aplicações ligadas à biotecnologia e à biomedicina. Dentre elas, evidencia-se a utilização de lentes de PMMA em substituição às córneas danificadas de pacientes que sofrem de catarata (ROBERT, 2005). Outra aplicação que merece destaque é a sua utilização em cimentações ósseas em pacientes que sofrem fraturas ósseas e necessitam reconstituição cirúrgica com preenchimento (RHO, 1993). Graças a estas características, o PMMA também é utilizado na fabricação de tintas acrílicas,

<sup>1</sup> Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/445746?lang=pt&region=BR>. Acesso em jun 2019.

para uso externo de alto desempenho, isto é, que necessitam de maior resistência física e química (NORDSTIERNA et al., 2010; NORDSTIERNA; MOVAHEDI; NYDÉN et al., 2011).

Além disso, o PMMA possui fraca degradação quando exposto aos raios UV. Isto ocorre porque o material absorve apenas resquícios de luz e radiação UV, dada sua transparência. A pequena quantidade de radiação absorvida não possui energia necessária para quebrar as ligações moleculares dentro do material. Esta é uma propriedade única para um polímero, e o torna especialmente adequado para resistência a intempéries em longo prazo. Por suas propriedades únicas, baixo custo e biocompatibilidade, o PMMA é considerado o acrílico mais importante comercialmente disponível (STRONG, 2000; OSSWALD, et al., 2006).

Devido a sua insolubilidade em água, para sua utilização em sistemas nanométricos sua dispersão exige a utilização de outro polímero para tornar a água e o PMMA compatíveis entre si. O Poli álcool vinílico (PVA) é um polímero sintético solúvel em água com alta hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Sua solubilidade depende do grau de hidrólise, de polimerização e da temperatura da solução. O PVA é largamente utilizado na indústria, por sua alta capacidade de absorção de água (KACZMAREK; PODGÓRSKI, 2007; GOODSHIP; JACOBS, 2009;). Ademais, é comumente utilizado como copolímero do PMMA para melhorar a sua eficácia de solubilização em água (NORDSTIERNA et al., 2010; NORDSTIERNA; MOVAHEDI; NYDÉN, 2011).

O PVA foi preparado pela primeira vez por Hermann e Haehnel em 1924, a partir da hidrólise de acetato de polivinila em etanol, em presença de hidróxido de potássio. O PVA é produzido comercialmente a partir de acetato de polivinila, geralmente por um processo contínuo. Os grupos acetato são hidrolisados por troca de éster com metanol na presença de metilato de sódio anidro ou hidróxido de sódio aquoso. As características físicas e seus usos funcionais específicos dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise (SAXENA, 2004).

Baseado no fato de que os nanossistemas de prata são mais empregados nas coberturas e que este material é tóxico (RAI, 2009; FIORI, et al., 2017), existe a busca por produtos eficazes, atóxicos, que impossibilitem a colonização fúngica em superfícies. O emprego de moléculas bioativas reservam grande apelo na indústria. Algumas destas moléculas, produzidas por microrganismos, exibem ação bioestática e biocida. Naturalmente são sintetizadas para função de inibição do crescimento de organismos competidores,

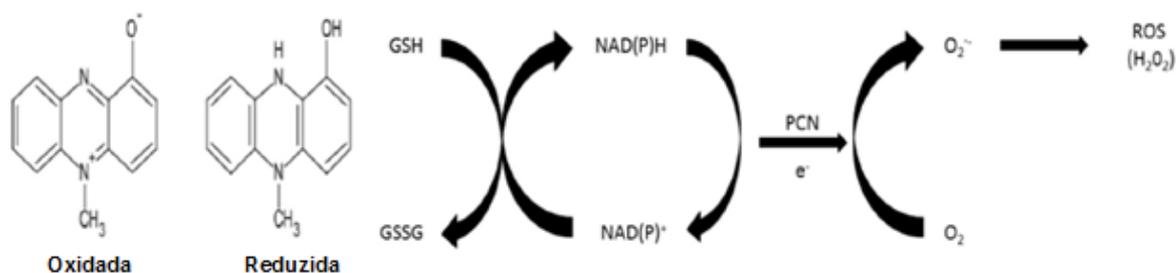
conferindo vantagem biológica ao produtor (AZEVEDO, 2012). Visto isto, a investigação da aplicação de metabólitos secundários microbianos se mostram potenciais para produção de novas coberturas.

#### 1.4 Piocianina

A piocianina é um pigmento fluorescente, de cor azul ou azul-esverdeado, produzido exclusivamente por 90-95% das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* funcionais (MAVRODI et al., 2001; VASCONCELOS; LIMA; CALAZANS, 2010). Sua produção está envolvida na participação da redução do íon  $Fe^{3+}$ , importante fator de crescimento para a bactéria (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014). Além disso, a piocianina possui outras duas importantes características: é o agente carreador de elétrons e possui natureza antimicrobiana, que garante o sucesso da espécie frente outras que possam coexistir com ela (SCHOENTAL, 1941; OZYUREK; GUR; BILKAY, 2011; MULLER; MERRET, 2014).

A atividade da piocianina está ligada à capacidade de produção de reações de óxido-redução e formação e acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio. Devido a sua capacidade de atravessar as membranas celulares, pode aceitar elétrons de agentes como NADPH e glutatona reduzida (Figura 6), além de promover o ciclo redox usando oxigênio como um aceptor de elétrons resultando na geração de (ROS), particularmente peróxido de hidrogênio, com resultante indução de estresse oxidativo e perturbação da homeostase redox intracelular (RADA; LETO, 2009; MULLER; MERRETT, 2014; JAMEEL et al., 2017). Portanto, os mecanismos da piocianina para as células procarióticas e eucarióticas estão relacionados à inibição da respiração celular (HASSAN; FRIDOVICH, 1980).

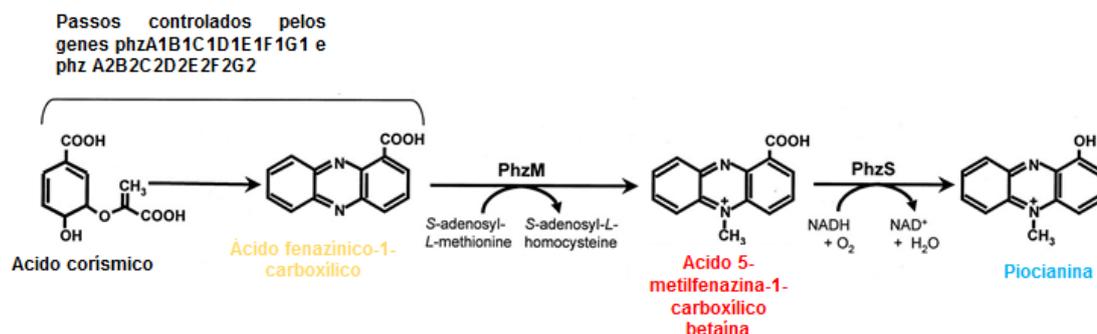
**Figura 6** – Estrutura química da piocianina oxidada e reduzida



Fonte: Modificado de Jameel et al., (2017)

A piocianina foi o primeiro composto fenazínico natural descrito na literatura. A molécula é formada por duas subunidades de N-metil-1-hidroxfenazina, tendo o ácido corísmico, como precursor. A Figura 7 ilustra a biossíntese da piocianina.

**Figura 7** – Passos da biossíntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Modificado de Mavrodi et al. (2001)

A conversão do ácido corísmico em ácido fenazino-1-carboxílico (PCA, de cor amarela) é controlado por sete genes identificados como *phz C, D, E, F, G, M* e *S* codificados por dois operons. Destes genes, *phzM* e *phzS* são os principais responsáveis pela conversão do PCA em piocianina, em dois passos. A primeira etapa, é catalisada pela enzima (*PhzM*), uma metil transferase dependente de S-adenosilmetionina, onde o PCA é convertido no ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína (de cor vermelha), pela transferência de um grupo metil para o átomo de nitrogênio do anel fenazínico. A segunda etapa é catalisada pela monooxigenase flavina dependente de FAD (*PhzS*), envolvendo a descarboxilação hidroxilativa da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína em 1-hidróxi-5-metil fenazina, isto é, piocianina (MAVRODI et al., 2001; GOHAIN; TOMASHOW; MAVRODI, 2006; JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

Para a obtenção de piocianina existem meios específicos que aumentam sua produção, ao passo que inibe a formação de outros pigmentos. Existem relatos que determinam as características e condições do meio de cultura que favorecem a produção de piocianina (BURTON et al., 1948; KARPAGAM et al., 2013; SUDHAKAR et al., 2013; EL-FOULY et al., 2015). Sabe-se que dependendo da densidade celular, a bactéria produz o pigmento e quando há um esgotamento de alguns nutrientes, há mais produção. Em condição laboratorial a piocianina é produzida abundantemente em meio com baixo teor de ferro e fosfato, sendo necessário após a produção do pigmento a posterior extração e purificação (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014; NAWAS; FEGHALI, 2018).

A piocianina demonstra atividade antibacteriana (WAKSMAN; WOODRUF, 1940) e antifúngica (KARPAGAM et al., 2013; EL- ZAWANY et al., 2016; JAMEEL et al., 2017). Além disso, o estudo de Saha et al., (2008) demonstra a possibilidade de sua utilização como corante alimentar com efeito antibacteriano contra bactérias patogênicas (SAHA et al., 2008). Na agricultura atuando como um fertilizante (BAESHEN, 2016); Na aquicultura quanto o seu potencial como agente antimicrobiano, sendo uma alternativa aos antibióticos hoje utilizados (PRIYAJA et al., 2017).

Diante do exposto, este trabalho visou uma nova aplicação ao composto, isto é a produção das nanopartículas de piocianina como agente antibiofilme em uma cobertura “antimofa”.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Produzir e caracterizar nanopartículas de piocianina e avaliar sua ação como uma cobertura antibiofilme fúngico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar fungos filamentosos de paredes de alvenaria;
- Determinar as concentrações: Inibitória Mínima e Fungicida Mínima da piocianina sobre os isolados;
- Produzir e caracterizar as nanopartículas de piocianina do ponto de vista físico-químico;
- Avaliar a formação do biofilme em corpos de prova com e sem a cobertura contendo piocianina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local da realização do trabalho

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) e Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia Industrial (LANNI) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

#### 3.2 Fungos filamentosos: Coleta

Os fungos foram coletados no dia 4 de maio de 2018 às 9h, de uma parede externa oeste de um dos blocos que compõem o Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Figura 8), localizado nas coordenadas  $-7^{\circ}14'13''\text{S}$   $-34^{\circ}84'66''\text{W}$ . Os dados meteorológicos dos cinco dias que antecederam a data da coleta foram consultados no sítio oficial do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

**Figura 8** – Vista parcial do Centro de Biotecnologia com destaque a parede de coleta



Fonte: Google Maps<sup>2</sup>.

As amostras da parede foram obtidas, sob condições assépticas, por raspagem, como descrito por Dias et al. (2016). Para isto, foram utilizados uma espátula e um molde de poliestileno, com abertura de 2 cm<sup>2</sup>. Foram obtidas amostras de cinco pontos, totalizando uma área de 10 cm<sup>2</sup> da parede (Figura 9). O material raspado foi transferido para frascos contendo

<sup>2</sup> Disponível em <https://www.google.com.br/maps/@-7.1431727,-34.8470019,127a,35y,8.43h,56.41t/data=!3m1!1e3>. Acesso em jun. 2019.

solução tampão fosfato estéril (pH=7,0), conforme especificações da ANVISA<sup>3</sup> composto por hidróxido de sódio (Química Moderna, São Paulo, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (Química Moderna, São Paulo, Brasil).

**Figura 9** – Aspectos da área de coleta



Crédito da imagem: o autor.

### 3.3 Isolamento e identificação dos fungos filamentosos

Com o intuito de obter o maior número de colônias e selecionar o melhor meio, 5 ml da solução tampão com o raspado foi aplicada e com movimentos circulares espalhados sob os meios sólidos: batata-dextrose ágar (BDA) (Batata 0,2%, Dextrose 0,02%, Ágar 0,02%) e ágar Sabouraud-dextrose 2% (Merck, Alemanha), previamente preparados em placa de petri, ocorrendo a incubação por 7 dias à 30°C. Realizado em duplicata.

Foram avaliados os diferentes padrões morfológicos (cor e aspecto das colônias) em placas de petri com ágar Sabouraud-dextrose 2%. Os isolados obtidos foram mantidos em incubação à 30° e posteriormente foi realizado o teste do crescimento radial durante 14 dias. O diâmetro da colônia foi mensurado com auxílio de um paquímetro a cada 48 horas.

A identificação dos isolados foi conduzida pela técnica da cultura em lamínula para visualização das estruturas vegetativas e reprodutivas. Em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud-Dextrose 2% foi inoculado pequenos fragmentos fúngicos. Em seguida foi inserida uma lamínula limpa e previamente flambada sobre os fragmentos fúngicos. As placas foram deixadas à temperatura ambiente e a cada 24 h durante 4 dias as lamínulas foram

<sup>3</sup> Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954708/Cap%C3%ADtulos+do+Volume+1+-+14+Reagentes.pdf/c1fec423-78c1-477c-91d9-6b95fd2401e2>. Acesso em maio. 2018.

retiradas e coradas com uma gota de azul lactofenol de algodão e em seguida observadas ao microscópio (ALVES; LOPES, 2008).

As espécies identificadas estão cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A6D0C2F (APÊNDICE A).

### **3.4 Piocianina e curva padrão**

O estudo utilizou piocianina com grau de pureza 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O pó liofilizado foi recomposto de acordo com instruções do fabricante, na forma de solução hidroalcoólica a 10%, preparada com etanol P.A. e água Milli-Q, após reconstituída, o frasco contendo o pigmento foi mantido sob congelamento.

Para a determinação da curva analítica, a solução reconstituída de piocianina foi utilizada como solução padrão (concentração de 5 mg/mL). A partir da solução padrão foram obtidas uma série de diluições 30;25;20;18;16;14;12;10;8;6;4;2;1 µg/mL. Em seguida, foram realizadas leituras das amostras, em triplicata, por espectrofotometria no comprimento de onda de 690 nm (IL 0082-Y-BI) para a construção da curva analítica (APÊNDICE B).

### **3.5 Ensaios microbiológicos**

#### **3.5.1 - Obtenção do inóculo**

O inóculo foi preparado a partir de culturas desenvolvidas em ágar Sabouraud-Dextrose 2%, incubadas a 30°C por 7-14 dias, para atingirem um bom crescimento. As suspensões dos conídios foram confeccionadas em 5 ml de solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v – Nova Química), adicionadas de 50 µL de Tween 80 (Neon, São Paulo, Brasil) com o intuito de melhorar a dispersão dos conídios. Em seguida, essas suspensões foram agitadas por 2 minutos em vortex (Warmnest, W28), e 50 µL foi transferido para câmara de Neubauer (Labor) e o inóculo foi padronizado por meio da contagem celular de modo a obter um valor de aproximadamente  $1-3 \times 10^6$  conídios/mL (CLSI, 2002).

#### **3.5.2 – Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).**

A determinação da CIM e da CFM da piocianina sobre os fungos foi realizada empregando a técnica da microdiluição descrita por Martins et al. (2014). Na placa de

microdiluição de 96 poços com fundo em U foram adicionados 100 µL do caldo Sabouraud-Dextrose 2%, duplamente concentrado. Posteriormente foram adicionados 100 µL da piocianina, e por meio de uma diluição seriada 1:2, foram obtidas as concentrações de piocianina numa faixa variando de 140 a 8,75 µg/mL. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo nas cavidades.

O sistema foi incubado à 30°C por 48 horas. A CIM foi descrita como a menor diluição na qual se verificou ausência de crescimento fúngico por inspeção visual (CAVALCANTI et al., 2011). Com o intuito de obter os dados da CFM, 10 µL dos poços que apresentaram a CIMx2, CIM e CIM÷2 foram transferidos para novas microplacas e após incubação à 30°C por 48 horas, A CFM foi descrita como o valor de piocianina do poço no qual se verificou ausência de turbidez, observada por inspeção visual.

Os controles do teste foram: (1) crescimento do fungo em caldo: 100 µL do Sabouraud-Dextrose 2% e 10 µL do inóculo; e (2) controle do meio de cultura. O teste foi realizado em duplicata.

### **3.6 - Preparação das nanopartículas**

As nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação (precipitação de polímeros pré-formados), conforme descrito por Fessi et al., (1989), com adaptações. Esta técnica envolve a mistura de uma fase orgânica em outra aquosa. A fase aquosa foi composta pelo copolímero álcool polivinílico (PVA) (Sigma Aldrich, St Louis, USA) e água destilada. A fase orgânica constituiu-se do polímero polimetilmetacrilato (PMMA) (Sigma Aldrich, St Louis, USA), acetona (solvente orgânico) e piocianina.

Após a dissolução dos constituintes, com auxílio de placa agitadora (Fisatom, 752) e (Fanem, 258) verteu-se a fase orgânica na fase aquosa, com auxílio de seringa, por gotejamento. A suspensão resultante foi levada ao rotaevaporador (Buchi R3), sob pressão reduzida para obter o volume de 10 mL. Nanopartículas brancas, isto é, sem piocianina também foram preparadas.

Foram preparadas oito formulações (Quadro 1), aquelas com os melhores aspectos, definidos de acordo com a precipitação, tiveram os seguintes parâmetros avaliados: pH, tamanho de partículas, polidispersão (PDI), eficiência de encapsulamento, características microscópicas e macroscópicas.

**Quadro 1** – Estudo de pré-formulação dos nanossistemas.

<b>Formulação</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>	<b>F6</b>	<b>F7</b>	<b>F8</b>
<b>PMMA</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Pluronic F68</b>	X							
<b>Tween80</b>		X						
<b>Span</b>		X						
<b>PVA – 0,08 g</b>								X
<b>PVA – 0,1 g</b>			X	X	X			
<b>PVA – 0,2 g</b>						X	X	
<b>Água destilada</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Acetona</b>	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Resultado</b>	ppt.	ppt.	ppt.	ppt.	ppt.	ppt*	ppt*	ppt.

ppt : Precipitado, \* formação de menos precipitação, comparado aos demais

### 3.6.1 - Ensaios *in vitro* da formação do biofilme: corpos de prova imersos

Foram avaliadas as fases planctônicas e sésil sobre um corpo de prova de dolomita, caracterizado por difração de raios X no Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello – CENPES/PETROBRAS/UFRJ (APÊNDICE C).

Para a avaliação da fase sésil, foi empregada uma metodologia similar aos ensaios baseados em aderência (VAN DIJCK et al., 2018) com adaptações. A formação do biofilme foi avaliada nas condições do corpo de prova coberto com nanopartículas com piocianina, e nanopartículas brancas, e controle, isto é, apenas o inóculo, sem a cobertura-teste. A aplicação das nanopartículas aconteceu com o auxílio de uma pipeta de pasteur, recobrindo toda a superfície do corpo de prova sendo deixadas para secagem em temperatura ambiente por um período de 48 horas. Após isso, os corpos de prova de dolomita foram assepticamente depositados no fundo de recipientes de polipropileno (Derkplás, São Paulo, Brasil), esterilizados com radiação ionizante, com capacidade para 50 mL, contendo 18 ml caldo Sabouraud-Dextrose 2% (diluído a 1/10 da composição original). Em seguida foram transferidos 2 mL da suspensão do inóculo, preparada conforme o tópico 3.5.1. Os sistemas foram incubados à 30°C por 72 horas. O ensaio realizado em duplicata.

A quantificação celular foi realizada pela técnica do Número-Mais-Provável (NMP), da série de 10 tubos (APHA, AWWA, WEF, 2012). Para as células planctônicas, 1 mL foi transferido para tubos de ensaio, sofrendo diluições decimais até  $10^{-3}$ . Após, 100  $\mu$ L de cada

tubo foram transferidos para poços em placas de microdiluição, contendo 100 µL de caldo Sabouraud-Dextrose 2%, duplamente concentrado. As placas foram incubadas por 48 horas à 30°C e o número de poços que apresentaram turbidez foram contados e comparados à Tabela de Hoskins para obtenção do NMP por 100 µL/cm<sup>2</sup> de amostra. O ensaio foi realizado em duplicata.

Para quantificação das células sésseis, aderidas à superfície do cupom de dolomita, a face em contato com a fase líquida foi asséptica e cuidadosamente raspada com pinça previamente autoclavada para um recipiente estéril contendo 10 mL de solução salina 0,9%. Seguida de agitação manual por 2 minutos, a amostra foi diluída até 10<sup>-3</sup> e tratada como descrito para as células planctônicas, incluindo as condições de incubação. O ensaio realizado em duplicata.

### **3.6.2 - Ensaios *in vitro* da formação do biofilme: corpos de prova não imersos**

Os ensaios ocorreram em placa de Petri esterilizada, contendo um disco de papel de filtro umidificado com 5 mL de água destilada estéril. Os corpos de prova de dolomita foram inseridos sob o papel de filtro. À superfície lateral dos corpos de prova foram espalhados 100 µL de caldo Sabouraud-Dextrose 2% e em seguida, transferiu-se 10 µL da suspensão de conídios, preparada como descrita no tópico 3.5.1. Os sistemas foram incubados à 30°C por 72 h, quando foram avaliados por inspeção visual da presença das colônias.

Os corpos de prova foram testados nas condições: revestidos com nanopartículas de piocianina, revestidos com as nanopartículas sem piocianina (branco) e sem cobertura. O ensaio foi realizado em duplicata

## **3.7-Análises físico-químicas e avaliação da estabilidade das nanoestruturas**

### **3.7.1 Morfologia, tamanho e distribuição da partícula.**

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) e Laboratório de Solidificação Rápida (LSR) da UFPB.

O tamanho médio e a distribuição das partículas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons utilizando um analisador de partículas Zetasizer nano ZS 90® (Malvern). Esses parâmetros foram analisados a 25°C.

A morfologia das nanopartículas sem o pigmento (branca), e com o pigmento foi observada através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Zeiss Leo 1430).

### 3.7.2 Determinação do potencial Zeta

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Materiais e Biosistemas da UFPB (LAMAB-UFPB). A carga de superfície eletrostática das partículas foi determinada a partir da mobilidade eletroforética através do analisador do potencial zeta (Malvern ZS 90®).

### 3.7.3 Estabilidade dos sistemas

O teste de estabilidade teve por objetivo estabelecer a durabilidade das preparações. Nestes testes foram avaliadas as condições das nanopartículas logo após a produção em intervalos de tempos regulares (0, 7, 15, 30, 45 e 60, 90 dias). No mesmo período foi determinado o pH das suspensões de nanopartículas (Tecnopon, mPA 210).

### 3.7.4 Determinação da taxa de encapsulação da molécula nas nanopartículas

Para determinação da taxa de encapsulação foi utilizado o método da ultrafiltração-centrifugação das nanopartículas (LIMA; ALBUQUERQUE, 2012). A concentração total da nanopartícula de piocianina foi determinada pela dissolução das nanopartículas em água destilada. Após, foi retirado 1 mL da formulação e inserido em balão volumétrico de 10 ml, completando o volume com água destilada. Em seguida a mistura foi homogeneizada em ultrassom (CD-3800, RM TecnoBrasil) por 15 minutos e posteriormente, levada à centrifugação a 4000xg por 40 minutos (CENTRIBIO 80-2B). A quantidade de piocianina no sobrenadante foi estimada por espectroscopia no ultravioleta (Espectrofotômetro IL 0082-Y-BI) no comprimento de onda ( $\lambda$ ) 690 nm.

A concentração da piocianina livre, ou seja, não associada às nanopartículas, foi determinada a partir do filtrado do sobrenadante das nanopartículas resultante do processo de centrifugação. O produto foi obtido após passagem do sobrenadante em filtro millipore (Chromafil – 0,45  $\mu$ m). A quantidade de piocianina foi estimada por espectrofotometria à 690 nm.

A quantidade de molécula encapsulada (EE) foi obtida pela diferença entre a quantidade total dosada na formulação e aquela do filtrado obtido após centrifugação, dividida pela concentração inicial, a qual o nanossistema foi produzido, vezes 100 (Equação 1).

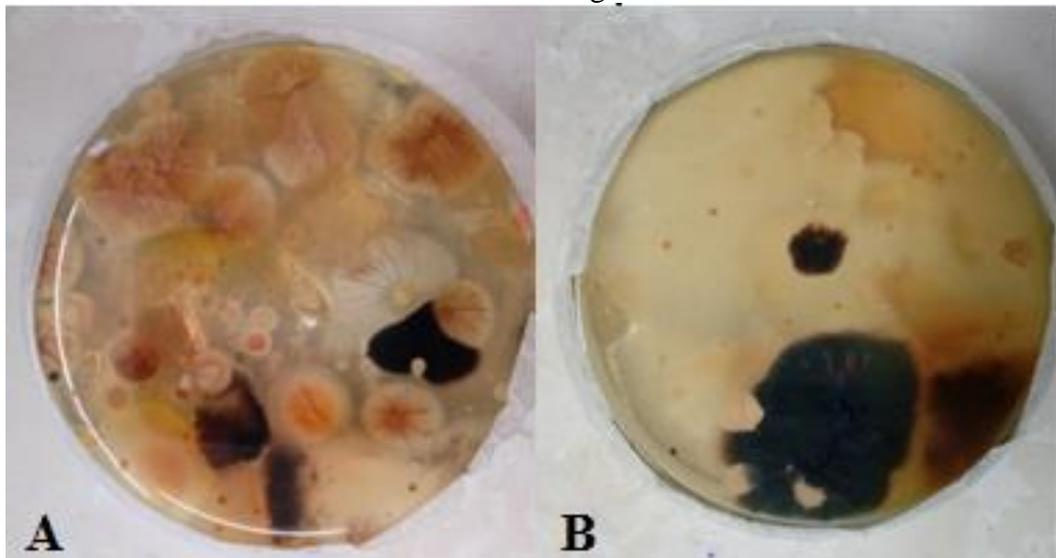
$$EE = \frac{\text{Concentração total} - \text{Concentração livre}}{\text{concentração inicial}} \times 100 \%$$

## 4. RESULTADOS

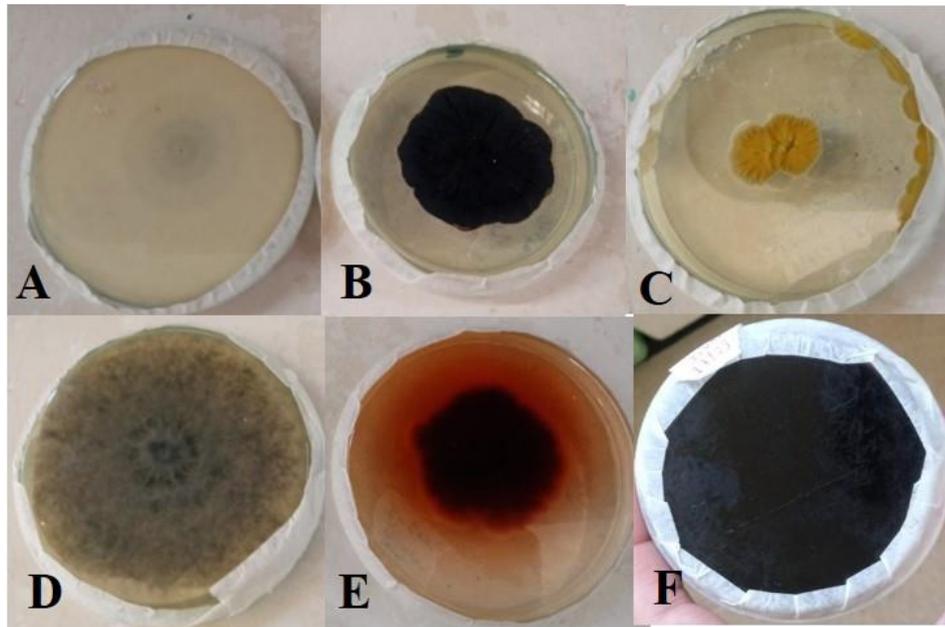
### 4.1 Fungos filamentosos

Inicialmente diferentes colônias se desenvolveram no meio de isolamento (Figura 10). Posteriormente, os fungos mais proeminentes nas placas foram isolados e identificados (Figura 11). As médias da temperatura e umidade no período de cinco dias anteriores a coleta, foram respectivamente 25,7°C e Umidade 84,1 g/m<sup>3</sup>. Estes valores são propícios para o desenvolvimento de fungos.

**Figura 10** – Colônias fúngicas da parede externa do prédio anexo do Centro de Biotecnologia da UFPB

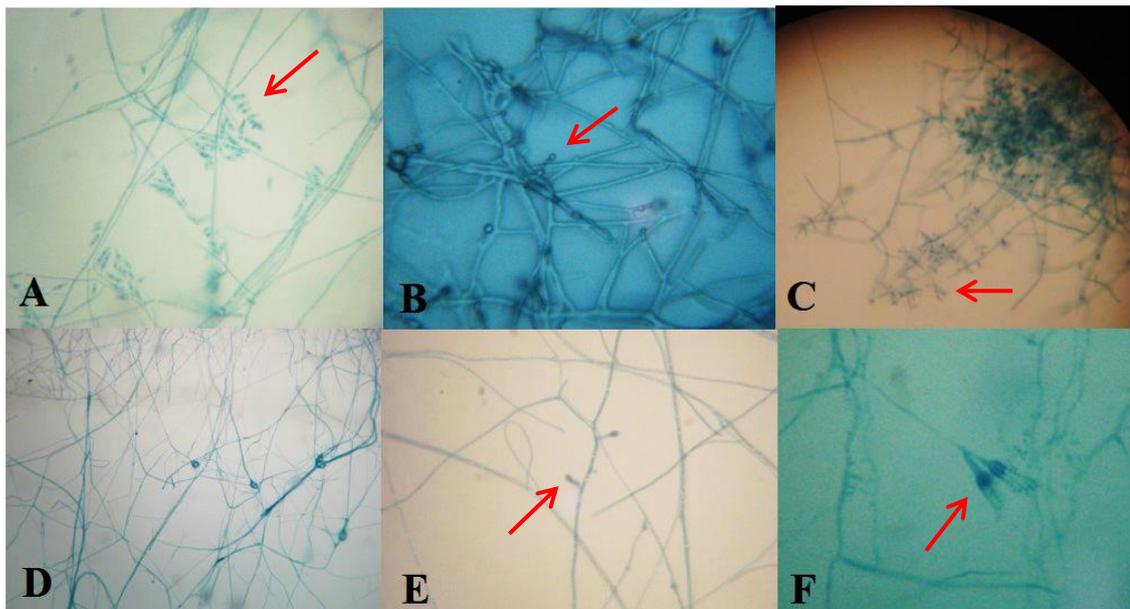


A - Diversidade fúngica em Ágar Sabouraud. B – Diversidade fúngica em Ágar batata-dextrose.  
Crédito da imagem: o autor.

**Figura 11** – Isolados fúngicos

A – *Trichoderma* sp, B – *Tricophyton* sp. C – *Penicillium* sp. D – *Trichoderma* sp. E – *Fusarium* sp. F – *Aspergillus niger*. (Crédito da imagem: o autor).

Análises por microscopia das estruturas citomorfológicas permitiram determinar que os isolados pertencem a 5 diferentes gêneros. Foram identificados dois fungos do gênero *Trichoderma*, um *Aspergillus niger* e um isolado membro dos seguintes gêneros: *Penicillium* sp.; *Fusarium* sp. e *Tricophyton* sp. (Figura 12).

**Figura 12** – Aspectos microscópicos dos isolados fúngicos

A – *Fusarium* sp., B – *Trichoderma* sp. (isolado 1), C – *Trichoderma* sp. (isolado 2), D – *Tricophyton* sp. (aspecto das hifas em espiral), E – *Tricophyton* sp. (conídios), F – *Penicillium* sp. As setas indicam as estruturas reprodutivas das espécies. Crédito da imagem: o autor.

#### 4.2 Atividade Biológica (CIM e CFM)

A piocianina mostrou atividade frente a dois isolados (*Aspergillus niger* e *Penicillium* sp.) dos seis obtidos da parede. A concentração inibitória mínima foi 140 µg/mL em *A. niger* e *Penicillium* sp. (Tabela 1). Em seguida, submetidas ao teste para verificação da concentração fungicida mínima, ambas isolados se desenvolveram no meio (Tabela 2), sugestivo de que a piocianina na concentração testada apresentou apenas um efeito fungistático. Com estes dois isolados, os ensaios da formação do biofilme foram conduzidos.

**Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima da piocianina frente isolados fúngicos

Fungo	Piocianina (µg/mL)	Controle 1	Controle 2
<i>Aspergillus niger</i>	140	-	+
<i>Penicillium</i> sp.	140	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	>140	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	>140	-	+
<i>Tricophyton</i> sp.	>140	-	+
<i>Fusarium</i> sp.	>140	-	+

Controle 1: só meio; Controle 2: meio e espécie / +: indica crescimento

**Tabela 2** – Concentração Fungicida Mínima da piocianina frente isolados fúngicos

Fungo	Piocianina (µg/mL)	Controle 1	Controle 2
<i>Aspergillus niger</i>	>140	-	+
<i>Penicillium</i> sp.	>140	-	+

Controle 1: só meio; Controle 2: meio e espécie / +: indica crescimento

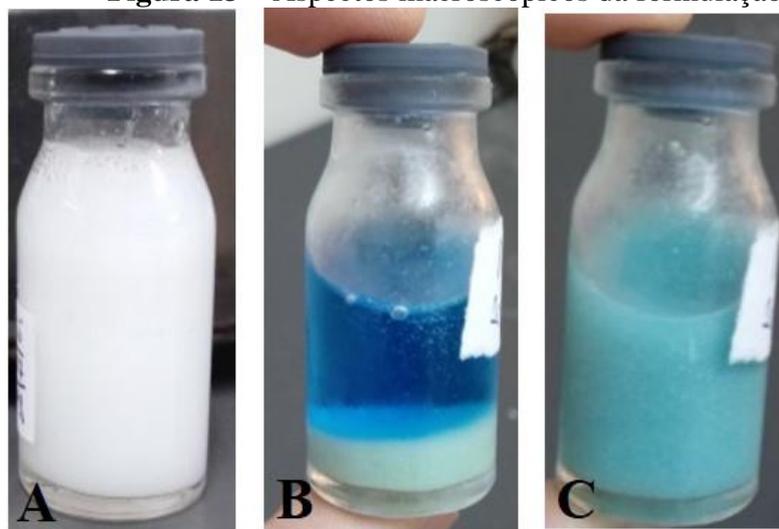
#### 4.3 Formulação e Caracterização das Nanopartículas

Como apresentado no Quadro 1 (vide folha 34 desta Dissertação), a partir da formulação F3 foi observado menor quantidade de precipitação, em razão da presença do copolímero PVA. Dentre as 8 formulações produzidas, as de melhor aspecto macroscópico foram as que continham 0,2 g PVA e 0,1 g de PMMA (formulações F6 e F7) (Figura 13. A).

Em seguida, os nanossistemas contendo piocianina foram formulados (Figura 13. B e 13. C). Esta formulação é de caráter inédito, não havendo na literatura, registro de sua produção. Foi realizado o depósito da patente no INPI, número do processo: BR 10 2019 016732 7, em 13 de agosto de 2019 (APÊNDICE D).

Os nanossistemas com piocianina foram produzidos com a concentração de 200  $\mu\text{g/ml}$  de piocianina, valor superior ao avaliado no teste do CIM, tentando garantir um efeito fungicida. A melhor taxa de eficiência de encapsulação da nanopartícula com piocianina foi registrada em 56 %.

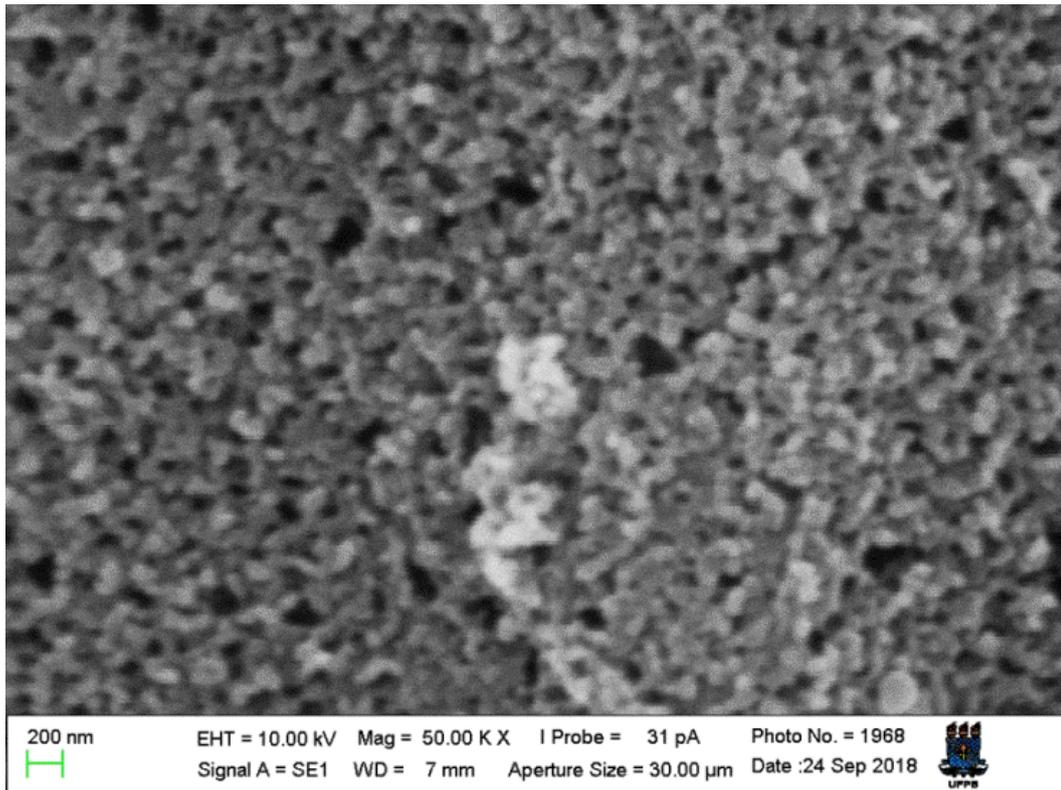
**Figura 13** – Aspectos macroscópicos da formulação



A - Sem piocianina, B - Com piocianina – sistema estático, C – Com piocianina homogeneizado. Crédito da imagem: o autor

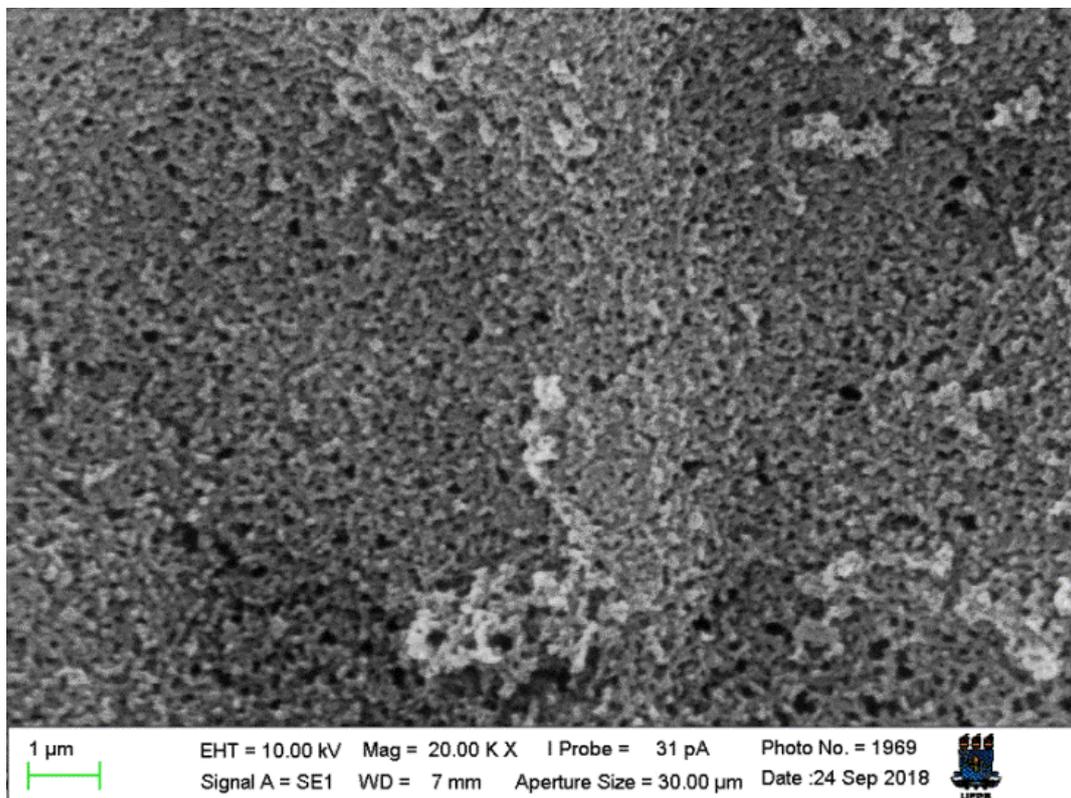
Os aspectos microscópicos das nanopartículas branca e com piocianina revelaram uma homogeneidade como observado nas Figuras 14 a 17. As micrografias auxiliaram uma melhor visualização da distribuição das nanopartículas quando dispostas sob um substrato.

**Figura 14** – Aspectos da nanopartícula branca na escala nanométrica



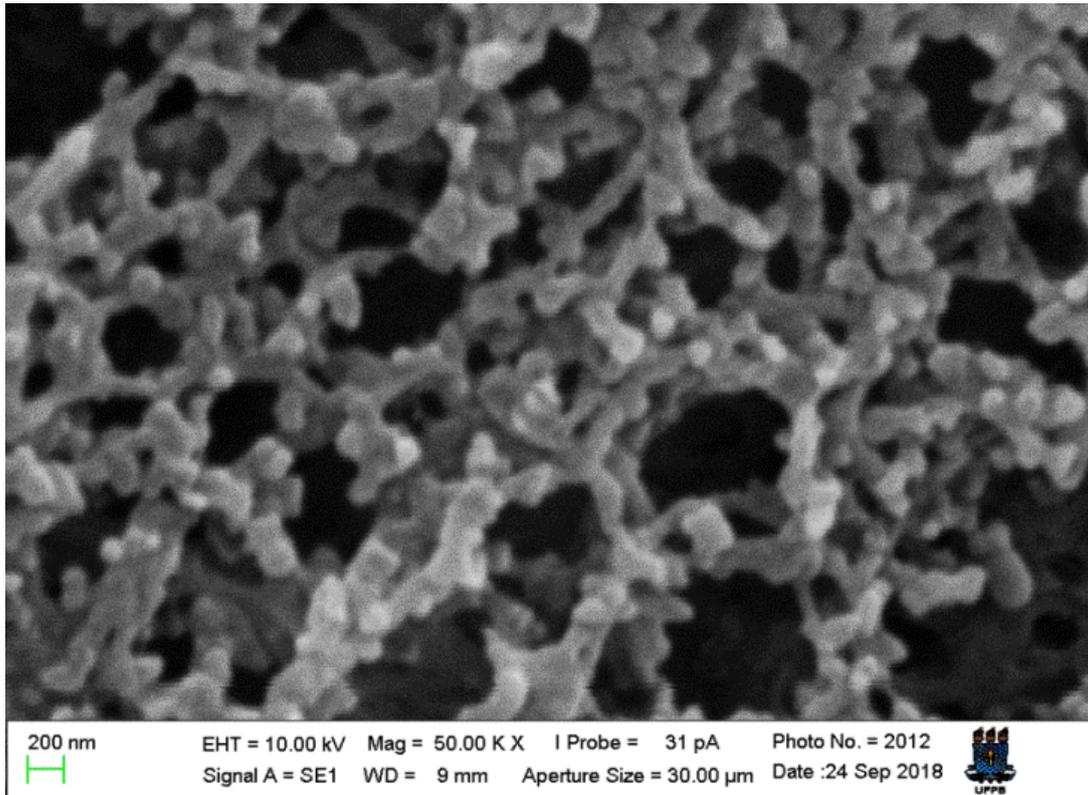
Crédito da imagem: o autor

**Figura 15** – Aspectos da nanopartícula branca na escala micrométrica



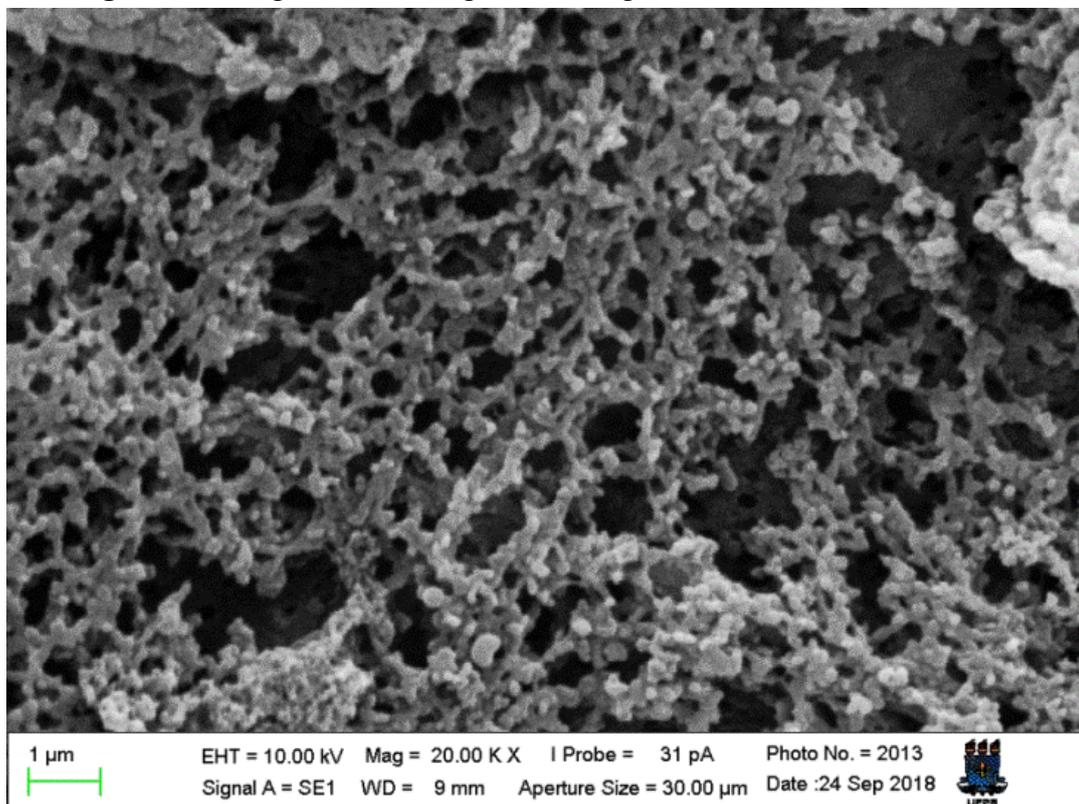
Crédito da imagem: o autor

**Figura 16** – Aspectos da nanopartícula de piocianina na escala nanométrica



Crédito da imagem: o autor

**Figura 17** – Aspectos da nanopartícula de piocianina na escala micrométrica.



Crédito da imagem: o autor

#### 4. 4 - Ensaio de caracterização e estabilidade das nanopartículas

Ao longo de 3 meses, foi observado a manutenção das condições macroscópicas, com aparência heterogênea quando o sistema permanecia estático, porém logo ao agitar o sistema homogeneizava, não foi observado nenhum tipo de contaminação durante o período de análise. O pH se manteve numa média de 6,41 para as nanopartículas brancas e 6,17 para as nanopartícula de piocianina, cuja última medição foi de 6,39 para o branco e de 6,21 para as nanopartículas de piocianina (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3** – Características das nanopartículas brancas ao longo de 90 dias

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Aspectos macroscópicos</b>	<b>pH</b>
0	Coloração branca, leitosa, homogênea	6,42
7	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,42
15	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,42
21	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,42
30	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,45
60	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,41
90	Coloração branca. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,39

**Tabela 4** – Características das nanopartículas de piocianina ao longo de 90 dias

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Aspectos macroscópicos</b>	<b>pH</b>
0	Azul, leitosa, com precipitados.	6,14
7	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,18
15	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,14
21	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,18
30	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,18
60	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,22
90	Coloração azul. Presença de duas fases. Ao agitar homogeneiza.	6,21

As tabelas 5 e 6 demonstram os valores da análise das nanopartículas quanto ao seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta em um período de 90 dias, parâmetros que são importantes para verificação da estabilidade das formulações de acordo com o tempo.

**Tabela 5** – Caracterização das nanopartículas brancas ao longo de 90 dias

<b>Dia</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>PZ</b>
0	2738,3	0,282	-7,76
15	2913,6	0,421	-5,72
30	2867,6	0,425	-7,53
60	2495,3	0,377	-5,85
90	3114,3	0,748	-5,33

**Tabela 6** – Caracterização das nanopartículas de piocianina ao longo de 90 dias

<b>Dia</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>PZ</b>
0	668,7	0,337	-5,35
15	621,8	0,530	-4,40
30	581,9	0,575	-5,18
60	595,3	0,578	-5,33
90	593,8	0,513	-5,37

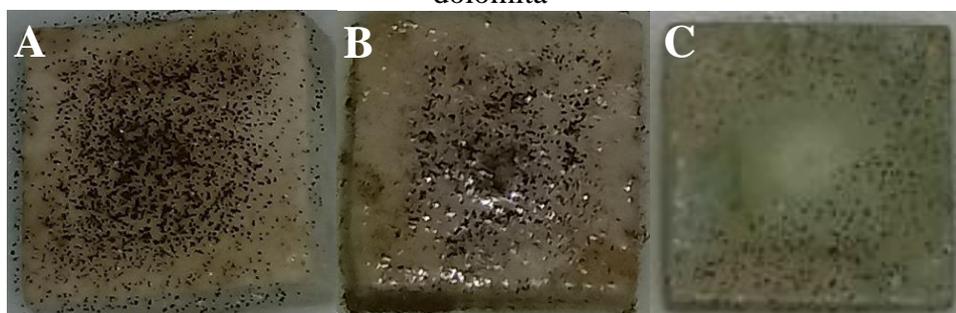
#### **4.5-Ensaio *in vitro* da formação do biofilme: corpos de prova imersos**

Nos sistemas submersos a ação da cobertura de nanopartículas de piocianina não se demonstrou eficaz para *A. niger* e *Penicillium* sp. Houve grande agregação celular no corpo de prova de dolomita, entre 3,6 e  $> 23 \times 10^4$  NMP/100 $\mu$ L/cm<sup>2</sup> para *A. niger* e entre 16 e  $> 23 \times 10^3$  NMP/100 $\mu$ L/cm<sup>2</sup> para *Penicillium* sp. Ressalta-se que na fase planctônica, a biomassa também foi elevada, sendo verificado turbidez em todos os poços avaliados.

#### 4.6-Ensaio *in vitro* da formação do biofilme: corpos de prova não imersos

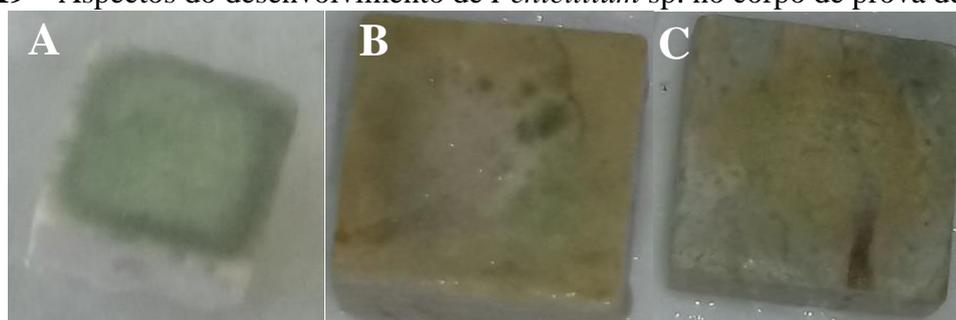
Nos corpos de prova não imersos, ambos isolados não se desenvolveram na parte central da peça, na qual a cobertura contendo nanopartículas de piocianina foi aplicada. Nas Figuras 18 e 19 é possível observar que as colônias foram formadas nas bordas, onde foram inoculadas. Comparadas com o controle, foi observada uma redução na colonização fúngica nos corpos de prova de dolomita. Neste ensaio foi simulado uma condição rica em matéria orgânica. Buscando uma simulação de pouca matéria orgânica disponível (caldo Sabouraud-dextrose 2% preparado a 1/10 da composição original), não houve crescimento.

**Figura 18** – Aspectos do desenvolvimento de *Aspergillus niger* no corpo de prova de dolomita



A – controle. B- nanopartícula branca. C- nanopartículas de piocianina.  
Crédito da imagem: o autor

**Figura 19** – Aspectos do desenvolvimento de *Penicillium* sp. no corpo de prova de dolomita



A – controle, B- nanopartícula branca, C- nanopartículas de piocianina.  
Crédito da imagem: o autor

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificados cinco gêneros de importância clínica e ambiental: *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Tricophyton* e *Aspergillus*. Todos estes organismos são considerados anemófilos, isto é, possuem a capacidade de dispersão pelo ar. Além disso, os membros dos cinco gêneros podem desenvolver biofilmes como estratégia de sobrevivência em condições desfavoráveis, de modo a possuir uma captura mais eficiente de nutrientes, garantindo a sua manutenção (HARDING, 2009). Os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* são comumente descritos como colonizadores de superfícies de concreto e rochas (GAYLARDE; MORTON, 1997; ADELEYE; ADELEYE, 2000; MITCHELL; GU, 2000; GAYLARDE; GAYLARDE, 2005; SHIRAKAWA et al., 2010).

Algumas espécies destes fungos podem danificar as estruturas, as quais estão aderidos, incluindo paredes. A biodeterioração ocorre em função da produção de ácidos biogênicos e da penetração superficial de hifas (DE LA TORRE et al., 1993; GU et al., 1998). Como relatado por Sterflinger (2000), vários gêneros, incluindo *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, produzem ácidos orgânicos, tais como acético, glucurônico e oxálico como subproduto do metabolismo. E esses podem danificar o concreto e rochas por meio da formação de complexos de cálcio insolúveis, que se precipitam da estrutura, resultando em perda de massa e aumento da permeabilidade e porosidade (GU et al., 1998). Além do aspecto estético, uma constante exposição a fragmentos fúngicos pode ocasionar doenças relacionadas ao sistema respiratório, visto que são partículas facilmente respiráveis, bem como aumenta as chances de sensibilização alérgica (ADAN; SAMSON, 2011; KHAN; KARUPPAYIL, 2012). Além disso, também foi descrito em nossa análise o gênero *Tricophyton* sp., que é comumente relacionado com dermatofitoses (SAHOO, 2016).

Sabendo disso, foi avaliado o efeito da piocianina que é um metabólito secundário produzido pela *P. aeruginosa*, a qual confere qualidades de resistência e virulência sob outros organismos, incluindo fungos filamentosos (VASCONCELOS et al., 2010). A produção de piocianina é um exemplo de molécula produzida também como agente relacionado à antibiose e amensalismo (GHOUL; MITRI 2016; JAMEEL et al., 2017). Em competição por nutrientes e espaço vital, dois organismos podem sintetizar substâncias de diversas naturezas, como enzimas, ácidos orgânicos, toxinas e pigmentos, entre outros, para que o seu competidor tenha crescimento ou metabolismo, perturbados, seja por um efeito biocida, seja por um efeito bioestático (BLANCHARD; LU, 2015; CRAY, et al, 2013). Assim, produzindo piocianina, *P. aeruginosa* pode garantir vantagens frente demais organismos (BARON; ROWE 1981).

Sabe-se que esta atividade envolve diferentes mecanismos, de modo que a *P. aeruginosa* se beneficia por interromper a estabilidade ou eliminar potenciais concorrentes (PRICE-WHELAN et al., 2007). O provável mecanismo antimicrobiano da piocianina ocorre em nível da cadeia respiratória e rompimento do mecanismo de transporte ativo pela membrana. Acredita-se também que o pigmento pode causar uma diminuição no suprimento de oxigênio para as células, levando ao acúmulo de superóxido e peróxido de hidrogênio (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

Nesse estudo foi observado o seu perfil bioestático contra *A. niger* e *Penicillium* sp. na concentração de 140 µg/mL. De modo similar Sudhakar et al., (2013) relataram a piocianina como inibitória das espécies *A. flavus* e *A. fumigatus* na concentração de 64 µg/mL. Além disso, Karpagam et al., (2013) relataram sua atividade antifúngica contra *Candida* sp., e *Cryptococcus neoformans* e demonstrou que sua atividade bioativa está ligada com a sua capacidade em interromper a cadeia transportadora de elétrons. Na mesma concentração não foi observado este efeito nas demais espécies isoladas, dentre elas o isolado *Tricophyton* sp. Outro estudo indica que a atividade inibitória da piocianina neste gênero, representado por *Tricophyton rubrum* foi de 2000 µg/mL (EL-ZAWANY; ALI, 2016).

Já as espécies do gênero *Trichoderma*, também isolado neste estudo, são considerados fungos de vida livre, de comum ocorrência no solo e rizosfera. Além disso, há décadas estes fungos são conhecidos por produzirem uma ampla gama de substâncias antibióticas, além da característica como parasitas de outros fungos (DENNIS; WEBSTER 1971; WOO et al., 2006). Afzal et al., (2013) demonstraram em seu estudo, a associação entre uma espécie do gênero *Trichoderma* com *P. aeruginosa*, como agente de biocontrole endofítico, suprimindo a infecção de fungos nas raízes dos vegetais estudados, melhorando o seu crescimento. Porém, nas bases de dados consultadas não foi visto estudos que demonstram apenas o papel da piocianina sobre este gênero.

Ainda no mencionado trabalho de Afzal et al. (2013), foi observado um efeito antagônico entre algumas linhagens de *P. aeruginosa* e espécies de *Fusarium* sp. E no estudo de Patil et al., (2017) demonstraram que em 100 µg/ml não foi observado a ação da piocianina sobre *Fusarium* sp.

Sabendo da ação bioestática da piocianina em duas espécies fúngicas isoladas, foram formuladas nanopartículas poliméricas contendo a piocianina na concentração de 200 µg/mL, posteriormente avaliada com relação à sua ação com cobertura antifúngica em um corpo de prova de dolomita. O nanossistema tem o objetivo de prolongar a proteção do revestimento ao

diminuir a velocidade de liberação de biocidas de maneira controlada, os protegendo de lixiviação como demonstrado em estudos similares (NORDSTIERNA, et al. 2010; JÄMSÄ et al., 2013; ERICH et al., 2016).

As nanopartículas foram obtidas empregando o método de nanoprecipitação, amplamente utilizado na produção de nanopartículas para carreamento de substâncias ativas. Nele, é possível associar ativos hidrofílicos e hidrofóbicos (RAO; GECKELER, 2011). Sendo realizado inicialmente um estudo de pré-formulação para verificar os melhores aspectos e condições para a produção do nanossistema. Com a utilização do Pluronic F68, foi observado à presença de precipitação. O composto é um copolímero de bloco à base de óxido de etileno e óxido de propileno. Ele pode funcionar como adjuvante com diferentes funções: antiespumante, molhante, dispersante, espessante e emulsificante (SANTANDER-ORTEGA et al., 2006; TORCELLO-GÓMEZ et al., 2011). Porém foi observado que não era o melhor copolímero para ser utilizado com o PMMA.

Sabendo da hidrofobicidade do PMMA, componente da fase orgânica da formulação, foi verificado que a utilização do PVA como copolímero melhorou a sua solubilização em água, fato corroborado pelos estudos de Nordstierna et al., (2010) e Nordstierna; Movahedi; Nydén (2011). Os autores observaram que a presença de um estabilizador é de grande importância para evitar a formação de agregados e fornecer estabilidade às nanopartículas durante a nanoprecipitação.

De maneira pioneira, foram desenvolvidas formulações de nanopartículas contendo piocianina. Sua taxa de encapsulação foi registrada em 56%, essa taxa de encapsulação é considerada baixa, visto que estudos que utilizam o mesmo polímero para produção de nanopartículas obtiveram melhores taxas de encapsulação, como o de Lekshmi et al., (2010) que obteve as proporções de 65,8%, 82% e 90,4% de aprisionamento de fármaco às partículas. Como a piocianina é considerada um pigmento solúvel em água isso pode ter contribuído para sua perda para a fase aquosa durante o processo de produção, como relatado previamente na literatura para moléculas com mesma característica (NIWA et al., 1993). Os autores atribuíram o decréscimo do encarceramento do fármaco a um aumento do seu vazamento para a fase aquosa. A determinação da taxa de encapsulação tem por objetivo, demonstrar a eficiência do sistema em carreamento da substância ativa, e foi demonstrado que a formulação é eficiente para associar a piocianina a estrutura polimérica, porém com a necessidade de aperfeiçoamento da formulação, com o intuito de aumentar a capacidade de ligação entre a piocianina e o polímero.

A análise da estabilidade e caracterização dos nanossistemas revelou bons parâmetros, demonstrando uma excelente forma quando dispostas em superfície como foi possível observar nas imagens por microscopia eletrônica de varredura. A avaliação da estabilidade de nanossistemas é um estudo essencial, pois leva em consideração fatores como a possível alteração proveniente de aditivos externos acrescentados à formulação, bem como a interação química entre os ativos veiculados com os componentes da formulação, os quais podem sofrer modificações com o tempo de estocagem, a qual a formulação venha a ser submetida. Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões nanoparticuladas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo (SCHAFFAZICK, et al., 2003)

Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero, bem como a sua diminuição, em um curto período de tempo, pode ser atribuída à hidrólise do polímero (GUTERRES et al., 1995; PAUL et al., 1997), como foi visto nos nanossistemas brancos em que os valores de pH não variaram de forma expressiva, houve apenas uma leve diminuição do pH após 90 dias da sua preparação. Por outro lado, nos nanossistemas contendo piocianina observou-se um ligeiro aumento do pH, que pode estar relacionado ao seu caráter alcalino (OHFUJI et al., 2004). Os resultados demonstram que não houve uma grande alteração no pH, permitindo a produção de um sistema estável.

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é um indicador útil da carga superficial líquida da partícula e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. O  $\zeta$  é definido como o potencial eletrocinético da fronteira hidrodinâmica do plano de cisalhamento de uma carga da partícula adjacente para uma superfície expostas em um líquido (WONGSAGONSUP et al., 2005). Este potencial reflete a carga efetiva nas partículas e se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão. Geralmente, consideram-se valores de  $\zeta$  superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV. Tais valores conferem uma estabilidade à suspensão, uma vez que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força de repulsão supera a tendência natural à agregação. O  $\zeta$  das nanopartículas produzidas ficou na faixa de -5,126 mV e -6,430 mV para as nanopartículas de piocianina e as nanopartículas brancas, respectivamente. Esse valor encontra-se abaixo, com relação a formulações que utilizam outros polímeros. Porém, não foi possível a comparação com formulações que utilizam o mesmo polímero, visto que nas bases de dados consultadas não foi observado a utilização desse parâmetro para verificação da estabilidade.

O tamanho de partícula é frequentemente usado para caracterizar nanopartículas, porque facilita a compreensão da posterior dispersão e agregação (DUANE et al., 2000). Os tamanhos das nanopartículas de piocianina obtiveram a média de 612,3 nm, enquanto as nanopartículas brancas 2825,90 nm. Em estudos similares que utilizaram o PMMA como polímero foi observado a existente variação entre o tamanho nano e micrométrico (LOXLEY; VINCENT, 1998; AUBRY et al., 2009; NORDSTIERNA et al., 2010; SIDDIQUI et al., 2018). A diminuição no tamanho dos nanossistemas com piocianina com relação aos nanossistemas brancos pode estar ligada à sua incorporação na fase orgânica junto ao PMMA, a qual pode diminuir a viscosidade dessa fase facilitando a difusão para a fase aquosa, levando a uma diminuição na formação de gotículas, diminuindo o tamanho médio (AUBRY et al., 2009).

A partir do valor de PDI determinado, é possível constatar a obtenção de um sistema monodisperso, com alta homogeneidade na população de partículas, sugerindo uma distribuição de tamanho monomodal, uma vez que a literatura aponta em uma escala de 0 a 1, que as formulações com valores abaixo de 0,3 apresentam esta característica (LIU et al., 2009). Por outro lado, valores altos de PDI sugerem uma distribuição de tamanho mais amplo ou polimodal (GAUMET et al., 2008).

Os valores de PDI apresentaram variação conforme o tempo. Na nanopartícula branca foi verificada uma variação entre 0,282 a 0,748. Por outro lado, nas nanopartículas contendo piocianina, o parâmetro variou entre 0,337 a 0,578, demonstrando que ao longo do tempo ocorreu o aumento da agregação das partículas, levando ao aumento do PDI. Isso pode ocorrer devido ao caráter hidrofóbico de PMMA. Nos sistemas aquosos, esse material tipicamente surge como discutido por Nordstierna et al., (2010).

Quanto a cobertura contendo as nanopartículas com piocianina, observou-se uma redução na colonização de *A. niger* e *Penicillium* sp. A adesão foi maior quando houve mais demanda de nutrientes, fator mandatório para a colonização de superfícies por fungos (GIANNANTONIO et al., 2009). Ressalta-se que não foi possível produzir nanopartículas com maior concentração da piocianina para avaliar um provável efeito biocida, dado o elevado custo e demanda por alto grau de pureza da piocianina. A produção em laboratório é uma alternativa que vem sendo trabalhada pelo grupo de pesquisa, porém não atendeu à demanda desta pesquisa durante seu período de realização.

Na simulação de um ambiente com baixa demanda de matéria orgânica não foi observado o crescimento fúngico. Fora do ambiente laboratorial os fungos estão expostos a

concentrações variáveis de matéria orgânica assimilável, sendo a formação de biofilmes uma garantia de um aumento proporcional da concentração de nutrientes (AZEVEDO, 2012; HARGING et al., 2009). O não crescimento fúngico nos corpos de prova pode ser explicado também pelo curto tempo do experimento, 72 horas. A colonização fúngica em *in situ* pode levar maior tempo, bem como diversos fatores exercem influência no depósito de nutrientes em superfícies, tais como vento, chuva, dentre outros (GIANNANTONIO et al, 2009).

Na condição dos corpos de prova submersos, a cobertura contendo as nanopartículas não obteve êxito, sendo também não observada qualquer interferência na concentração de células planctônicas, comparadas ao controle. Este resultado pode estar relacionado ao descrito por Nordstierna et al., (2010). Em razão do caráter hidrofóbico do PMMA, quando empregado em sistemas aquosos, há uma tendência em turgir, fazendo com que o espaço ocupado pelo biocida seja lixiviado, reduzindo ou cessando sua atividade.

O trabalho desenvolvido produziu um produto promissor, pois além do seu efeito antibiofilme desejado, pode contribuir com a diminuição de efeitos nocivos ao ambiente. Considerando que a ação da piocianina é dependente da concentração, estudos futuros poderão analisar a eficácia de nanossistemas com maiores concentrações da piocianina, bem como avaliar em outros microrganismos provenientes de outros substratos.

## 6. CONCLUSÕES

Dentre os isolados fúngicos identificados, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. apresentaram efeito fungistático, na concentração testada. Os nanossistemas foram preparados com concentração da piocianina magnificada em 42,85%.

O método de formulação demonstrou-se adequado para a obtenção das nanopartículas com piocianina. Os ensaios de estabilidade revelaram resultados satisfatórios. Entretanto, existe a necessidade do aperfeiçoamento dos aspectos relacionados à eficiência de encapsulação com o intuito de otimizá-la, de modo a conter maior quantidade da piocianina associada à parede polimérica.

## REFERÊNCIAS

- ADAN O.C.G., SAMSON R. A. Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living. *Wageningen Academic Publishers*; 2011.
- ADELEYE, I.A.; ADELEYE, O.A. Isolation and identification of microbes associated with paints and weathered painted walls. *J. Sci. Res. Dev*, v. 4, p.71-76, 2000.
- AFZAL S.; TARIQ, S.; SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Managing the root diseases of okra with endo-root plant growth promoting *Pseudomonas* and *Trichoderma viride* associated with healthy okra roots. *Pak J Bot.* v.45, p. 1455-60, 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. J; BLACKWELL, M. Introductory mycology. 4<sup>a</sup> ed. New York: J. Wiley, p.880, 1996.
- ANVISA, Manual de Microbiologia clínica para o controle de infecções em serviços de saúde, Brasília, 1<sup>a</sup>ed., 2004.
- APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington: American Public Health Association, 1360 pp, 2012.
- AUBRY, J; GANACHAUD, F; ADDAD, J-P.C; CABANE, B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting: 1. Boundaries. *Langmuir*, [s.l.], v. 25, n. 4, p.1970-1979, 2009.
- AZEVEDO, N.F.; CERCA, N. Biofilmes na Saúde, no Ambiente, na Indústria. *Publindústria*, 2012.
- BAESHEN, A. A. Use of *Pseudomonas aeruginosa* as Fertilizer in *Eruca sativa*. *Inter J Of Current Microbiol And Applied Sci*, [s.l.], v. 5, n. 10, p.301-312, 2016.
- BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quórum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *J Global Antimicrob Resist.* v. 10, n. 1, p. 21-28, 2017.

BARON, S.S.; ROWE J.J. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 20, n.6, p.814-820, 1981.

BERNARDI, E; NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na Praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande Do Sul, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.1, p.93-97, 2005.

BLANCHARD, A.E.; LU, T. Bacterial social interactions drive the emergence of differential spatial colony structures. *BMC Systems Biology*, v.9, n.59, p.1-13, 2015.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W.P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Inter J of Food Microb*, [s.l.], v 154, n.3, p.87-97, 2012.

BRANDA, S. S; VIK, S; FRIEDMAN, L; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* v. 13, n. 1, p.20-26, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e identificação de fungos de importância médica. Módulo VII, 2009.

BRYDSON, J. *Plastics Materials*. 7 ed. *Butterworths*, p. 405-409, 1999.

BURTON M.O; CAMPBELL J.J; EAGLES B.A. The mineral requirements for pyocyanin production. *Can J Res*, v.26, p.15–22, 1948.

CALLISTER, W.D. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 8ª ed. *Editora LTC*, 2013.

CAMPO, E. A. *The Complete Part Design Handbook For Injection Molding of Thermoplastics*, *Hanser*, p.891, 2006.

CARMO, E.S; BELÉM, L.F.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O; SILVEIRA, I.L; SOARES, L.H.M. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital público em Campina Grande – PB. *Rev Bra Anál Clín*, v. 39, n.3, p. 213-216, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard M38-A, *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSA)*, Wayne, PA, 2002.

CRAY, J.A.; BELL, A.N.W.; BHAGANNA, P.; MSWAKA, A.Y.; TIMSON, D.J.; HALLSWORTH, J.E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology*, v.6, n.5, p.453-492, 2013.

DE LA TORRE, M.A., GOMEZ-ALARCON, G., VIZCAINO, C., GARCIA, M.T., Biochemical mechanisms of stone alteration carried out by filamentous fungi living in monuments. *Biogeochemistry*, v. 19, p. 129–147, 1993.

DEACON, J. Fungal Biology. 4a ed. Inglaterra: *Blackwell Publishing*, 2006.

DEGOBBI, C. M; GAMBALE, W. Síndrome dos edifícios doentes: aspectos microbiológicos, qualidade de ar em ambientes interiores e legislação brasileira. *Microb in Foco*, São Paulo, v. 2, p. 19-32, 2008.

DENNIS,C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, v.57, p. 41-48, 1971.

Diretiva 98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de fevereiro de 1998, relativa à colocação de produtos biocidas no mercado. *J Ofic Comu Europ.* 5-9.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Diseases*, [s.l.], v. 8, n. 9, p.881-890, set. 2002.

DUANE, BIRNBAUM, JACQUELINE, PEPPAS, L.B. Optimization of preparation techniques for poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. *J Nanop Res*, v. 2, p.173–181, 2000.

DURÁN, Nelson; MATTOSO, Luiz H. C.; MORAIS, Paulo C. Nanotecnologia: introdução, caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo, *ArtLiber*, 2006.

EL-FOULY, M.Z; SHARAF, A.M; SHAHIN A.A.M; EL-BIALY H.A; OMARA, A.M.A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Rad Res And Appl Sci*, [s.l.], v. 8, n. 1, p.36-48, 2015.

EL-ZAWAWY, N. A.; ALI, S.S. Pyocyanin as anti-tyrosinase and anti *tinea corporis*: A novel treatment study. *Micro Pathog*, [s.l.], v. 100, p.213-220, 2016.

ERICH, S.J.F.; BAUKHA, V. Modelling biocide release based on coating properties *Prog Org Coatings*. v. 90; p. 171–177, 2016.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm* . v. 55, p. 1-4, 1989.

FIORI J.J.; SILVA L.L.; PICOLLI K.C.; TERNUS R.; ILHA J.; DECALTON F.; MELLO J.M.M.; RIELLA H.G.; FIORI M.A. Zinc Oxide Nanoparticles as Antimicrobial Additive for Acrylic Paint. *Mater Sci Forum*. v. 899, p. 248-253, 2017.

FREE, Stephen J. Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Adv In Gen*, [s.l.], p.33-82, 2013.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharma and Biopharm*, v. 69, p.1 – 9, 2008.

GAYLARDE, C.C., MORTON, L.H.G. The importance of biofilms in microbial deterioration of constructional materials. *Rev Microbiol*, v.28, p. 221–229, 1997.

GAYLARDE, C.G; GAYLARDE P. M. A comparative study of the major microbial biomass on exterior buildings in Europe and Latin America. *Inter Biod Biodegrad*, [s.l.], v. 55, n. 2, p.131-139, 2005.

GHOSH S. K. Functional Coatings: By Polymer Microencapsulation. *Weinheim: Wiley-VCH*, 2006.

GHOUL, M.; MITRI, S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends In Microbiol*, [s.l.], v. 24, n. 10, p.833-845, 2016.

GIANNANTONIO, D. J., KURTH, J.C., KURTIS, K.E., SOBECKY, P.A. Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *Inter Biod & Biodeg*, [s.l.], v. 63, n. 3, p.252-259, abr. 2009.

GIOLO, M.P.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial de candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 2010, v. 46, n.3, p. 225-234.

GOHAIN, N, THOMASHOW, L.S., MAVRODI, D.V, et al. The purification, crystallization and preliminary structural characterization of PhzM, a phenazine-modifying methyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta crystallographica section F: structural biology and crystallization communications.*;62(9):887–890, 2006.

GOODSHIP, V.; JACOBS, D. “Polyvinyl alcohol: materials, processing and applications, *Smithers Rapra Technol*, 2009.

GOW, N.A.R., LATGE, J-P., MUNRO, C.A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Micro Spectrum*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.267-292, 2017

GU, J.D., FORD, T.E., BERKE, N.S., MITCHELL, R. Biodeterioration of concrete by the fungus *Fusarium*. *Inter Biod & Biodegrad*, v.41, p.101–109, 1998.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. *Drug Target Insights*. v.2, p. 147-157, 2007.

GUTERRES,S.S; FESSI.H.; BARRA,G; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F. Poly(D-,L-lactide) nanocapsule containing diclofenac: I. formulation and stability study. *Inter J of Pharma*, v.113, p.57-63, 1995.

HARDING, M. W.; MARQUES, L.L.R.; HOWARD, R.J.; OLSON, M.E. Can filamentous fungi form biofilms?. *Trends Microbiol.* v. 17, n. 11, p.475-480, 2009.

HASSAN, H., FRIDOVICH, I. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J of Bacteriol*; v.141 (1), 156-163, 1980.

HERRERA, L.K.; VIDELA, H.A. Surface analysis and materials characterization for the study of biodeterioration and weathering effects on cultural property. *Int Biodeter Biodegrad*. v. 63, p. 813-822, 2009.

ISHFAQ, S., ALI, N., TAUSEEF, I., KHATTAK, M.N.K., SHINWARI, Z.K., ALI, M.I.,. Analysis Of Paint Degradation By Fungal And Bacterial Species. *Pak. J. Bot.*, 47(2): 753-760, 2015.

JAMEEL, Z. J., HUSSAIN, A.F., AL-MAHDAWI , M. A., ALKERIN, N.F.A, ALRAHMAN, E, S.A. Bioactivity of pyocyanin of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against a variety of human pathogenic bacteria and fungi species. *The Int Arabic J Of Antimicrob Agents*, [s.l.], v. 7, n. 3, 2017.

JÄMSÄ, S.; MAHLBERG, R.; HOLOPAINEN, U.; ROPPONEN, J.; SAVOLAINEN, J.; RITSCHKOFF, A.C. Slow release of a biocidal agent from polymeric microcapsules for preventing biodeterioration. *Prog Org Coatings*. v. 76; 269– 276, 2013.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*. v. 30, p. 1159-1168, 2014.

JESSY, R. S., IBRAHIM, M. H. Biodegradability and biocompatibility of polymers with emphasis of bone scaffolding: A brief review. *Inter J of Scient and Res Publicat*, 4, 610, 2014.

KACZMAREK, H; PODGÓRSKI, A. The effect of UV-irradiation on poly(vinyl alcohol) composites with montmorillonite. *J Of Photochem And Photobiol A: Chemistry*, [s.l.], v. 191, n. 2-3, p.209-215, 2007.

KARPAGAM, S.; SUDHAKAR, T.; LAKSHMIPATHY, M. MICROBICIDAL RESPONSE OF PYOCYANIN PRODUCED BY *P. aeruginosa* TOWARD CLINICAL ISOLATES OF FUNGI, *Int J Pharm Pharm Sci, Vol 5, Issue 3, 870-873, 2013*.

KHALIL, I. R; BURNS, A. T. H; RADECKA, I; Kowalczyk, M; Khalaf, T; Adamus, G; Johnston, B; Khechara, M. P. Bacterial-Derived Polymer Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid ( $\gamma$ -PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications. *Inter J Of Mol Sci*, [s.l.], v. 18, n. 2, p.313-331, 2017

KHAN, A.A.H; KARUPPAYIL, S. M. Fungal pollution of indoor environments and its management. *Saudi J Of Bio Sci*, [s.l.], v. 19, n. 4, p.405-426, 2012.

KRUMMENACKER, M.; LEWIS, J. Prospects in nanotechnology: toward molecular manufacturing. Hardcover, Jonh Wiley & Sons, 1995.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. et al. Tratado de micologia médica. 9a ed. São Paulo: Sarvier., 2002.

LEKSHMI, U.M.D; POOVI, G; KISHORE, N; REDDY, P.N. In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *Inter J Of Pharma*, [s.l.], v. 396, n. 1-2, p.194-203, 2010.

LIU, H.; CHEN, J. Indomethacin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and characterization. *PDA J of Pharma Sci and Techonol*, n.63, p 207-216, 2009.

LOXLEY, A; VINCENT, B. Preparation of Poly(methylmethacrylate) Microcapsules with Liquid Cores. *J Of Coll And Interf Sci*, [s.l.], v. 208, n. 1, p.49-62, 1998.

MADIGAN, M. T; BUCKLEY, D. H; BENDER, K.S; STAHL, D. A; MARTINKO, J.M. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAVRODI, D.V.; BONSTALL, R.; DELANEY, S.M.; SOULE, M.J.; PHILLIPS G.; THOMASHOW, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Of Bacteriol*, [s.l.], v. 183, n. 21, p.6454-6465, 2001.

MILADI, K; SFAR, S; FESSI, H; ELAISSARI, A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. *Polymer Nanop For Nanomed*, [s.l.], p.17-53, 2016.

MILLER, A. Z; LAIZ, L; DIONÍSIO, A; MACEDO, M.F; SAIZ-JIMENEZ, C. Growth of phototrophic biofilms from limestone monuments under laboratory conditions. *Int Biodet & Biodegrad*, [s.l.], v. 63, n. 7, p.860-867, 2009.

MITCHELL, R; GU, J-D. Changes in the biofilm microflora of limestone caused by atmospheric pollutants. *Int Biod & Biodeg*. [s.l.], v. 46, n. 4, p.299-303, 2000.

MELO, C. P; PIMENTA, M. Nanociência e Nanotecnologia. Revista Parcerias Estratégicas, Brasília, n. 18, p. 9-21, 2004.

MONDS, Russell D.; O'TOOLE, George A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends In Micro*, [s.l.], v. 17, n. 2, p.73-87, 2009.

MORA-HUERTAS, C.E., FESSI,H., ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113-142, 2010.

MULLER, M., MERRETT, N. Pyocyanin Production by *Pseudomonas aeruginosa* Confers Resistance to Ionic Silver. *Antimicrob Agents Chemoth.* Sep; 58(9): 5492-5499, 2014.

NAWAS, T; FEGHALI, P. A. R.E. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *Moj Toxicol*, [s.l.], v. 4, n. 6, p.417-422, 2018.

NIWA, T; TAKEUCHI, H; HINO, N; KUNOU, Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water soluble and insoluble drugs with dl-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Release*, v.25, p. 89–98, 1993.

NORDSTIERNA, L; ABDALLAA, A.A; MASUDAA, M; SKARNEMARKB, G; NYDÉNA, M. Molecular release from painted surfaces: Free and encapsulated biocides. *Prog Org Coatings*. v. 69; 45–48, 2010.

NORDSTIERNA, L; MOVAHEDI, A; NYDÉN, M. New Route for Microcapsule Synthesis. *J Of Dispe Sci And Tech*, [s.l.], v. 32, n. 3, p.310-311, 2011.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Envir Pollut*. v. 150, n. 1, p. 5-22, 2007.

NUNES, J.M.; BIZERRA, F.C.; FERREIRA, R.C.; COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* spp. isolares. *Antimicrobial Agents and Chemothe.* v. 57, n.1, p. 382-389, 2013.

OHFUJI K, SATO N, HAMADA-SATO N, KOBAYASHI T, IMADA C, OKUMA H, WATANABE E. Construction of a Glucose Sensor Based on a Screen-Printed Electrode and a Novel Mediator Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosen and Bioelectron*, v.19, p.1237-1244, 2004.

OSSWALD, T. A., BAUR, E., BRINKMANN, S., OBERBACH, K., SCHMACHTENBERG, E. *Int Plast Handbook: The Resource for Plast Engineers*, Hanser, p.919, 2006.

O'TOOLE, George; KAPLAN, Heidi B.; KOLTER, Roberto. Biofilm Formation as Microbial Development. *Ann Review Of Micro*, [s.l.], v. 54, n. 1, p.49-79, 2000.

OZYUREK, S. B.; GUR, S. D.; BILKAY, I. S. Production of pyocyanin pigment from *Pseudomonas aeruginosa* strains and investigation of the antimicrobial effect of pyocyanin on other microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.* v. 22S, n. 1, p. S113, 2011.

PANACEK, A.; KOLAR, M.; VECEROVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYSTOF, V.; HAMAL, P.; ZBORIL, R.; KVÍTEK, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida spp.* *Biomaterials*, 30, 6333-6340, 2009.

PATIL, S; NIKAM, M; PATIL, H; ANOKHINA, T; KOCHETKOV, V; CHAUDHARI, A. Bioactive pigment production by *Pseudomonas spp.* MCC 3145: Statistical media optimization, biochemical characterization, fungicidal and DNA intercalation-based cytostatic activity. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 58, p.298-305, jul. 2017

PAUL, M.; FESSI, H.; LAATIRIS, A.; BOULARD, Y.; DURNAD, R.; DENIAU, M.; ASTIER, A. Pentamidine-loaded poly(d,l-lactide) nanoparticles: physicochemical properties and stability work. *Inter J Of Pharma*, [s.l.], v. 159, n. 2, p.223-232, 1997.

PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E.; NEWMAN, D.K. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol*, v.2. p.71-78, 2006.

PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L.E.; NEWMAN, D.K. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J of Bacteriol*, v.189, n.17, p. 6372-6381, 2007.

PRIYAJA, P., JAYESH, P., HASEEB, M., JOSE, B., PHILIP, R. SINGH, B. Evaluation of pyocyanin toxicity in various life stages of *Penaeus monodon* and in nitrifying bacterial consortia for their safe application in recirculating aquaculture systems (RAS) to abrogate pathogenic vibrios. *Aqua Inter*, [s.l.], v. 25, n. 2, p.743-753, 2016.

RADA B., LETO T.L. Redox warfare between airway epithelial cells and *Pseudomonas*: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol Res.*; 43(1-3):198-209. 2009.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol Adv* 27; 76–83, 2009.

RAMAGE, G; MOWAT, E; JONES, B; WILLIAMS, C; LOPEZ-RIBOT, J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit Reviews In Microbiol*, [s.l.], v. 35, n. 4, p.340-355, 2009.

RAMAGE, G; RAJENDRAN, R; SHERRY, L; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. *Inter J Of Microbiol*, [s.l.], v. 2012, p.1-14, 2012.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 36, p. 887-913, 2011.

REIS, C.P.; NEUFELD, R.J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. v.2, p. 8-21, 2006.

RHO, J. Y.; ASHMAN, R. B.; TURNER, C. H. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *J of Biomechan*, v. 26, n. 2, p. 111-119, 1993.

RISCHBIETH, J. R.; MARSON, F.. A Coating with Antifouling Properties from the Reaction between Cuprous Oxide and Sodium Silicate. *Nature*, [s.l.], v. 192, n. 4804, p.748-748, nov. 1961.

ROBERT, G. H. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering, *Woodhead Publishing* p.97-106, 2005.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Inter J Food Microb*, [s.l.], v. 79, n. 1-2, p.3-16, 2002.

SAHA, S. R.; JAYALAKSHMI, S. Phenazine Pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Res J of Microbiol*. v.3, n.3, p. 122-128, 2008.

SAHOO A.K., MAHAJAN, R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol Onl J*; [s.I], v.7, n.2, p.77–86, 2016.

SANTANDER-ORTEGA, M.J; ÓDAR-REYES, A.B; CSABA, N; BASTOS-GONZÁLEZ, D; ORTEGA-VINUESA, J.L. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms. *J Of Coll And Interf Sci*, [s.l.], v. 302, n. 2, p.522-529, 2006.

SANTOS, T.T; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, [s.l.], v. 32, n. 2, p.199-212, 12 dez. 2011.

SAXENA, S.K. Chemical and Technical Assessment, POLYVINYL ALCOHOL (PVA), 61<sup>st</sup>. JECFA: FAO, 2004.

SCHAFFAZICK, R.S. GUTERRES, S.S. FREITAS, L.L; POHLMANN, R.A. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*, v.26, p.726-737, 2003.

SCHOENTAL, R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea* cultures. *Br J Exp Pathol*. v. 22, p. 137-147, 1941.

SHIRAKAWA, M. A., GAYLARDE, C.C., GAYLARDE, P.M., JOHN, V., GAMBALE, W. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *Fems Micro Eco*, [s.l.], v. 39, n. 2, p.165-173, fev. 2002.

SHIRAKAWA, M.A; TAVARES, R.G., GAYLARDE, C.C., TAQUEDA, M.E.S., LOH, K.; JOHN, V.M. Climate as the most important factor determining anti-fungal biocide performance in paint films. *Sci of the Tot Env*, [s.l.], v. 408, n. 23, p.5878-5886, 2010.

SIDDIQUI, N; BHARDWAJ, A; HADA, E; YADAV, V.S; GOYAL, D. Synthesis, characterization and antimicrobial study of poly (methyl methacrylate)/Ag nanocomposites. *Vacuum*, [s.l.], v. 153, p.6-11, 2018.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

SINGH, R.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A.. Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology*, [s.l.], v. 157, n. 9, p.2611-2618, 2011.

SOLINO, A.J.S; Oliveira, J.B.S; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; ALENCAR; M.S.R; RIBEIRO, L.M. Potencial antagonista e controle in vitro de *Alternaria solani* por fungos sapróbios. *Summa Phytop*, [s.l.], v. 43, n. 3, p.199-204, 2017.

SOUZA, A. E. F.; SOUZA, E. F.; COSTA, H. A.; BARBOSA, Y. W. F.; SOUZA JUNIOR, U. P.; VIEIRA, K. V. M. Microbiota Fúngica Anemófila de Hospitais da Rede Pública da Cidade de Campina Grande – PB. *Rev Bio Farm – BIOFAR*, v. 4, p. 102- 116, 2010.

SOUZA, D. R.; GEOVANNA, A. S.; IZABEL, F. B. A.; LARA, M. P.; BEZERRA, V. S.; MARQUES, R.B. Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos. *Rev Intert Tox, Ris Amb Soc*, [s.l.], v. 10, n. 2, p.73-84, 12 jun. 2017.

STERFLINGER, K. Fungi as geologic agents. *Geomicrobiol J*. v.17, p. 97–124, 2000.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Ann Rev Micro*. v. 56, n. 1, p.187-209, 2002.

STRONG, A.B. *Plastics: Materials and Processing*, Prentice Hall, p.811, 2000.

SUDHAKAR, T.; KARPAGAM, S. Antifungal efficacy of pyocyanin produced from bioindicators of nosocomial hazards. *Inter Conf On Green Technol And Env Conservat*, [s.l.], p.1101-1106, 2011.

TAKAHASHI, J.A.; LIMA, G.S.; DOS SANTOS, G.F.; LYRA, F.H.; DA SILVA-HUGHES, A.F.; GONÇALVES, F.A.G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Rev Virt Quim*. v.09. 2017

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front in Microb*. 2016

TELEGDI, J.; SHABAN, A.; KÁLMÁN, E. EQCM study of copper and iron corrosion inhibition in presence of organic inhibitors and biocides. *Electrochem Acta*. v. 45, n. 22-23, p. 3639-3647, 2000.

TORCELLO-GÓMEZ, A; SANTANDER-ORTEGA, M. J; PEULA-GARCÍA, J.M; VALDERRAMA, J. M; GÁLVEZ-RUIZ, M. J; VINUESA, J. L. O; RODRÍGUEZ, A, M. Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties. *Soft Matter*, [s.l.], v. 7, n. 18, p.8450-8461, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ÜNAL, Hayriye. Antibiofilm Coatings. *Handbook Of Antimicrobial Coatings*, [s.l.], p.301-319, 2018.

VAN DIJCK, P. et al. Methodologies for in vitro and in vivo evaluation of efficacy of antifungal and antibiofilm agents and surface coatings against fungal biofilms. *Microbial Cell*, [s.l.], v. 5, n. 7, p.300-326, 2018.

VASCONCELOS, U.; LIMA, M.A.G.A.; CALAZANS, G.M.T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Can J Pure Appl Sci.* v. 4, n. 2, p. 1133-1139, 2010.

VEGA, K; KALKUM, M. Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections. *Int J Of Micro*, [s.l.], v. 2012, p.1-10, 2012.

WAKSMAN, S.A.,WOODRUFF, H.B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. *J Bacteriol.*; v.40, n.4, p.581-600, 1940.

WONGSAGONSUP, R.;SHOBSNGOB,S.;OONKHANOND,B.;VARAVINIT,S. Zeta potential ( $\zeta$ ) analysis for the determination of protein content in rice flour. *Starch/Statrke*, v. 57, n.1, p. 25-31, 2005.

WOO, S.L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma spp.*, phytopathogenic fungi and plants. *Phytopath*, v. 96, p. 181-185, 2006.

YOUNG, R. J.; LOVELL, P.; GRANDJEAN, P.; *Introdution to Polymers*. Springer, 1992.

## APÊNDICE A – Cadastro dos isolados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
 Cadastro nº A6D0C2F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A6D0C2F  
 Usuário: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
 CPF/CNPJ: 445.546.802-15  
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
 Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

#### Espécie

Pseudomonas aeruginosa  
 Trichoderma sp  
 Fusarium sp  
 Trichophyton sp  
 Penicillium sp  
 Aspergillus sp

Título da Atividade: Os biofilmes bacterianos: avaliação da adesão e formação sobre diferentes substratos

#### Equipe

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes	Universidade Federal da Paraíba
Bianca Teixeira Morais de Oliveira	UFPB
Vinícius Cavalcante Morais	UFPB
Maria Eduarda de Souza Maia	UFPB
Jonas Emanuel Guimarães da Silva	UFPB
Fabiano Brandão Meiquilades de Araújo	UFPB

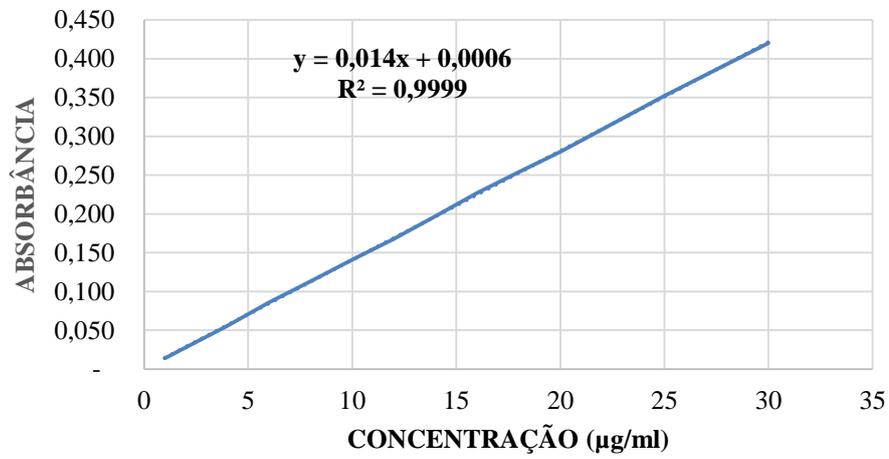
Data do Cadastro: 27/09/2018 15:54:13  
 Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 15:54 de 27/09/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - SISGEN

**APÊNDICE B – Curva de calibração da piocianina****CURVA ANALÍTICA PIOCIANINA**



## APÊNDICE D – Depósito da patente



13/08/2019 870190078157

11:00



29409161908493592

### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 016732 7

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

#### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COBERTURA ANTIFÚNGICA À BASE DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO PIOCIANINA

Resumo: A presente invenção trata do desenvolvimento de nanossistemas de cobertura antifúngica com aplicação nas áreas de biotecnologia industrial e da saúde com o intuito de fornecer uma proteção prolongada a superfícies abióticas visando impedir, por meio de liberação controlada, o processo de colonização por fungos. Além disso, o sistema nanoestruturado é constituído pelo polímero polimetilmetacrilato que é considerado o acrílico mais importante disponível, detendo boa resistência a intempéries naturais e fraca degradação quando exposto a raios ultravioletas.

Figura a publicar: 1

#### Dados do Inventor (72)

---

Inventor 1 de 6

Nome: JONAS EMANUEL GUIMARÃES DA SILVA

CPF: 09687553480

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Pedro Alexandre Cabral, Mangabeira.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-301

País: BRASIL

Telefone: (83) 988 342943

Fax:

Email: jonas.8@hotmail.com