

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DE MEMBRANAS DE QUITOSANA MODIFICADAS COM COBRE E PRATA

Ellen Moraes de Carvalho¹, Zilvam Melo dos Santos², Izabelly Larissa Lucena³

¹ Graduanda do curso Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – Rio Grande do Norte. E-mail: ellenmoraisc@gmail.com

² Professor Dr. na Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – Rio Grande do Norte. E-mail: zilvammelo@ufersa.edu.br

³ Professora Dra. na Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – Rio Grande do Norte. E-mail: izabellylucena@ufersa.edu.br

Resumo: A membrana de quitosana é um composto biopolimérico que possui característica de ser atóxica e biocompatível com outras moléculas, fatores esses que atribuem ao biopolímero destaque na indústria biomédica. É bastante relatado na literatura que os sais de metais, como a Prata e o Cobre, possuem em sua natureza características antimicrobianas, onde pequenas quantidades do metal são liberadas, causando assim inibição no crescimento dos microrganismos. Diante disso, o trabalho possui objetivo de encontrar a melhor estrutura de quitosana contra o crescimento bacteriano. Analisando membranas de quitosana pura e quitosana incorporadas com metais diante das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* por meio do Teste de Disco-Difusão, foi possível avaliar a capacidade inibitória das estruturas. Os resultados observados mostraram que a membrana de quitosana com Nitrato de Prata possui maior eficiência diante das outras membranas por ter formado um halo de inibição entre 10 mm a 13 mm, enquanto as outras não possuíram essa característica.

Palavras-chave: Quitosana; Halo de Inibição; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*;

1. INTRODUÇÃO

Polímeros são materiais constituídos a partir de matéria orgânica ou sintética, e tem em sua estrutura a repetição de parte da molécula por n vezes conferindo um tamanho que se destaca por possuir resistência à corrosão e baixa densidade. Esse composto ainda possui características que podem ser exploradas em diversas áreas de atuação pela sua flexibilidade [1].

A quitosana, (**Figura 1**), é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina, esse material é encontrado nos exoesqueletos de animais marinhos, principalmente em caranguejo e camarão, diante disso é o segundo polímero natural mais abundante encontrado na natureza [2]. A quitosana foi descoberta quando a quitina foi colocada em contato com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição, as ligações N-acetil da quitina foram quebradas formando um grupo de amino livre D-glicosamina, sendo um grupo de polímeros desacetilados, que para ser considerada quitosana necessita de um grau de desacetilação maior que 50% [3]. A quitosana possui características importantes para as suas aplicações, é um composto orgânico, atóxico, biodegradável e biocompatível. A quitosana apresenta diversas aplicações tais como: purificação de água, processamento de alimentos, liberação controlada de fármacos, produtos farmacêuticos, inibição de colônias de bactérias [4]. Como a quitosana está entre um dos materiais mais economicamente relevantes por ser formada a partir do resíduo da indústria de pesca, o composto está entre um dos biopolímeros mais requeridos para a produção de membranas [5].

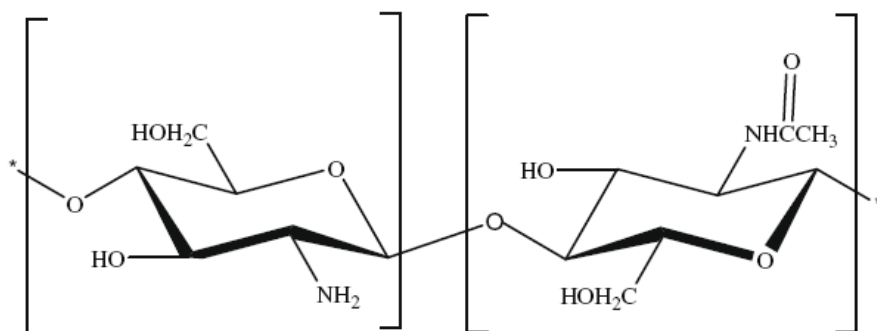


Figura 1: Estrutura química da Quitosana [17]

Por possuir um grupo amino livre, a quitosana possui boa capacidade de interação com metais pesados. Na literatura é possível encontrar trabalhos onde utiliza-se o biopolímero para a remoção de metais em efluentes industriais, por ser um composto com boa capacidade de adsorção. A incorporação de soluções de metais à uma membrana de quitosana estabelece uma ampla funcionalidade do material [6].

O Cobre é um elemento químico essencial à vida, uma pessoa adulta possui em média 100 mg do metal em seu organismo, quantidades superiores a esta pode ser tóxica para a saúde. É utilizado em vários processos industriais e possui grande importância biológica [8]. O componente possui propriedades antimicrobianas funcionando como inibidor do crescimento do microrganismo, atua com eficiência na desativação de fungos, bactérias, leveduras e vírus. Suas propriedades antimicrobianas se deve a capacidade do metal de aceitar e doar facilmente seus elétrons [4].

Durante séculos a Prata é utilizada como agente antimicrobiano, os íons de prata possuem atividade bacteriostática, são muito usadas devido a sua alta área superficial em relação ao volume e propriedades físico-químicas peculiares [10]. Possui atividade antimicrobiana superior a outros metais como mercúrio, cobre, chumbo, cromo e estanho, este material pode ser encontrado incorporado em curativos para o combate de infecções [7].

A obtenção de membranas biopoliméricas em contato com diferentes metais, abre uma nova rota para a aplicação da quitosana na preparação de novos materiais, o resultado do processo pode ter aplicações bioquímicas satisfatórias [11]. É relatado na literatura que a incorporação de membranas de quitosana com metais de cobre e prata possuem comportamento antibacteriano, sendo a presença do metal é fundamental para a obtenção dessa característica [4].

Para a comprovação da sua eficiência contra o crescimento de bactérias, é necessário analisar quais tipos de microrganismo a estrutura é capaz de suceder. Os enteropatógenos, bactérias que provocam doenças no sistema gastrointestinal, fazem parte de uma família composta por trinta gêneros e mais de cem espécies de seres vivos, a bactéria *Escherichia coli* faz parte deste grupo. Esta bactéria é geneticamente conhecida, capaz de apresentar uma diversidade patogênica expressiva, causando infecções intestinais e extraintestinais [12]. A manifestação dessa bactéria no corpo é uma problemática social. A bactéria é responsável por uma alta taxa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento. Pode ser encontrada como responsável por doenças agudas em homens e animais [13]. O patógeno *Staphylococcus aureus* pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, presente nas fossas nasais, garganta, intestino e pele, sua colonização traz riscos para pacientes que possuem diabetes e HIV-positivo, podendo ser encontrado frequentemente em feridas cirúrgicas. O descaso com a dosagem de antibióticos pode fazer com que a resistência dessa bactéria aumente, tornando difícil o combate contra as infecções causadas por este microrganismo patogênico [14].

A proliferação da bactéria só acontece se ela estiver inserida em um ambiente adequado, para isso o seu crescimento deve ser obtido em meios de cultura, que são ambientes que fornecem nutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Existem diversos tipos de meios, eles são complexos, além de apresentarem finalidades e composições diferentes. O meio de cultura para o crescimento de bactérias depende de qual família ela pertence. A partir do reconhecimento da bactéria é possível realizar o método de disco-difusão em ágar para testar o crescimento da bactéria, esse teste baseia-se na presença ou ausência de halo de inibição, é um teste qualitativo que avalia a atividade antimicrobiana por meio da formação de uma superfície transparente ao redor do disco inserido, indica que o microrganismo introduzido não possui atividade microbiana diante da estrutura exposta, o procedimento mais adequado é realizando um Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA). O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. Geralmente, para este procedimento é indicado o uso do ágar Mueller Hinton, por ser recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) pelo seu alto padrão de determinação de bactéria. Este meio de

cultura é conhecido para a aplicação dos discos de antibióticos e também para antibiograma, exame feito para a verificação da sensibilidade bacteriana em diferentes antibióticos [15,16].

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a aplicação de membranas de quitosana modificadas com sais de cobre e prata na inibição do crescimento microbológico das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Foi utilizada a quitosana (massa molar viscosimétrica média de $2,38 \times 10^5$ g/mol), produzida pela Polymar Ltda, com grau médio de desacetilação 97,3%, determinado por titulação condutimétrica seguindo a metodologia caracterizada por [17]. Também foram utilizados: Hidróxido de Sódio (P.A, 99%, VETEC Brasil), Ácido Acético (P.A, 99,7%, VETEC Brasil), Nitrato de Prata (P.A, CRQ Produtos Químicos Eireli), Sulfato de Cobre II (P.A – ACS, 98%, Dinâmica Química Contemporânea LTDA), Ágar MacConkey, Ágar Mueller Hinton, Ágar Sangue.

2.1.2 Equipamentos

Swab estéril para coleta de amostras, Alça descartável e estéril (10 µL), Estufa de cultura bacteriológica (ECB – Linea) e Capela de fluxo laminar (TROX Technik).

2.2. Métodos

2.2.1 Teor de Sólidos

A determinação do teor de sólidos da substância indica a quantidade de água presente na matéria-prima, o procedimento é realizado pesando uma quantidade da amostra e levando em seguida para a estufa a 120-125 °C, o processo de pesagem é feito repetidas vezes até a obtenção de uma massa constante. O valor é calculado pela Equação (1).

$$Ts (\%) = \frac{mc}{mo} \times 100 \quad (1)$$

Onde *Ts (%)* é o valor do Teor de Sólidos em porcentagem, *mc* a massa constante obtida e *mo* a massa inicial.

2.2.2 Espessura das membranas

As espessuras das membranas foram medidas utilizando um micrômetro externo (Mitutoyo, 0-25nm), foi medido algumas partes da membrana até a obtenção de pontos para o cálculo médio da sua espessura de 0,0405 mm.

2.2.3 Membranas de quitosana

As membranas de quitosana foram preparadas a partir de uma solução de quitosana 2% (m/v) em uma solução de ácido acético 2% (m/v). Esta solução foi colocada sob agitação magnética durante 24h (**Figura 2**), até a sua completa solubilização. Em seguida, o produto gerado foi filtrado. A filtração foi realizada com filtros de papel quantitativo com auxílio de uma bomba a vácuo. Um volume de 120 mL desta solução foi distribuído em placas de acrílico (30 x 15 cm). Posteriormente, as placas com a solução de quitosana foram levadas para secar em estufa bacteriológica (LUCADEMA – 81) a 50 °C durante 48h (**Figura 3**). Após a evaporação do solvente foi colocado sobre a superfície das placas uma solução de NaOH 2% (m/v) durante 2 h para a neutralização da membrana. Em seguida as membranas foram lavadas com água destilada até completa remoção do hidróxido de sódio. Posteriormente, as membranas foram colocadas em repouso por um período de 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas secas obtidas foram cortadas em quadrados e depois cortadas em discos com diâmetro de 6 mm.

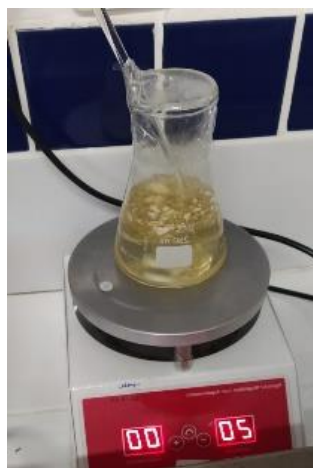


Figura 2: Solução de Quitosana 2% (Autoria própria)



Figura 3: Membrana de Quitosana. (Autoria própria)

2.2.4 Membranas de quitosana com metais

Para impregnação dos metais sobre as membranas de quitosana preparou-se duas soluções dos sais dos metais de prata e cobre (AgNO_3 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 1 g/L. Esta solução foi colocada em contato com as membranas por um período de 24h (**Figura 4**). Em seguida, as membranas foram secas a temperatura ambiente por um período de 24 h. Por fim, as membranas foram cortadas em discos de diâmetro de 6 mm para realização dos testes com os microrganismos.

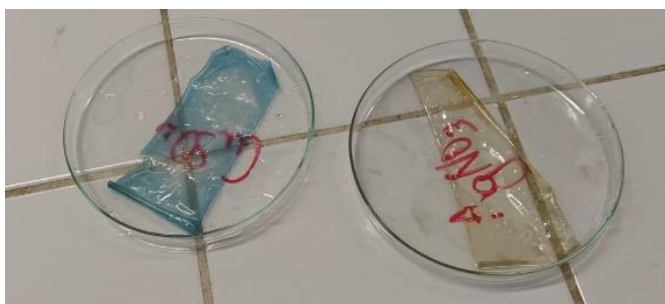


Figura 4: Membranas de Quitosana com metais: AgNO_3 e CuSO_4 , respectivamente (Autoria própria)

2.2.5 Identificação da *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria enteropatogênica. O procedimento para a obtenção das colônias foi realizado a partir de provas bioquímicas, diante de uma amostra de urina humana, com o auxílio de uma Alça Descartável 10 μL (**Figura 5**). A amostra é coletada e diluída com 1 mL de soro fisiológico e agitada até a completa solubilização, utilizando a mesma alça. A amostra solubilizada é transferida para o meio de cultura Ágar Sangue, com um Swab Estéril, (**Figura 6**), este meio, possui características de crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas. A bactéria é deixada na Estufa Bacteriológica a 36 °C durante 24 h até a proliferação da mesma, depois desse procedimento, para a obtenção da bactéria desejada é preciso realizar mais testes de provas. O segundo teste é coletar com uma Alça Descartável 10 μL a parte do

microrganismo que cresceu no meio de cultura anterior, solubilizar com 1mL de soro fisiológico com a mesma alça e transferir para o meio de cultura Ágar MacConkey, este meio possui característica de crescimento de gram-negativas. O terceiro teste de prova é o Teste de Oxidação e Fermentação (O/F), este procedimento é baseado na detecção de ácidos quando um microrganismo fermenta glicose, a bactéria analisada é colocada em um tubo de ensaio preenchido com colônias de lactose e oxidase, e se fermentar o açúcar glicose, atende a todos os pré-requisitos característicos e confirma a identificação da bactéria *Escherichia coli*.



Figura 5: Alça descartável (Autoria própria)



Figura 6: Swab Estéril (Autoria própria)

2.2.6 Identificação da *Staphylococcus aureus*

O procedimento da identificação desta bactéria é semelhante ao analisado anteriormente, deve ser feito a partir de um ágar sangue, um meio de cultura onde desenvolve bactérias de gram-positivo e gram-negativos, a *Staphylococcus aureus* é um patogênico pertencente ao grupo das gram-positivas, diante disso, a sua identificação é realizada mediante a 3 provas testes. A primeira prova é o crescimento no meio ágar sangue conforme a **Figura 7**. A segunda prova é por meio do processo de catalase, coletando a bactéria identificada, a colônia é colocada sobre uma lâmina de vidro e é adicionado uma gota de H_2O_2 , a formação de bolhas é um dos indicadores do microrganismo. O terceiro teste é a coagulase, a bactéria é colocada para reagir com um fator plasmático, caso a reação forme complexos coagulantes, confirma que a bactéria analisada é a *Staphylococcus aureus*.



Figura 7: *Staphylococcus aureus* no meio de cultura Ágar sangue (Autoria própria)

2.2.7 Testes de Disco-Difusão

Após a identificação das bactérias, é necessário realizar um Antibiograma, ou seja, um Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA). Esse procedimento é um teste qualitativo que orienta a escolha de um antibiótico eficiente na prevenção da bactéria analisada. O processo é feito utilizando o Ágar Mueller Hinton, este meio de cultura é o ideal para esta técnica, que se baseia na inoculação de discos antimicrobianos em sua superfície até a formação de halos de inibição.

O mecanismo foi realizado a partir das bactérias identificadas anteriormente, a bactéria analisada foi retirada com uma Alça Descartável 10 µL (**Figura 8**), diluída com 1 mL de soro fisiológico, e agitada até sua completa solubilização com aparecimento de uma turbidez. Com um Swab Estéril é solubilizada e transferida para o Ágar Mueller Hinton (**Figura 9**), em seguida, os discos de antibióticos foram adicionados para comparação (Ciprofloxacina, Cefepime, Ampicilina, para análise da *Escherichia coli*) e (Vancomicina, Tetraciclina, Rifampicina, para análise da *Staphylococcus aureus*). Para verificar a capacidade antimicrobiana das membranas de quitosana com sulfato de cobre e nitrato de prata, as mesmas foram

adicionadas aos meios de cultura com as bactérias. O objetivo foi verificar a formação ou não de halos de inibição, como se espera com os discos de antibióticos. Sendo assim, todos os discos de quitosana (quitosana pura e quitosana modificada) e de antibióticos foram depositados no meio de cultura e deixados durante 24 h a 36 °C na Estufa de Cultura Bacteriológica. Vale ressaltar que como material biopolimérico possui característica de ser hidrofílico, para a inserção dos discos de quitosana no meio de cultura foi necessário inserir um plástico rígido e liso sobre a sua camada, mantendo assim a regularidade de toda a membrana. Essa etapa fez-se necessário, pois os meios de cultura possuem umidade para aderência dos discos, o que torna as membranas inflexíveis.



Figura 8: Coleta da *E. coli* (Autoria própria)

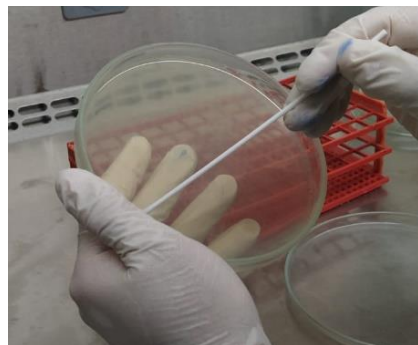


Figura 9: Inserção no meio de cultura (Autoria própria)

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Teor dos Sólidos

Através dos dados da massa inicial e da massa final foi possível calcular o teor de sólidos aplicando os valores na Equação (1). Dessa forma, o valor de teor de sólidos obtido foi de 86,3%, esse valor determina o valor real da massa de quitosana a ser utilizada no preparo das membranas.

3.2. Membranas de Quitosana com metais

A presença dos grupos amino na quitosana favorecem a entrada dos íons metálicos, assim a estrutura do biopolímero, por ser flexível, se adequa a complexação dos metais sofrendo uma quelação [11]. Os elétrons livres sobre o grupo nitrogênio e oxigênio, fazem com que a quitosana atue como base de Lewis e os metais atuem como ácido de Lewis, em virtude dessa característica o biopolímero pode se ligar aos ânions metálicos por troca iônica [18]. A **Figura 10** demonstra como acontece essa interação, a ligação do metal com o biopolímero faz com que a substância apresente maior aplicabilidade na sua função.

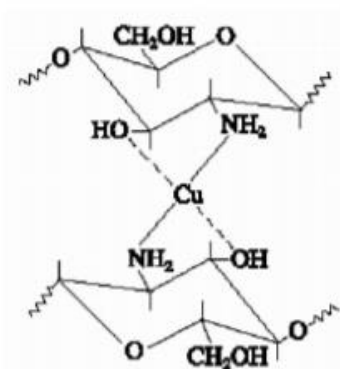


Figura 10: Interação do metal Cobre com a Quitosana [18]

3.3 Avaliação da capacidade inibitória das membranas de quitosana

Para a avaliação da capacidade inibitória da estrutura, foi realizado o teste de disco-difusão como descrito no tópico 2.2.7. Nesse procedimento é possível verificar a formação ou ausência do halo de inibição. A membrana de quitosana pura e com sulfato de cobre, não obtiveram êxito nesse teste, não formaram halo de inibição, indicando que a estrutura não possui nenhuma capacidade inibitória contra as bactérias avaliadas neste estudo. A membrana de quitosana com nitrato de prata obteve formação de halo de inibição, formou-se 10 mm de halo no meio inserido com *Staphylococcus aureus* (Figura 11) e 13 mm de halo no meio inserido com *Escherichia coli* (Figura 12). É possível observar diante do Teste de Disco-Difusão com os discos de antibióticos comparativos que a estrutura feita não atinge nível semelhante significativo do halo de inibição formado, isso se deve pelo fato de que os discos de antibióticos já passaram por inúmeros testes durante anos e atendem todas as normas da legislação CLSI M100-S15 (2005) obtendo eficiência da sua atuação contra bactérias.

Na literatura é possível encontrar trabalhos onde demonstram que quitosana imersas com metais possui uma boa capacidade bacteriostática. Pereira (2017) verificou a formação de um halo de inibição em membranas de quitosana com nanopartículas de prata diante da E.Coli de 16 mm. De Sousa (2018) diante da mesma estrutura, com 0,025% de concentração das nanopartículas de prata, obteve 2 mm de halo de inibição, indicando que o procedimento foi eficiente tendo aplicabilidade na área de curativo para regeneração tecidual. De Paiva (2009), com multicamadas de quitosana e alginato imersas em cobre, relata que o metal é fundamental para a capacidade antibacteriana do sistema, obtendo aplicabilidade em tratamento de feridas e tratamento de água. Sendo assim, os resultados obtidos demonstram que a membrana de quitosana com nitrato de prata apresenta boa capacidade de inibição para ambas as bactérias testadas.

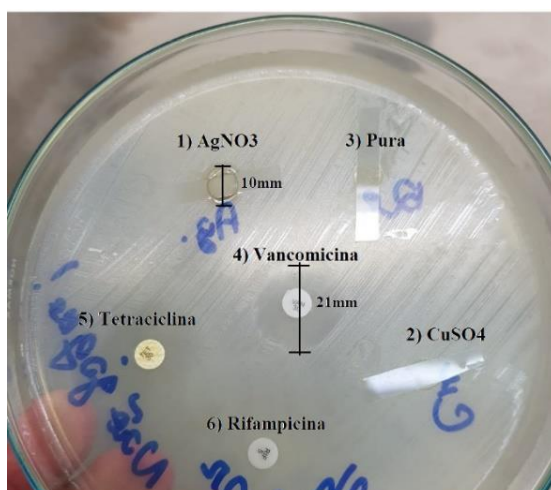


Figura 11: TSA da *S.Aureus* com 10mm de halo de inibição de Quitosana + AgNO₃. (Autoria própria)

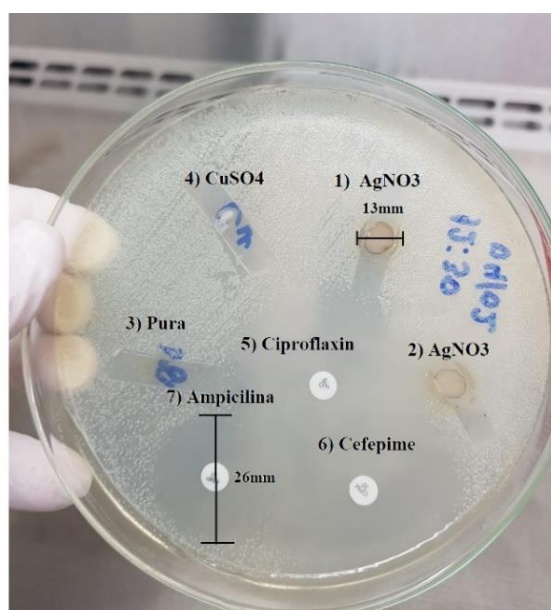


Figura 12: TSA da *E.Coli* com 13mm de halo de inibição de Quitosana + AgNO₃. (Autoria própria)

4. CONCLUSÕES

A inserção do nitrato de prata foi fundamental para que as membranas de quitosana obtivessem característica inibitória contra a bactéria, embora seja encontrado na literatura que a quitosana pura possui particularidade antibacteriana, não foi possível visualizar para as bactérias avaliadas neste trabalho. Foi previsto que as membranas com sulfato de cobre também possuísem eficiência no teste realizado, visto que na literatura encontra-se dados da sua capacidade de inibição, a explicação para a ocorrência desse fato pode ter sido a baixa concentração da solução do metal ou alguma contaminação involuntária diante do teste.

O respectivo trabalho propõe um indicativo para que novas análises e experimentos sejam realizados. Acredita-se que com a continuidade do projeto resultados mais promissores possam ser obtidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANASTÁCIO, Amanda Gleyce. **A importância dos biomateriais e suas aplicações**. Disponível em: <<http://192.100.247.84/bitstream/prefix/1154/1/Amanda%20Gleyce%20Anast%c3%a1cio.pdf>> Acesso em: 6 jan. 2020
- [2] R. Spin Neto et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura, **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v.37, n.37, p.155-161, 2008. Disponível em: <<https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018447f8c9d0a098b4b49/pdf/rou-37-2-155.pdf>> Acesso em 6 jan. 2020
- [3] JUNIOR, Heronildes Fernandes de Queiroz. Utilização de membranas de quitosana como alternativa para tratamento de efluentes com metais pesados. Disponível em: <http://monografias.ufm.br:8080/jspui/bitstream/123456789/4181/1/Utilizacaodamembrana_Monografia> Acesso em 6 jan. 2020
- [4] DE PAIVA, Rafael Gonçalves. **Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana e alginato contendo cobre**. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/267188/1/Paiva_RafaelGoncalvesde_M.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2019
- [5] DALLAN, Paula. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/267454/1/Dallan_PaulaRulfMarreco_D.pdf> Acesso em 7 jan. 2020
- [6] R.A Tariq et al. Chemical modification of Chitosan for metal ion removal, **Arabian Journal of Chemistry**, v.7, n.5, p.741-746, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210002753#bi0005>> Acesso em 7 jan. 2020
- [7] M.J.B Cardoso et al. Ensaios Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio, **REMAP**, Campina Grande, v.7, n.1, p.1-6, fev. 2011. Disponível em: <<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/view/240/229>> Acesso em 8 jan. 2020
- [8] COELHO, Thalia Camila. **Estudos de adsorção de Cobre (II) em microesferas de quitosana reticuladas com Epicloridrina e impregnadas com Heparina**. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88790/226924.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em 8 jan. 2020
- [9] DE SOUSA, Lorena Oliveira. **Membranas de gelatina/quitosana com nanopartículas de prata para regeneração tecidual**. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18158/tde-11012019-102421/pt-br.php>> Acesso em 18 set. 2019
- [10] PEREIRA, Anna Karla dos Santos. **Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: Estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada do ibuprofeno**. Disponível em: <<http://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/496>> Acesso em 18 set. 2019
- [11] GODOI, Fernanda Condi de. **Membrana densa de quitosana contendo nanopartículas de Cobre: caracterização e possíveis aplicações**. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/266672/1/Godoi_FernandaCondi_D.pdf> Acesso em 8 jan. 2020
- [12] SILVA, Gracie Luiza da. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre enteropatógenos: Salmonella entérica, Shigella sonnei e Escherichia coli EPEC**. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006-095954/publico/TDE_GracieLuizaSilva.pdf> Acesso em 8 jan. 2020

- [13] GUTH, Beatriz. Enterotoxigenic Escherichia coli – na Overview, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.1, p.95-97, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762000000700017> Acesso em 9 jan. 2020
- [14] SANTOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n6/v43n6a05.pdf>> Acesso em 03 fev. 2020
- [15] ANVISA. **Interpretação de dados microbiológicos**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/microbiologia.htm> Acesso em 10 jan. 2020
- [16] ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão**. Disponível em <http://anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em 10 jan. 2020
- [17] DOS SANTOS, Z. M.; CARONI, A. L. P. F.; PEREIRA, M. R.; DA SILVA, D. R.; FONSECA, J. L. C. **Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis**. Carbohydrate research, v. 344, n. 18, p. 2591–5, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/38033298_Determination_of_deacetylation_degree_of_chitosan_A_comparison_between_conductometric_titration_and_CHN_elemental_analysis> Acesso em 09 fev. 2020
- [18] OLIVEIRA, Margarete. **O biopolímero Quitosana modificado quimicamente ou reticulado com metais, em forma de pó ou esfera, aplicado no estudo termoquímico da interação com Cobre e Aminas alifáticas**. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/250070/1/Oliveira_Margarete_D.pdf> Acesso em 09 fev. 2020