



MONICA DE JESUS SILVA

**NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA, EXTRATO DE
Kalanchoe daigremontiana E EXTRATO DE *Kalanchoe
daigremontiana* ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS
DE QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO ANTIBACTERIANO
SOBRE *Salmonella enteritidis* E *Bacillus cereus***

LAVRAS – MG

2023

MONICA DE JESUS SILVA

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA, EXTRATO DE *Kalanchoe daigremontiana* E EXTRATO DE *Kalanchoe daigremontiana* ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO ANTIBACTERIANO SOBRE *Salmonella enteritidis* E *Bacillus cereus*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

Professora. Dra. Angela Dayana Barrera de Brito

Orientadora

Professora. Dra. Cristina Ferreira Silva

Coorientadora

LAVRAS – MG

2023

MONICA DE JESUS SILVA

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA, EXTRATO DE *Kalanchoe daigremontiana* E EXTRATO DE *Kalanchoe daigremontiana* ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO ANTIBACTERIANO SOBRE *Salmonella enteritidis* E *Bacillus cereus*

CHITOSAN NANOPARTICLES, *Kalanchoe daigremontiana* EXTRACT AND *Kalanchoe daigremontiana* EXTRACT ENCAPSULATED IN CHITOSAN NANOPARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THEIR ANTIBACTERIAL EFFECT ON *Salmonella enteritidis* AND *Bacillus cereus*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 8 de dezembro de 2023.

Me. Clara Resende de Souza Castro UFLA

Dr. Júlio Cesar Ugucioni UFLA

Professora. Dra. Angela Dayana Barrera de Brito

Orientadora

Professora. Dra. Cristina Ferreira Silva 

Coorientadora

Documento assinado digitalmente

CRISTINA FERREIRA SILVA

Data: 14/12/2023 12:16:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

LAVRAS -MG

2023

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras, que proporcionou um ensino com equidade, sem distinções, inclusivo, questionador e humano. Assim, essa me ofereceu uma educação problematizadora como descreve Freire, me fazendo compreender os contextos em que eu possa estar inserida, questioná-los e propor transformações nesses se necessário. A partir disso, foi possível me ver como um ser pensante, capaz de fazer diferença no mundo por meio de ideias e preceitos éticos e não apenas como uma ferramenta braçal. Assim, o ambiente acadêmico fomentou um desejo insaciável pela busca de conhecimento e pela transformação de um mundo melhor.

As primeiras mulheres que ocuparam espaço na ciência abrindo caminho para que eu tivesse o privilégio de realizar essa pesquisa com um time de cientistas brilhantes que me inspiraram diariamente a não desistir durante o processo. Assim, agradeço a minha orientadora Ângela por ter desempenhado seu papel com companheirismo, dedicação, profissionalismo e acolhimento, ampliando minha visão sobre a ciência e como esta é integrativa. Agradeço a Cristina minha coorientadora que me recebeu de forma acolhedora na microbiologia. A Clara que me auxiliou de forma integral na execução microbiológica do projeto, ensinando com paciência, didática e carinho. Agradeço a Nayara e Tainá companheiras de laboratório, que fizeram o processo ficar o mais leve possível.

Agradeço a Cristiane, Cecília, Lucas, Isael, Adrian, Lucas, Deyne, todos do laboratório de síntese da física e também do setor de microbiologia que perpassaram por mim durante o processo me ensinando, auxiliando e dispondo de recursos laboratoriais.

A minha família que não tiveram as mesmas oportunidades, mas que fizeram de tudo sem relutar para que eu vivenciasse a graduação da melhor forma possível, que compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. A minha mãe que sempre me incentivou por meio de exemplos a buscar meus sonhos, a ser independente, a abraçar as oportunidades, a buscar por conhecimento e que nunca deixou de acreditar na minha capacidade. Ao meu pai sempre preocupado com meu bem-estar no meio desse processo e que compartilhou suas vivências a respeito da biologia comigo. Ao meu irmão que me apoiou e auxiliou nos desafios do dia a dia adulto. Ao meu companheiro leão que me recebia com amor e felicidade ao retornar para casa.

A todos aqueles que se fizeram rede de apoio durante o processo por meio de uma escuta acolhedora Taynara, Gabriel, Letícia, Lays, Vitória e Lara, além de todos meus amigos que perpassaram por mim durante a graduação enriquecendo a vivência e tornando tudo mais leve.

Ao projeto Dança Compasso e movimento da UFLA, pois todos os membros da equipe e companheiros feitos por meio desse me proporcionaram momentos de alegria ao final de dias cansativos durante o processo, torceram por mim e me auxiliaram na preparação técnica para apresentação, além de proporcionar minha saúde mental e física.

A todos professores que exerceram seu processo de ensino com paixão e brilho no olhar durante minha formação me incentivando a continuar essa caminhada, principalmente Renata, Giancarla e Giovana.

Por fim dedico esse trabalho a todas as mulheres negras e fortes que foram resistência para que hoje eu ocupasse esse espaço, as minhas antepassadas que lutaram com força e garra, em especial a minha avó que mesmo em meio a uma história de sofrimento me ensinou a ver a beleza nas pequenas coisas da vida com muita alegria.

RESUMO

A multirresistência de bactérias patogênicas tem se proliferado por todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública. Portanto, novos antibióticos vêm sendo amplamente estudados a fim de superar este problema, dentre os quais podemos citar os antibióticos feitos de fontes naturais, tais como extrato de plantas e polímeros naturais como a quitosana. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de nanopartículas de quitosana e do extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana, sobre *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*. Para alcançar esse propósito, foram preparados extratos de *K. daigremontiana*, sintetizadas nanopartículas de quitosana bem como nanopartículas de quitosana ancorando o extrato preparado. O extrato hidroalcolico de *K. daigremontiana* foi feito por maceração das folhas secas enquanto as nanopartículas de quitosana foram obtidas através do método de gelificação iônica, usando como agente reticulante o tripolifosfato de sódio (TPP). A avaliação do efeito antibacteriano foi feita pelos métodos de disco-difusão e microdiluição. A caracterização morfológica das nanopartículas de quitosana feita por Microscopia Eletrônica de Varredura indicaram que através do método de gelificação iônica foi possível a obtenção de nanopartículas de quitosana com morfologia esférica, cujos tamanhos variaram entre 110 e 160 nm, quando sintetizadas com pH entre 5,5 e 6,0 e proporção em massa entre quitosana e tripolifosfato de sódio de 4:1. Através da análise espectroscópica de Infravermelho por Transformada de Fourier. As análises microbiológicas sugerem que o efeito do extrato e da quitosana, separadamente, promoveram inibição sobre *Salmonella enteritidis*. No entanto, quando analisado o efeito do conjunto quitosana/extrato observa-se que não houve inibição do crescimento bacteriano nas condições testadas. Em *Bacillus cereus* os resultados mostram inibição apenas com o tratamento da quitosana pura. A partir destes resultados, é possível concluir que as nanopartículas de quitosana apresentam potencial antibacteriano para essas bactérias, nas condições testadas. No entanto, se faz necessário abordar outras metodologias que viabilizem a quantificação de eficiência do extrato em relação ao microrganismo.

Palavras - Chave: Nanomaterias. Biopolímeros. Antimicrobiano. *Bryophyllum daigremontianum*. *Salmonella enteritidis*. *Bacillus cereus*. *Crassulaceae*.

ABSTRACT

Multidrug resistance of pathogenic bacteria has proliferated throughout the world, representing a serious public health problem. Therefore, new antibiotics have been widely studied in order to overcome this problem, among which we can mention antibiotics made from natural sources, such as plant extracts and natural polymers such as chitosan. In this context, this study aimed to evaluate the effect of chitosan nanoparticles and the extract encapsulated in chitosan nanoparticles on *Salmonella enteritidis* and *Bacillus cereus*. To achieve this purpose, extracts of *K. daigremontiana* were prepared, chitosan nanoparticles were synthesized as well as chitosan nanoparticles anchoring the prepared extract. The hydroalcoholic extract of *K. daigremontiana* was made by macerating the dried leaves while the chitosan nanoparticles were obtained through the ionic gelation method, using sodium tripolyphosphate (TPP) as a crosslinking agent. The antibacterial effect was evaluated using disk diffusion and microdilution methods. The morphological characterization of chitosan nanoparticles carried out by Scanning Electron Microscopy indicated that, through the ionic gelation method, it was possible to obtain chitosan nanoparticles with spherical morphology, whose sizes varied between 110 and 160 nm, when synthesized with pH between 5.5 and 6.0 and a mass ratio between chitosan and sodium tripolyphosphate of 4:1. Through Fourier Transform Infrared spectroscopic analysis. Microbiological analyzes suggest that the effect of the extract and chitosan, separately, promoted inhibition on *Salmonella enteritidis*. However, when analyzing the effect of the chitosan/extract set, it was observed that there was no inhibition of bacterial growth under the conditions tested. In *Bacillus cereus* the results show inhibition only with pure chitosan treatment. From these results, it is possible to conclude that chitosan nanoparticles have antibacterial potential for these bacteria, under the conditions tested. However, it is necessary to address other methodologies that make it possible to quantify the efficiency of the extract in relation to the microorganism.

Keywords: Nanomaterials. Biopolymers. Antimicrobial. *Bryophyllum daigremontianum*. *Salmonella enteritidis*. *Bacillus cereus*. Crassulaceae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	3
Figura 2- Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana 96.	6
Figura 3- Comparação entre bactérias gram-positivas e negativas. (a,b) Diagramas comparativos de parede, (c, d) Micrografias eletrônicas de transmissão dessas, (e, f) Micrografias eletrônicas de varredura mostrando diferença textual.	8
Figura 4- Estrutura do lipossacarídeo de bactérias gram-negativas	8
Figura 5- Subespécies de <i>Salmonella enterica</i> e 17 sorovares testados quanto à virulência em camundongos.	10
Figura 6- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Salmonella enteritidis</i>	11
Figura 7- Os cinco principais clados filogenéticos do grupo <i>Bacillus cereus</i>	12
Figura 8- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Bacillus cereus</i> , 5 µm.....	13
Figura 9- <i>Bacillus Cereus</i> em coloração de Gram - Microscopia óptica de campo claro 100x	13
Figura 10- Reservatórios ambientais, vias de transmissão e manifestações clínicas associadas à infecção por <i>Bacillus cereus</i>	14
Figura 11- Representação esquemática dos principais mecanismos de ação das quitosanas frente a micro-organismos.	15
Figura 12- Foto da <i>Kalanchoe Daigremontiana</i> utilizada.	16
Figura 13- Produção do extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> – A. folhas do extrato lavadas, B. folhas do extrato secas e pesadas, C. pesagem de folhas do extrato, D. maceração usando pistilo e almofariz.....	17
Figura 14- Extrato de <i>K. daigremontiana</i> no rotaevaporador.....	18
Figura 15- Síntese de nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica - A quitosana dissolvendo em ácido acético no agitador magnético, B/C/D nanopartículas formadas em suspensão.	19
Figura 16- Extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> encapsulado em nanopartículas de quitosana.....	20
Figura 17- Coloração de gram- feita nas colônias reativadas – A. Lâmina de <i>Salmonella enteritidis</i> na objetiva de 100x, B Lâmina de <i>Bacillus cereus</i> na objetiva de 100x.	21

Figura 18- Estrias compostas em Muller Hilton – A. <i>Bacillus cereus</i> , B- <i>Salmonella enteritidis</i> em meio Muller Hilton	22
Figura 19-Eletromicrografia de Varredura. A, B- Nanopartículas de Quitosana 4:1(CS/TPP), aumento de 2µm e 500 µm respectivamente. C.D - Nanopartículas de quitosana 4:1(CS/TPP) associadas a extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> , 2µm e 500µm respectivamente.....	24
Figura 20- FTIR. (A) nanopartículas em pó. (B) nanopartículas diluídas. (C) nanopartículas associadas a extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	26
Figura 21- Halos formados no tratamento quitosana/extrato em <i>Salmonella enteritidis</i>	26
Figura 22- Controle negativo do cultivo em placas contendo o meio Ágar Müller Hilton.	27
Figura 23- a. Controle positivo de <i>Salmonella enteritidis</i> , b. Tratamento extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> , c. Tratamento nanopartículas quitosa associadas ao extrato, d. Tratamento de nanopartículas de quitosana.....	28
Figura 24- a. Controle positivo de <i>Bacillus cereus</i> , b. Tratamento do extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> , c. Tratamento de nanopartículas de quitosa associadas ao extrato, d. Tratamento de nanopartículas de quitosana.....	29
Figura 25- Estrutura e interação proposta para nanopartículas.	30

QUADROS

Quadro 1: Compostos e funções isoladas de algumas plantas do gênero <i>Kalanchoe</i>	4
Quadro 2: Concentrações dos tratamentos usados no experimento.	23

TABELAS

Tabela 1: Relação entre os valores médios dos halos formados no cultivo de <i>Salmonella enteritidis</i> e os respectivos tratamentos.	26
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivo geral	2
1.2	Objetivos específicos	2
2	REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	2
2.2	Extrato hidroetanólico de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	3
2.3	Quitosana	5
2.4	Bactérias patogênicas	7
2.5	<i>Salmonella enteritidis</i>	9
2.6	<i>Bacillus cereus</i>	11
2.7	Mecanismo quitosana-microrganismos	15
3	MATÉRIAS E MÉTODOS	16
3.1	Obtenção dos extratos	16
3.2	Produção de nanopartículas de quitosana	18
3.3	Encapsulamento do extrato em nanopartículas de quitosana por gelificação iônica	19
3.4	Análise das nanopartículas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura	20
3.5	Espectroscopia na região infravermelho (FTIR)	21
3.6	Condições de cultivo e obtenção do inóculo	21
3.7	Teste de disco difusão/poço	22
3.8	Teste de microdiluição adaptado	23
4	RESULTADOS	23
4.1	Caracterização morfológica das amostras	23
4.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	24
4.3	Teste de disco difusão	26
4.4	Teste de microdiluição	27
5	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	29
5.1	Espectroscopia de Infravermelho (FITR)	29
5.2	Caracterização e morfologia (MEV)	30
5.3	Metodologias de avaliação de efeito antibacteriano	30

5.4	Efeito do extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> sobre as bactérias	31
5.5	Efeito das nanopartículas de quitosana sobre as bactérias.....	32
5.6	Efeito das nanopartículas de quitosana associadas ao extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> sobre as bactérias	34
6	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Entre os anos de 2016 e 2019, 37.247 pessoas (média de 9.312 casos/ano) foram acometidas por doenças transmitidas pela água e pelos alimentos. Os patógenos responsáveis prevalentes foram *Escherichia coli* com 35,7%, *Salmonella* com 14,9%, *Staphylococcus* com 11,5%, *Norovirus* com 8,3%, *Bacillus cereus* com 7,4% e *Rotavirus* com 6,9%, entre outros, com menos de 6% cada (BRASIL, 2020). Além disso, esses casos podem estar relacionados a resistência aos antibióticos, pois devido ao seu uso indiscriminado, muitas bactérias têm se tornado multirresistentes (VAN & PATERSON, 2016). Assim, segundo dados da OMS, caso não sejam tomadas ações efetivas para controlar os avanços da resistência aos antimicrobianos, estima-se que até 2050 dez milhões de vidas serão perdidas anualmente em todo o mundo, com prejuízos que chegam em torno de 100 trilhões de dólares (FORTES, 2021). Portanto, faz-se necessário o estudo de novas substâncias capazes de inibir uma ou mais espécies de microrganismos, priorizando-se o uso de materiais provenientes de fontes naturais como é o caso dos extratos vegetais e polímeros naturais como a quitosana.

Nas últimas décadas, foram identificados compostos antibacterianos e antifúngicos nas plantas da espécie de *Kalanchoe*. Dentre as espécies do gênero *Kalanchoe*, *Kalanchoe daigremontiana* é uma espécie negligenciada, pois existe uma carência de estudos que relatem sua composição e atividade antibacteriana. Assim, a maioria dos estudos centram-se em algumas espécies como *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe crenata*, *Kalanchoe blossfeldiana* e *Kalanchoe laciniata* (RICHWAGEN et al., 2019).

Assim por exemplo, é bem conhecido que a *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe daigremontiana* são plantas medicinais que contêm flavonóides (dentre eles quercetina e kaempferol), flavonas (como a luteolina) e bufadienolídeos (PINHEIRO et al., 2017; SOUSA et al., 2023; GODINHO 2023), os quais podem inibir o crescimento de cepas de bactérias patogênicas, diminuir a síntese de proteínas ou inibir a expressão de genes relacionados à resistência antimicrobiana (KOWALSKI, 2020). Segundo Perim et al. (2018), a espécie *K. pinnata* apresenta inibição sobre espécies do gênero *Staphylococcus* (*S. aureus*: 40,91%; *S. saprophyticus*: 42,86%), *Streptococcus* (*S. pyogenes*: 100%; *S. agalactiae*: 50%), *Enterobacter* spp. (33,33%), *Pseudomonas* spp (28,57%). e *Proteus* spp (28,57%). A espécie *Kalanchoe daigremontiana* apresenta compostos bioativos tais como a flavona e taninos que agem contra infecções microbianas (MAGALHÃES et al., 2023).

Recentemente, as aplicações de nanomateriais na medicina tem atraído grande interesse devido ao seu potencial como plataformas eficazes na prevenção e tratamento de infecções microbianas resistentes, principalmente quando associadas com outros materiais, tornando-se assim um veículo de diversos fármacos. Particularmente, nanopartículas de quitosana tem apresentado excelentes propriedades antibacterianas (EL-NAGGAR et al., 2022; MATTOS et al., 2020; GOMEZ et al., 2013; LARANJEIRA & FAVÉRE 2009).

Nanopartículas de quitosana vem sendo utilizadas não apenas para proteger os compostos bioativos dos extratos da degradação por contato direto com diferentes fatores ambientais, mas também para preparar novos materiais na nanoescala que apresentem propriedades promissoras em relação às misturas tradicionais (ASSIS et al., 2012). Nesse sentido, o presente trabalho tem como principal objetivo a preparação do extrato de *Kalanchoe daigremontiana*, de nanopartículas de quitosana e do extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana a fim de avaliar seu efeito sobre as bactérias *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*.

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de nanopartículas de quitosana e do extrato de *K. daigremontiana* associados e separados, sobre *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*;

1.2 Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas de quitosana adequadas para uso em bactérias de acordo com tamanho e pH;
- Descobrir se o nanoencapsulamento usando biopolímero quitosana é eficaz;
- Realizar análises nas nanopartículas de quitosana, como microscopia eletrônica de varredura e infravermelho;
- Produzir extratos sem presença de etanol;
- Observar o comportamento de bactérias gram negativas e gram positivas diante de nanopartículas de quitosana pura, do extrato puro e também do conjunto nanopartículas de quitosana/extrato por meio da metodologia de disco difusão e também do teste de microdiluição adaptada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Kalanchoe daigremontiana*

A espécie *Kalanchoe daigremontiana* foi descrita por Raym, Hamet & H. Pierrer (1914), e é conhecida também pelo sinônimo homotípico *Bryophyllum daigremontianum*. Pertencente à família *Crassulaceae* e originária de Madagascar, esta espécie já foi introduzida em diversos locais, como o Brasil, o Alabama, a Bolívia e a Espanha. Isso porque apresenta alta capacidade de se espalhar e colonizar rapidamente novos habitats e nichos através da dispersão extremamente eficaz, uma vez que suas folhas produzem um enorme número de plântulas. Tal característica a fez ser conhecida popularmente como Mãe de milhares (POWO, 2023; SMITH 2019).

Muitos são os estudos acerca desse gênero, o extrato bruto da planta tem sido estudado no tratamento oncológico e também de doenças infecciosas que tenham origem fúngica, viral ou bacteriana, devido às suas propriedades antimicrobianas (ÜRMÉNYI et al., 2016; STEFANOWICZ-HAJDUK et al., 2022; RIVERO-PEREZ et al., 2022). Além disso, na medicina popular as folhas são usadas em saladas, sucos e chás para tratamento de câncer, abscessos, hipertensão, cólica renal, diarreia entre outras doenças (BRASIL, 2018).

Figura 1 - *Kalanchoe daigremontiana*.



Fonte: Silva & Cunha. (2021)

2.2 Extrato hidroetanólico de *Kalanchoe daigremontiana*

Poucos estudos relatam sobre os extratos da espécie *Kalanchoe daigremontiana* isoladamente, contudo existem informações sobre os extratos do gênero *Kalanchoe spp.*

Segundo estudo de Rivero-Perez et al., (2022) cada espécie se destaca em uma linha de pesquisa de acordo com sua função e compostos presentes no extrato assim como mostrado no Quadro 1.

Quadro 1: Compostos e funções isoladas de algumas plantas do gênero *Kalanchoe*.

Espécies	Compostos isolados	Função	Referência
<i>Kalanchoe pinnata</i>	KPB-100 e KPB-200	Inibidores de HHV-2 e VACV	Cryer et al., 2017
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Briofilina C	Inseticida	Supratman et al., 2000
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> × <i>tubiflora</i>	Daigremonato de Metila	Inseticida	Supratman et al., 2001
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> × <i>butiflora</i>	Briofilina A	Atividade antitumoral	Supratman et al., 2001
<i>Kalanchoe prolifera</i>	Kaempferol, quercetina, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosídeo, kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosídeo, kaempferol-3-O-α-L-ramnosídeo, quercetina-3-O-soforisídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo	Atividade citotóxica contra células leucêmicas	Aisyah et al., 2017
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Flavonóides em extrato de metanol	Atividade antidiabética <i>in vitro</i>	George et al., 2018
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	11α,19-di-hidroxitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, bersaldegenina-1, 3,5-ortoacetato, 19-acetiloxi-11α-hidroxi-12-oxo-telocinobufagina, 19-acetiloxi-1β-hidroxitelocinobufagina	Antioxidante	Kolodziejczyk-Czepas et al., 2016
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bufadienólídeos como 11α,19-diidroxitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, daigredorigenina-3-acetato,	Inibição da atividade amidolítica da trombina	Kolodziejczyk-Czepas et al., 2017
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato	Aumentar a apoptose em células danificadas e promover a morte celular	Stefanowicz-Hajduk et al., 2020
<i>Kalanchoe pinnata</i>	quercitrina	Atividade antileishmania	Muzitano et al., 2006
<i>Kalanchoe thysiflora</i> <i>Kalanchoe marmorata</i>	3-oxo-oleano-12-eno, β-sitosterol	Atividade citotóxica seletiva em células MCF7	Singab et al., 2012
<i>Kalanchoe tubiflora</i>	dimalato de kalanchosina	Atividade citotóxica	Huang et al., 2013
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato	Atividade de inibição enzimática <i>in vitro</i> , para produtos farmacêuticos modernos	Prasad Pandey et al., 2020

Fonte: Rivero- Perez et al. (2022)

É possível observar atividade antimicrobiana na maioria das espécies do gênero como apresentado no estudo de Stefanowicz- Hajduk *et al.* (2020), que revelou uma maior atividade antibacteriana do extrato de *Kalanchoe blossfeldiana*, seguida do extrato de *Kalanchoe pinnata* que apresentou maior atividade em *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus hirae* e entre todos os extratos etanólicos testados, *Kalanchoe daigremontiana* apresentou atividade mais fraca. No caso dos extratos aquosos de *Kalanchoe*, todas as espécies revelaram valores de concentração mínima inibitória $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ para as cepas de bactérias.

O extrato bruto de *Kalanchoe daigremontiana* apresenta propriedades biológicas como efeitos anti-diabéticos, anti-helmínticos e antimicrobianos (RIVERO-PÉREZ et al., 2022; KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2017). As raízes da planta são ricas em bufadienólídeos e também apresentam flavonóides (MONIUSZKO-SZAJWAJ et al., 2016; STEFANOWICZ-HAJADUK et al., 2020; SILVA & CUNHA 2021). Os diferentes tipos de extrato dessa planta apresentam diferentes composições químicas e, portanto, propriedade específicas. Assim, os extratos aquosos e etanólicos apresentam importante atividade antioxidante e anti-inflamatória, enquanto as frações ricas em bufanoaldeídos ou diclorometano apresentam ação anticancerígena e anticoagulante (FAUSTINO et al., 2022). Assim, por exemplo, foi observado

que o extrato metanólico do caule e das folhas apresentou atividade antiparasitária sobre as cepas de *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis* (ELIZONDO-LUÉVANO et al., 2021). Segundo Rivero-Perez et al., 2022, o extrato hidroalcoólico da planta é eficaz contra *Haemonchus contortus*, inibindo a eclosão de seus ovos e motilidade larval e também mostra eficácia no crescimento de *Bacillus subtilis* e *Streptococcus aureus*, indicando seu potencial como um tratamento alternativo nesses casos.

Para obter-se extratos de uma planta existem duas etapas no processo de extração, sendo que a primeira envolve a separação dos metabólitos secundários da planta por meio de um solvente e a segunda consiste na concentração por meio da eliminação do solvente, que em geral é feita por evaporação. Assim, a produção do extrato das folhas de *Kalanchoe daigremontiana* apresentam uma metodologia geral que consiste na lavagem e secagem em estufa a 40 °C por 15 dias, seguida do tritramento das folhas e adição do solvente, que pode ser álcool (álcool etílico ou metanol), etanol ou solução água etanol, formando assim extratos diferentes de acordo com o solvente. As folhas trituradas ficam imersas no solvente durante um tempo que pode variar de acordo com trabalho e em seguida a mistura é filtrada e concentrada em rotaevaporador a 70 °C para a retirada do solvente (SILVA & CUNHA, 2021; SILVA et al., 2022; RIVERO-PEREZ et al., 2022).

2.3 Quitosana

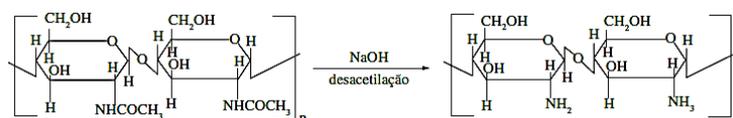
A quitosana é originária da quitina, que é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Nesse sentido, a quitina é encontrada majoritariamente no esqueleto dos artrópodes como crustáceos, insetos além disso essa faz parte da parede celular dos organismos do reino fungi como leveduras e fungos filamentosos (PENICHE et al., 2008). Esse material apresenta diversas características que o faz interessante como alvo de estudos como ser um polissacarídeo catiônico, biodegradável, biocompatível e não tóxico. O processo de reticulação da quitosana pode ser feito usando tripolifosfato de sódio (TPP) para formar as nanopartículas, sendo considerada uma alternativa promissora para diferentes campos como a medicina e biotecnologia (AZEVEDO et al., 2007).

Nanopartículas de quitosana têm sido usadas como carreadores ou suportes para as interações celulares, principalmente devido a suas propriedades de adesão com células, essa característica depende das suas propriedades físico-químicas, entre as quais encontra-se o tamanho de partículas. Portanto, a obtenção de nanopartículas com controle no tamanho de

partícula através do método de preparação se faz necessário (HEJJAJI; SIMITH; MORRIS, 2018).

O processo de obtenção da quitosana se dá pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é composta pelas unidades monoméricas de β -(1 \rightarrow 4) - 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1 \rightarrow 4) - 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, possuindo, assim, uma estrutura cristalina altamente organizada, como comprovada por difração de raios-X. Dessa forma, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização (MUZZARELLI, 1973).

Figura 2- Reação de desacetilação da quitina, originando a quitosana 96.



Fonte :Trovatti et al. (2016)

Cada dia mais a quitosana tem constituído uma classe emergente de biomateriais com aplicações em vários campos biomédicos, tais como, regeneração tecidual, particularmente para cartilagem; dispositivos de liberação controlada de fármacos e sistemas de imobilização de células em gel (AYLA., et al 2008; SEVERO et al., 2022; MUXIKA et al., 2017; PENHA et al., 2020).

A literatura destaca que a quitosana apresenta uma extensa gama de aplicações na área biomédica com a justificativa de que este biopolímero e também seus derivados são facilmente moldados em várias formas e além disso, são biodegradados pela lisoenzima presente no corpo humano. Nesse sentido, este biomaterial torna-se um candidato interessante como sistema de liberação controlada para uma variedade de fármacos. Faz-se necessário frisar que os arcabouços de quitosana são materiais inovadores na engenharia de tecidos, usados para reparar ou manter tecidos do corpo (PENHA et al., 2020; FERNANDES et al., 2020).

Além disso, esse biopolímero tem demonstrado ser eficaz como analgésico em feridas abertas, pois este quando associado a fármacos analgésicos como a morfina e a anti-inflamatórios como o naproxeno melhora a biodisponibilidade e a atividade analgésica destes fármacos. Assim, é evidente que essas propriedades junto com a não-toxicidade, tornam a quitosana um fascinante e promissor biomaterial para a indústria farmacêutica, para aplicações presentes e futuras. (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

A quitosana apresenta solubilidade em soluções ácidas, exemplos disso são os ácidos: clorídrico, acético e fórmico sendo sua solubilidade dependente da força iônica do meio, do pH, do grau de desacetilação da quitosana e de sua massa molar média, portanto, essas qualidades devem ser determinadas previamente para seu uso como biomaterial (BERGER et al., 2004). Ela é insolúvel em água, isso porque ela é um polímero catiônico e em condições de pH neutro e alcalino apresenta grupos amino livres. Já quando em meio ácido, os grupamentos amino podem ser protonados, tornando o polissacarídeo solúvel na faixa de pH entre 2,0 e 6,0 (GOMES, 2007). A alcalinização da solução aquosa de quitosana a valores de pH superiores a 6,2 sistematicamente leva à formação de precipitados gelificados (SORLIER et al., 2003).

2.4 Bactérias patogênicas

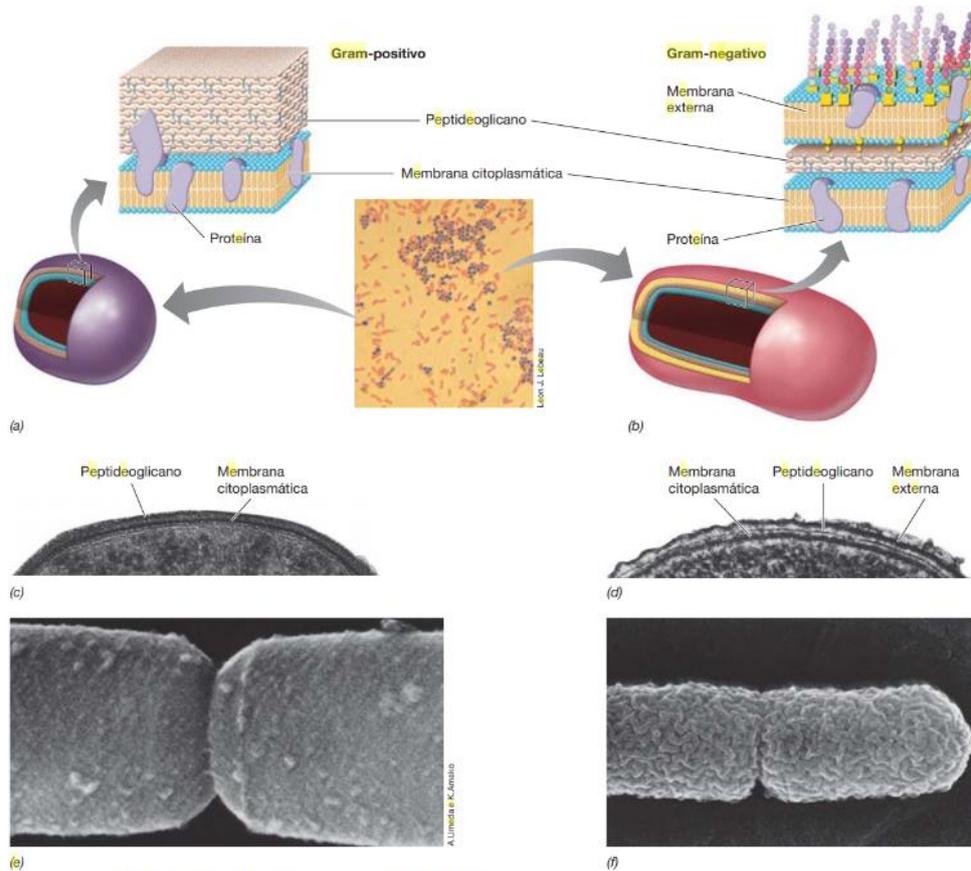
Um patógeno é um microrganismo capaz de causar uma doença em seu hospedeiro. Assim, as bactérias patogênicas são capazes de invadir células e tecidos, sobrevivendo ao sistema imunológico do hospedeiro. Essas bactérias se caracterizam por sua capacidade de disseminação, aderência, persistência e toxigenicidade. Alguns desses organismos apresentam virulência alta, que é a capacidade quantitativa de um agente provocar doença (RIEDEL et al., 2022).

Existem várias formas de classificação de bactérias, que englobam desde metodologias mais simples, até as polifásicas, as quais consideram múltiplas características para classificar um organismo (metabólicas, moleculares, morfológicas e fisiológicas, por exemplo). A forma mais simples de classificação das bactérias é se dá morfológicamente, por meio da sua estrutura de parede, na qual podemos agrupá-las em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Para identificar o tipo de parede celular bacteriana é necessário realizar a coloração de Gram. Essa coloração permite diferenciar estes dois grupos, uma vez que as bactérias Gram-positivas são capazes de reter o corante cristal violeta no citoplasma, diferentemente das bactérias Gram-negativas (BLACK & BLACK, 2021).

As paredes celular das Gram-positivas possuem uma camada única formada por várias camadas sobrepostas com grande quantidade de peptidoglicanos em sua composição e embebido nos peptidoglicanos podemos encontrar proteínas ácidas (ácidos lipoteicoicos). As bactérias Gram-negativas, por sua vez, possuem pelo menos duas camadas, uma composta por poucos peptidoglicanos (que é mais delgada em relação as Gram-positivas) e outra chamada membrana externa composta por lipossacarídeos e lípidos. Assim, a parede das Gram-positivas é mais complexa do ponto de vista químico, essas bactérias não possuem ácidos lipoteicoicos,

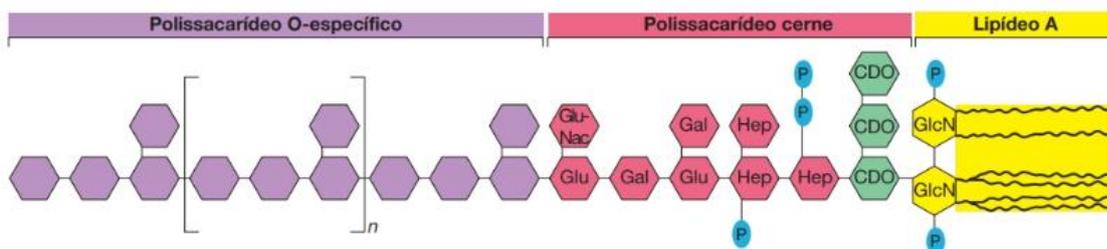
o que as tornam mais suscetíveis a rompimentos mecânicos, entretanto algumas funções desses ácidos são compensadas pela presença da membrana externa. (MADINGAN et al., 2016; MOREIRA et al., 2015).

Figura 3- Comparação entre bactérias gram-positivas e negativas. (a,b) Diagramas comparativos de parede, (c, d) Micrografias eletrônicas de transmissão dessas, (e, f) Micrografias eletrônicas de varredura mostrando diferença textural.



Fonte: Madigan et al. (2016)

Figura 4- Estrutura do lipossacarídeo de bactérias gram-negativas



Fonte: MADIGAN et al. (2016)

Além disso, características como morfologia, coloração de Gram, encapsulamento e necessidade de oxigênio, localização do patógeno (intracelular obrigatório, intracelular facultativo, extracelular obrigatório e extracelular facultativo). Os patógenos intracelulares facultativos são capazes de viver e se reproduzir tanto dentro quanto fora das células hospedeiras, exemplos desses patógenos incluem *Salmonella typhi*, *Brucella espécies*, *Francisella tularensis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella* e *Mycobacterium tuberculosis* (WERTH, 2022). Encontram-se entre os principais grupos de bactérias que causam doenças em humanos segundo esquema de identificação do Bergey's manual of determinative bacteriology, *Escherichia*, *Shigella*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*.

Patógenos produzem componentes tóxicos e essa toxicidade é associada à camada de lipossacarídeo, particularmente, ao lipídeo A. O termo endotoxina refere-se a esse componente tóxico do lipossacarídeo. Algumas endotoxinas provocam sintomas violentos em seres humanos, incluindo gases, diarreia e vômitos, as endotoxinas produzidas por *Salmonella* e linhagens enteropatogênicas de *E. coli* transmitidas por meio de alimentos contaminados são exemplos clássicos disso (MADIGAN et al., 2016).

A capacidade de um patógeno de produzir uma doença é intitulada como patogenicidade, essa depende da capacidade do patógeno de invadir o hospedeiro, multiplicar-se no seu interior e também desviar-se das defesas do hospedeiro. Alguns agentes patogênicos causam doenças quando entram no hospedeiro e outros só causam doenças em raras ocasiões, em geral, em hospedeiros com sistema imunológico comprometido (GRANATO et al., 2020).

A patogenicidade é influenciada pelo número de organismos infecciosos que penetram no corpo. Assim, se um pequeno número entrar, as defesas do hospedeiro podem ser capazes de eliminar os organismos mesmo antes que possam causar doença. Entretanto, se um alto número entrar, esses organismos podem superar as defesas do hospedeiro e causar doença. Alguns organismos são altamente infecciosos, como *Shigella*, por exemplo, que necessita somente de 10 organismos ingeridos para causar um quadro grave de disenteria. (BLACK & NBLACK, 2021).

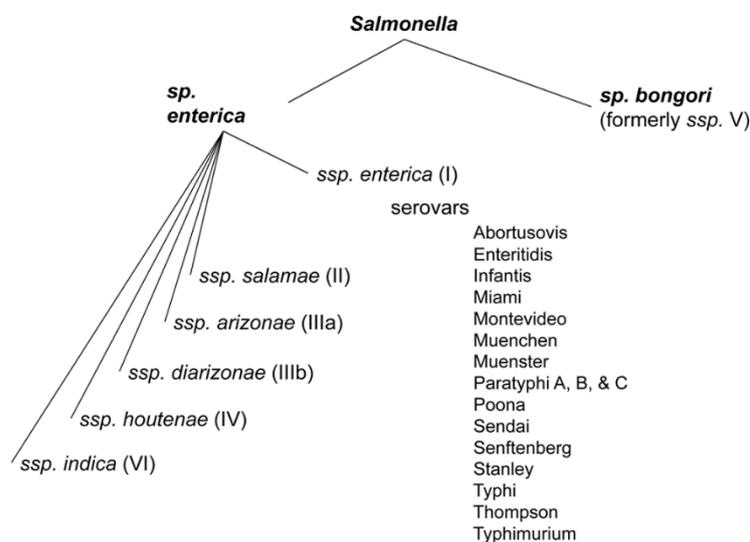
2.5 *Salmonella enteritidis*

A classificação da *Salmonella* é complexa, por isso ela não segue a forma de classificação clássica. Assim, o gênero está dividido em duas espécies, *Salmonella bogori* e *Salmonella enterica* e cada uma dessas apresentam subespécies e essas subespécies, por sua

vez, são divididas em sorotipos, assim como mostrado na figura 5. A *Salmonella enterica* é a de maior importância para saúde pública e se divide em seis subespécies: *S. enterica enterica*; *S. enterica salamae*; *S. enterica arizonae*; *S. enterica diarizonae*; *S. enterica houtenae*, *S. enterica indica* (RIEDEL et al., 2022)

Os isolados são ainda subdivididos em sorotipos de acordo com a classificação Kauffman-White, baseada nos seus antígenos flagelares (H) e somáticos (O) ou utilizando-se abordagens de sorotipagem baseadas no conhecimento de seus genomas. Assim, o sorovar *enteritidis* pertence a espécie e subespécie *enterica* (BANERJI et al., 2020; GRIMONT & WEILL, 2007; GRANATO et al., 2020; RIEDEL et al., 2022).

Figura 5- Subespécies de *Salmonella enterica* e 17 sorovares testados quanto à virulência em camundongos.

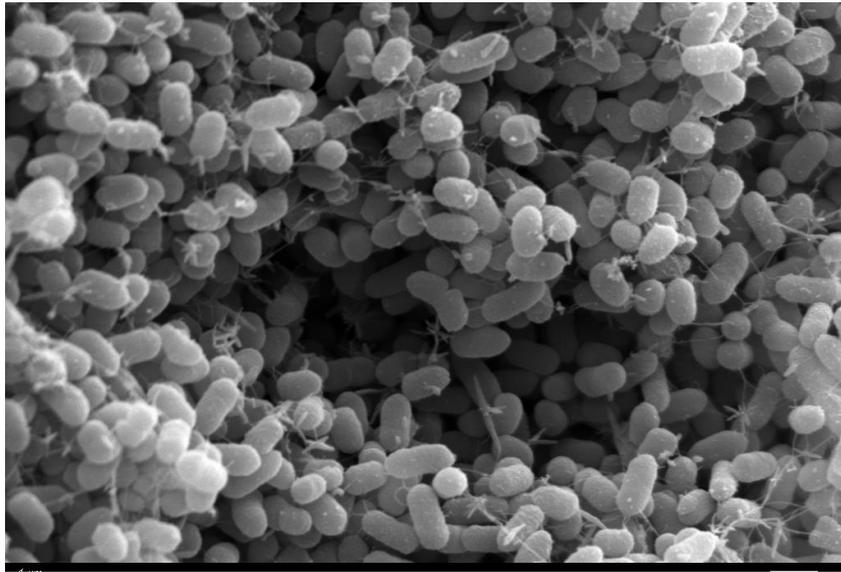


Fonte: Swearingen et al. (2012)

O gênero *Salmonella* é composto por bactérias gram-negativas, assim apenas uma pequena quantidade da parede celular total consiste em peptidoglicano, enquanto a maior parte é composta pela membrana externa e essas contêm polissacarídeos, de modo que o lipídeo e o polissacarídeo estão ligados em um complexo. Essas bactérias têm um tamanho de 1 a 2 µm na forma de bastonetes curtos, assim como mostrado na figura 6. Elas podem ou não crescer na presença de oxigênio, sendo, assim, anaeróbias facultativas. A maioria das espécies apresenta mobilidade e flagelos. Esse grupo fermenta a glicose, produzindo, ácido e gás, entretanto elas são incapazes de metabolizar lactose e sacarose. A temperatura ótima de multiplicação é de 38° C e a mínima fica em torno de 5° C. Como esse grupo não forma endósporos, são relativamente termosensíveis, podendo ser destruídas a 60 °C, de 15 a 20 minutos. (RIEDEL et al., 2022; MADIGAN, et al., 2016; BLACK & NBLACK, 2021).

Um dos principais patógenos que causam salmonelose humana no mundo é a *Salmonella enterica* sorovar *Enteritidis* (JAJERE, 2019). *Salmonella enteritidis* está adaptada às espécies comerciais de aves (principalmente *Gallus Gallus*) e aos ambientes avícolas por isso os surtos causados por essa bactéria tem origem alimentar ligados ao consumo de ovos e carne de frango mal-cozida. (ANTUNES et al., 2016; FORSYTHE, 2013).

Figura 6- Micrografia eletrônica de varredura (MEV) de *Salmonella enteritidis*



Fonte: Fernanda Oliveira Barbosa/ Prof. Ângelo Berchieri Júnior (Laboratório de Ornitopatologia - FCAV/ Unesp).

2.6 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus são bactérias Gram-positivas (MADIGAN, 2016), aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, tem a forma de bastonetes, assim como mostrado na figura 8 e 9, capacidade de colonizar insetos e mamíferos através de seus esporos, células vegetativas presentes em alimentos ingeridos, no ar inalado ou mesmo por meio de feridas (TUIPULOTU et al., 2020).

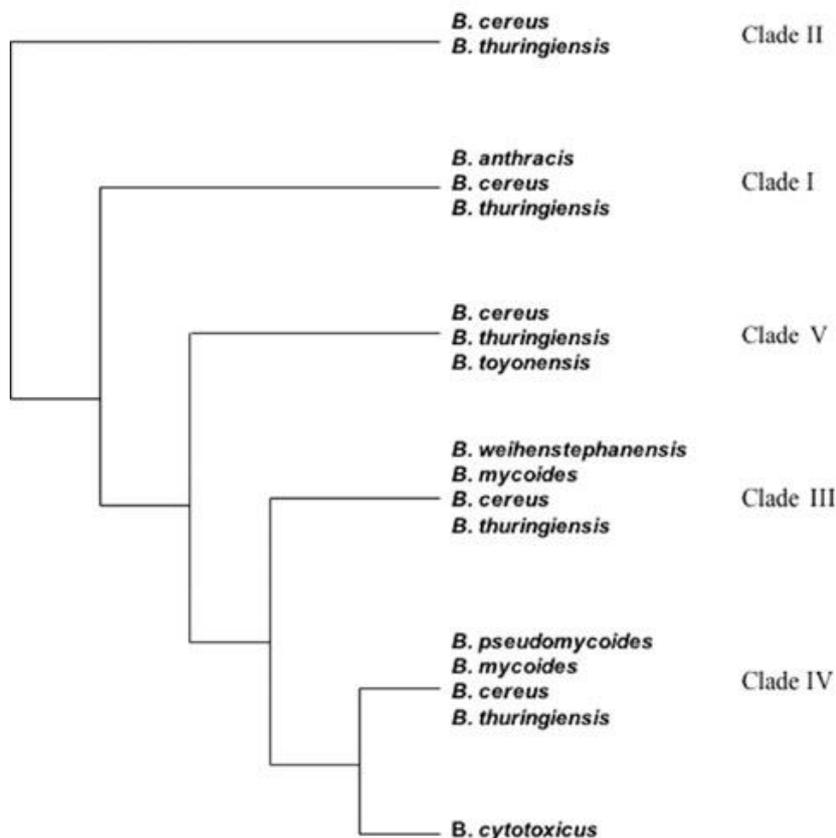
Esse grupo é característico por formar esporos altamente resistentes, isso faz com ele tenha sucesso prevalecendo em uma ampla variedade de alimentos, tornando-se um perigo para a segurança alimentar a exemplo do estudo feito por Alvarado et al., (2020), pois segundo ele essa bactéria está presente no arroz cozido em quantidades inferiores a que causa riscos à saúde, entretanto com abuso de calor no armazenamento desses, como geralmente acontece, pode haver o crescimento desses indivíduos. Assim, esse microrganismo tem seu principal

reservatório o solo, mas, também, pode ser isolado da vegetação e da água (JOVANOVIC et al., 2021; RAMARÃO et al., 2020).

Essa bactéria está envolvida em surtos pelo Brasil (SILVA et al.2017) e também pelo mundo, como a exemplo de um grave surto nos Estados Unidos quando esse foi reconhecido como agente epidemiológico após ser isolado de molhos caseiros. (SAVINI et al., 2016). Por contaminar diversos alimentos como fórmulas infantis, cereais infantis de arroz, produtos lácteos em pó, carne e especiarias as cepas dessas espécies causam intoxicações relevantes e graves com uma dose infecciosa tão baixa quanto 10^3 UFC/g de alimento, por isso investigações a respeito da melhor forma de detectar a sua presença na indústria de alimentos e em ambientes hospitalares faz-se relevante (RAMARÃO et al., 2020).

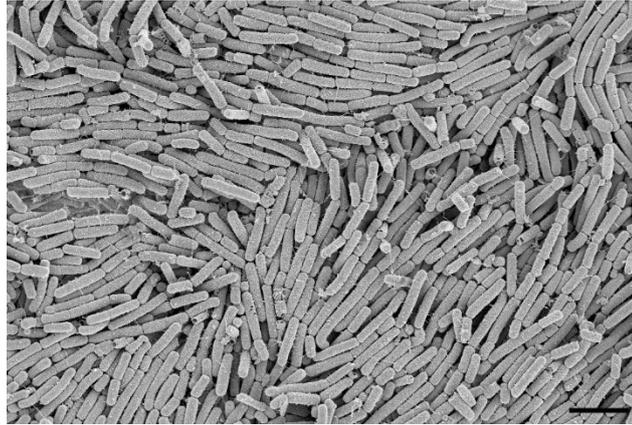
As cepas de *Bacillus cereus* são extremamente relacionadas filogeneticamente com base nas análises 16S rRNA para várias outras espécies do gênero *Bacillus*. Assim, o grupo *Bacillus cereus* sensu lato se refere a um conjunto de microrganismos incluindo oito espécies *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. citotóxico* e *B. toyonensis* que são estirpes com semelhança de mais de 97% no DNA (SÁNCHEZ; CORREA; SANDOVAL, 2016; SAVINI, 2016; LIU et al., 2015).

Figura 7- Os cinco principais clados filogenéticos do grupo *Bacillus cereus*.



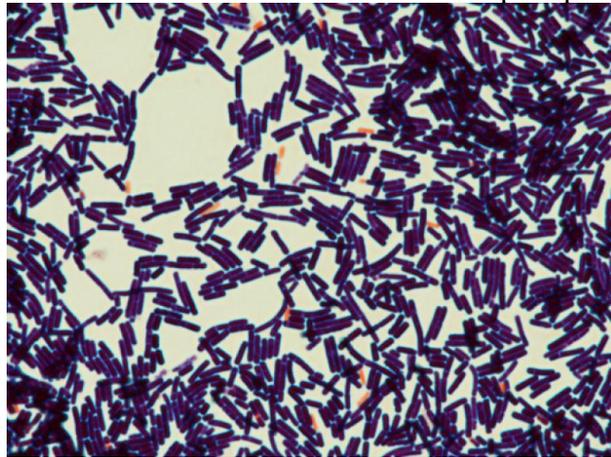
Fonte: SCHULUZ et al. (2019).

Figura 8- Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Bacillus cereus*, 5 μm .



Fonte: ÖZEL; HOLAND /RKI

Figura 9- Coloração de Gram de *Bacillus Cereus* - Microscopia óptica de campo claro 100x



Fonte: PIMCD2012 Proyecto Microbiología

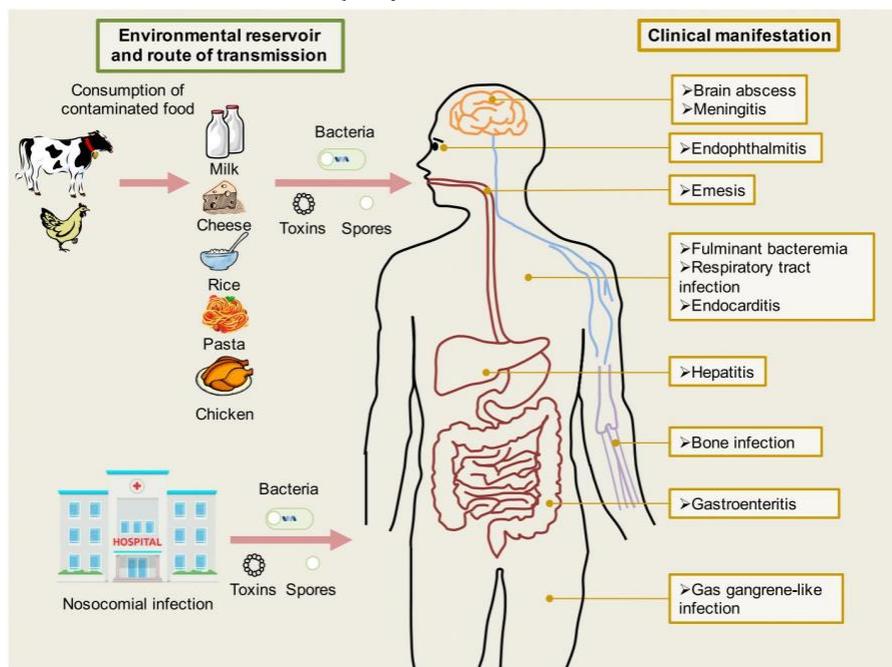
Bacillus cereus é agente etiológico de duas formas de doença, a intoxicação causada por alimentos contaminados com ciclodepsipeptídeo cereulide ou a toxicoinfecção que é o resultado da ingestão de cepas diarreicas da bactéria. Quando o hospedeiro ingere a toxina ciclodepsipeptídeo cereulide produzida pelo *Bacillus cereus* essa apresenta sintomas como vômitos e diarreia. No caso de alimentos contaminados as cepas eméticas contêm o plasmídeo pCER270, que é capaz de codificar componentes enzimáticos necessários para a biossíntese não ribossômica da toxina cereulide e como consequência os hospedeiros são induzidos a vômitos, desse modo os sintomas aparecem em menos de 12 horas após o consumo e tem duração curta de tempo. (BLACK & BLACK, 2021; JOVANOVIĆ et al., 2021)

Já na toxicoinfecção as bactérias que sobrevivem à barreira gastrointestinal humana, germinaram e interagiram com epitélios produzindo enterotoxinas no intestino delgado (BLACK & BLACK, 2021; JOVANOVIĆ et al., 2021; RASKO et al., 2007). Apesar de

comumente causar problemas gastrointestinais com remissão em 24 horas sem tratamento, existem relatos que essa pode também causar bacteremia, complicações resultando em enterite necrótica que manteve três pessoas e também clínicas graves relacionadas a insuficiência hepática nas intoxicações eméticas (ACOSTA et al., 2020; LUND et al., 2000; NARANJO et al., 2011; MAHLER et al., 1997).

A patogenicidade do grupo é impulsionada pelas toxinas que são diversas e são codificadas por cromossomos e plasmídeos, sendo que a principal toxina chamada depsipeptídica cereulide é codificada em plasmídeos. Além disso, Fosfolipases, esfingomielinases, hemolisinas, proteinases e peptidases representam fatores de virulência adicionais ao grupo (EHLING-SCHULZ et al., 2019). Assim, *Bacillus cereus* pode ser transmitido aos humanos através do consumo de alimentos mal-cozidos ou contaminados por via oral-gástrica ou por transmissão adquirida no hospital devido à formação de biofilmes do microrganismo em itens como cateteres e lençóis sendo essas vias de transmissão responsáveis pela maioria das manifestações gastrointestinais e/ou extraintestinais no ambiente hospitalar, assim como mostrado na figura 10 (TUIPULOTU et al., 2020).

Figura 10- Reservatórios ambientais, vias de transmissão e manifestações clínicas associadas à infecção por *Bacillus cereus*.



Fonte: Tuipulotu et al. (2020)

2.7 Mecanismo quitosana-microrganismos

Estudos têm testado a interação da quitosana e de nanopartículas de quitosana em bactérias (AHMAD et al., 2020; WEN-LI et al., 2008; MURAT et al., 2016; EJAZ et al., 2023; KE et al., 2009). Na maioria dos estudos são realizados os testes microdiluição para estimar a concentração mínima inibitória e a concentração bacteriana mínima, além disso são usados também os métodos disco difusão e difusão por poços (NEVES 2013; MARANGON 2015; DIVYA 2016)

Segundo a literatura, existem diferentes propostas para explicar o mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos, mostrados na figura 11 (MACEDO et al., 2022), entre eles está:

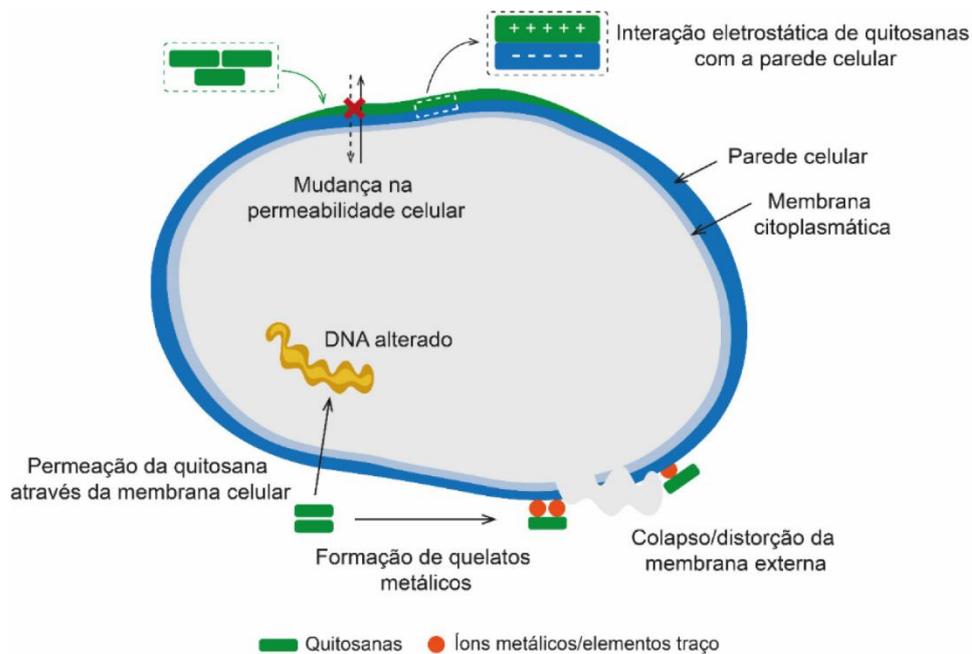
(i) O rompimento da membrana ou parede celular do microrganismo por meio da alteração da sua permeabilidade. Esse foi investigado por Xiao-fang et al., (2010) através de determinação através da determinação da quantidade de DNA e proteínas liberadas no citoplasma usando *Escherichia coli*.

(ii) A interação da quitosana com o DNA do micro-organismo, interrompendo-se assim a síntese proteica, como relatado no estudo de Galván et al., (2013). Estes autores comprovaram essa interrupção por meio de ensaio de expressão de β -galactosidase in vivo, sugerindo que este é um modo primário de ação antifúngica.

(iii) O impedimento do crescimento microbiano por meio da quelação de nutrientes (íons metálicos) pela quitosana (MACEDO et a., 2022). Este mecanismo também foi descrito por Jung et al., (1999) apud Muzarelli et al., (1977), os quais explicaram que a quitosana oligomérica penetra nas células de microrganismos, impedindo o crescimento de células e proibindo a transformação de DNA em RNA.

(iv) O impedimento de trocas gasosas e de nutrientes entre a superfície celular do micro-organismo com o meio externo, levando-o à morte celular, como descrito por Jung et al., (1999) apud Roberts et al., (1992). Isso foi possível devido à formação de um filme polimérico espesso sobre superfície celular do microrganismo. A atividade antimicrobiana da quitosana foi vinculada à sua natureza catiônica. Uma vez que os ânions disponíveis no biopolímero podem ser ligados ao ácido siálico (ácido presente nos fosfolipídios), restringindo assim o movimento das substâncias microbiológicas.

Figura 11- Representação esquemática dos principais mecanismos de ação das quitosanas frente a micro-organismos.



Fonte: MACEDO et al. (2022)

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extratos

A espécie *Kalanchoe daigremontiana* foi obtida na cidade de Santo Antônio do Amparo, Minas Gerais (20°57'19" S 44°55'0" O) e replantada em vasos na Universidade Federal de Lavras, que ficaram no Departamento de Física.

A identificação da planta foi feita no setor de Botânica do Departamento de Ciências Biológicas da UFLA, onde foi produzido uma exsicata da planta.

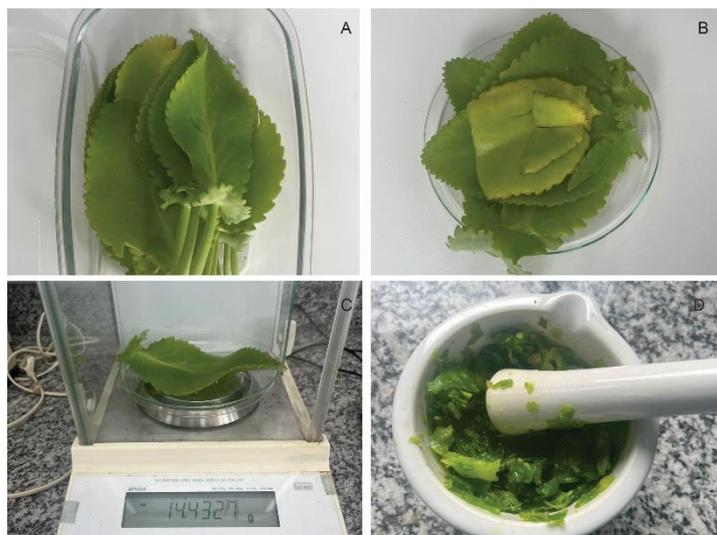
Figura 12- Foto da *Kalanchoe Daigremontiana* utilizada.



Fonte: Da autora

O extrato foi preparado no mês de Julho, usando método de maceração estática como descrito a seguir. Inicialmente, as folhas da planta foram lavadas três vezes e secas em estufa à temperatura de 40°C por 24 horas. Em seguida, 250 g de folhas limpas e secas foram trituradas e moídas manualmente, usando-se um almofariz e um pistilo, essas fases da metodologia estão representadas na figura 13. Posteriormente, elas foram embebidas em 500 ml de etanol a 70% e agitadas. Após 28 dias, a mistura foi filtrada três vezes, utilizando-se papel filtro Whatman nº1 e concentradas em rotaevaporador à temperatura de 40 °C, obtendo-se o extrato hidroetanólico, assim como mostra a figura 14. O método de extração utilizado foi baseado no trabalho de doutorado pioneiro intitulado “Efeitos do nanoencapsulamento nos Extratos etanólicos de *Bryophyllum daigremontianum*, *Euphorbia tirucalli*, *Momordica charantia*, *Handroanthus impetiginosuse*, *Pterodon emarginatus* sobre a citotoxicidade de células cancerígenas.” de Erika Oliveira (2023), onde o extrato de *Kalanchoe daigremontiana* foi aplicado em células Vero e HeLa.

Figura 13- Produção do extrato de *Kalanchoe daigremontiana* – A. folhas do extrato lavadas, B. folhas do extrato secas e pesadas, C. pesagem de folhas do extrato, D. maceração usando pistilo e almofariz.



Fonte: Da autora

Figura 14- Extrato de *K. daigremontiana* no rotaevaporador



Fonte: Da autora (2023).

3.2 Produção de nanopartículas de quitosana

A produção das nanopartículas de quitosana foi realizado no Laboratório de Síntese de Materiais que está alocado no Departamento de Física da UFLA. Para a produção das nanopartículas foi utilizada a quitosana de baixo peso molecular, tripolifosfato de sódio (TPP) e ácido acético glacial, obtidos da Sigma-Aldrich Corp® (St. Louis, Missouri, USA).

A síntese das nanopartículas de quitosana foi feita através do método de gelificação iônica descrita por Calvo et al., (1997).

Inicialmente, 5g de quitosana foram adicionadas em 100 ml de uma solução de ácido acético ao 0,5%. Essa mistura permaneceu em agitação constante durante 24 horas para a completa diluição da quitosana, como mostra a figura 15. Após esse intervalo de tempo, a solução de quitosana foi filtrada com filtro de seringa de 0,45 μm . Separadamente, uma quantidade de tripolifosfato de sódio foi diluída em água destilada sob agitação por 30 minutos, obtendo-se uma solução de TPP ao 0,1%. Em seguida, a solução de TPP foi gotejada na solução da quitosana para a formação das nanopartículas. Para a formação das nanopartículas de quitosana, o pH da solução de quitosana foi ajustado para 4,8 e a proporção em massa de quitosana:TPP foi de 4:1.

Figura 15- Síntese de nanopartículas de quitosana pelo método de gelificação iônica - A quitosana dissolvendo em ácido acético no agitador magnético, B/C/D nanopartículas formadas em suspensão.



Fonte: Da autora

3.3 Encapsulamento do extrato em nanopartículas de quitosana por gelificação iônica

Para a obtenção do extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana, inicialmente foi preparada uma solução de quitosana ao 1,5%. Em 5ml desta solução foi adicionada uma quantidade de extrato na concentração de 14,6mg/ml sob agitação vigorosa, até a solução de quitosana alcançar uma concentração de 0,5 %. Na sequência, uma quantidade da solução de tripolifosfato de sódio (ao 0,1%) foi gotejada à mistura quitosana/extrato. Após o término do gotejamento, a mistura ficou em agitação durante 30 minutos, como mostrado na figura 16. Vale a pena ressaltar que após esse tempo de síntese era possível visualizar a opalescência da solução, sendo uma indicativa da obtenção das nanopartículas de quitosana (TESTOURI et al.,2010).

Figura 16- Extrato de *Kalanchoe daigremontiana* encapsulado em nanopartículas de quitosana



Fonte: Da autora

3.4 Análise das nanopartículas de quitosana por microscopia eletrônica de varredura

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA. Para realizar medidas MEV, primeiramente foi feito o preparo das amostras de nanopartículas de quitosana pura liofilizadas e nanopartículas de quitosana em suspensão no extrato. Neste procedimento, as amostras foram colocadas num porta amostras para serem recobertas com ouro, utilizando-se a técnica de pulverização catódica e em seguida, colocadas no microscópio para sua análise. As imagens foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura – STEM - FEG de ultra-alta resolução, livre de campo, modelo CLARA (TESCAN, 2021). Foi utilizado uma energia de feixe de 15KeV para as amostras e aumentos de 2 μm e 500 μm .

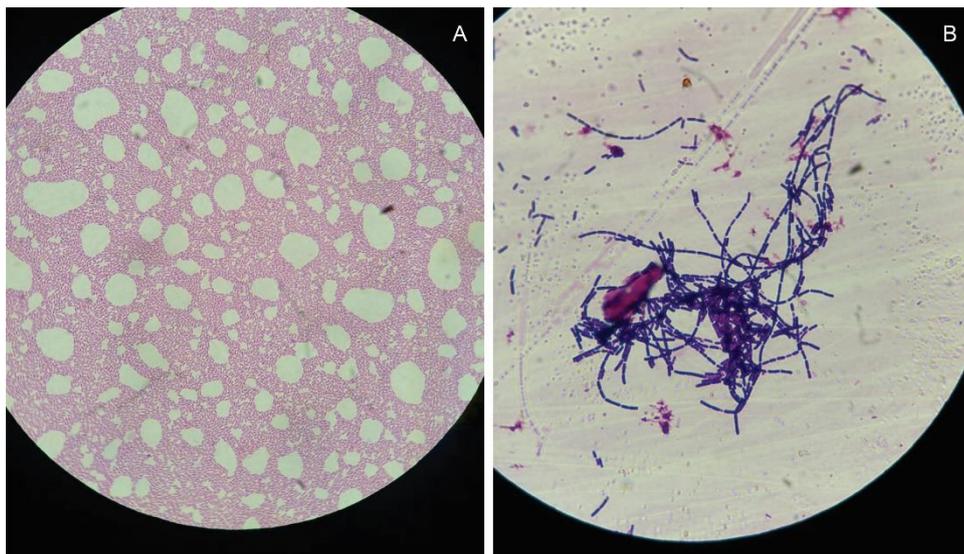
3.5 Espectroscopia na região infravermelho (FTIR)

Foram analisadas as amostras: quitosana em pó, nanopartículas de quitosana e o extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana. As análises de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas no laboratório multiusuário Central de Análise e Prospecção Química da Universidade de Lavras. O espectrômetro utilizado foi um espectrômetro FT-IR Varian 600-IR com transformada de Fourier (FTIR), com acessório GladiATR da Pike Technologies. A faixa espectral analisada foi de 400 a 4.000 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.6 Condições de cultivo e obtenção do inóculo

Os testes microbiológicos foram todos realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Industrial da UFLA. As bactérias *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus* foram reativadas em meio Ágar Nutriente (g.L^{-1} : 3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 2,5 g de glicose; 15 g de ágar), durante 24 horas a 37 °C. Após, foi realizado o teste de coloração de Gram para confirmação da pureza das colônias, como mostra a figura 17.

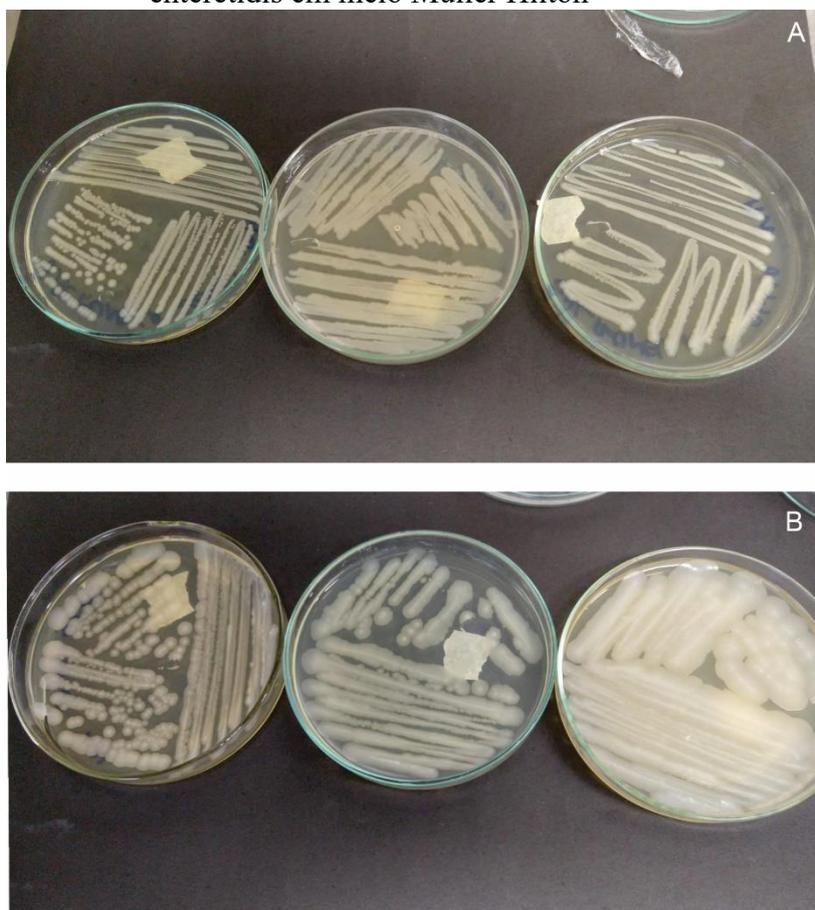
Figura 17- Coloração de Gram feita nas colônias reativadas – A. Lâmina de *Salmonella enteritidis* na objetiva de 100x, B Lâmina de *Bacillus cereus* na objetiva de 100x.



Fonte: Da autora

Posteriormente à confirmação da pureza, as bactérias foram repicadas em meio Ágar Müller Hinton (g.L⁻¹: 2 g de extrato de carne; 17,5 g de ácidos casamínicos; 1,5 g de amido; 15 g de ágar) por meio de estrias compostas, incubados a 37 °C por 24 horas, para que pudessem ser usadas nos testes, como mostra a figura 18.

Figura 18- Estrias compostas em Muller Hilton – A. *Bacillus cereus*, B- *Salmonella enteritidis* em meio Muller Hilton



Fonte: Da autora

3.7 Teste de disco difusão/poço

O método de disco difusão foi realizado de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (2009a) com adaptações. As bactérias contidas no meio ágar Muller Hilton foram diluídas em solução salina a 0,85% em uma taxa de concentração $9,8 \times 10^8$ de acordo com a escala de McFarland e 100 µl foram espalhados em placas contendo ágar Muller Hilton. Após, discos de 6 mm de papelfiltro esterilizados foram embebidos em nanopartículas de quitosana, extrato de *Kalanchoe daigremontiana* e o extrato de *Kalanchoe daigremontiana* nanoencapsulado nas nanopartículas de quitosana. Em seguida, os discos foram

transferidos para a placa contendo a bactéria e os tratamentos foram incubados em estufa a 37 °C, durante 24 horas.

3.8 Teste de microdiluição adaptado

O método de microdiluição foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida pelo Clinical Laboratory Standardas Institute, CLIS M7-A6 2005 com adaptações. Para avaliação da atividade antimicrobiana dos tratamentos, os testes foram realizados em triplicata em eppendorfs de 2 mL contendo 100 µL de caldo Müller Hilton e 20 µL de inóculo diluído 10⁵ vezes e 100 µL de cada tratamento em que cada um tinha uma concentração específica, conforme mostra o Quadro 2. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação constante de 120 rpm durante 24 horas e, após este período, cada amostra foi plaqueada (plaqueamento em superfície) em meio Ágar Müller- Hinton para posterior contagem de colônias e comparação. Para o controle positivo, foi realizado o plaqueamento do inóculo junto ao meio sem a adição dos tratamentos.

Quadro 2: Concentrações dos tratamentos usados no experimento.

Tratamento	Concentração
Extrato de <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	14,6 mg/mL
Nanopartículas de quitosana	3,5 mg/mL
Nanopartículas com extrato	4,3mg/mL

Fonte: Da autora

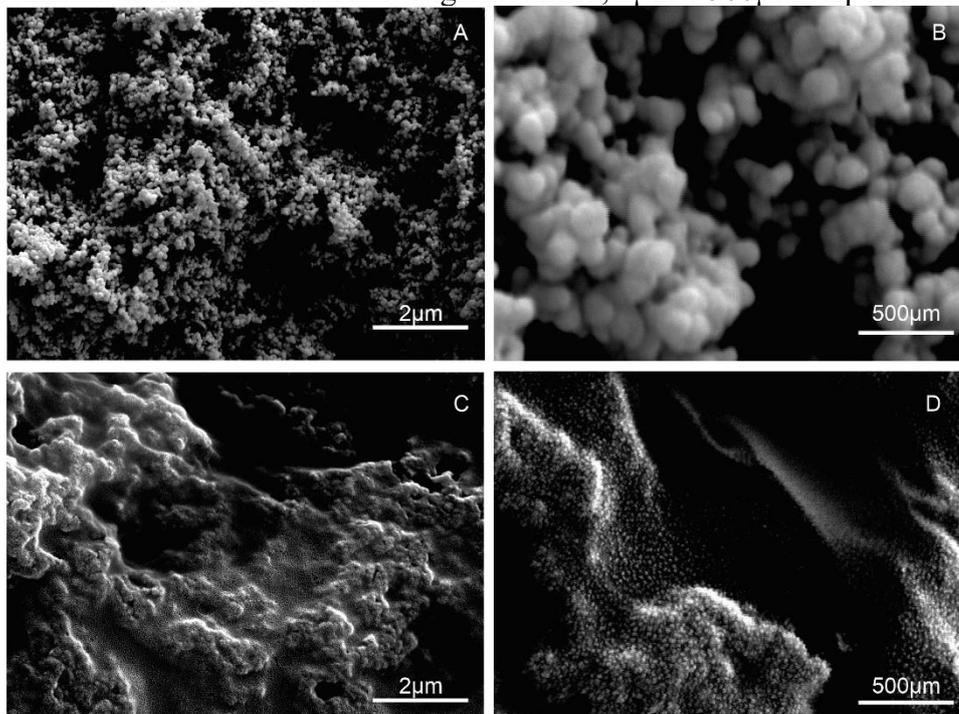
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica das amostras

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) da quitosana pura traz resultados quanto a morfologia das nanopartículas, seu diâmetro médio e a verificação da dispersão superficial das mesmas. As micrografias das nanopartículas de quitosana e das nanopartículas com extrato encapsulado são mostradas na figura 19. Observa-se que as nanopartículas se encontram aglomeradas e apresentam uma morfologia esférica bem definida. Os diâmetros das partículas foram medidos utilizando-se o programa de análise de imagens do próprio microscópio. O tamanho médio das nanopartículas varia entre 110 e 160 nm que foram medidos utilizando-se o programa de análise de imagens do próprio microscópio. Nessas micrografias observa-se que

a partir da síntese utilizada foi possível a obtenção da quitosana reticulada. A partir de imagens do extrato encapsulado, observa-se nanopartículas dispersas e com formato relativamente esférico e com distribuições de tamanho uniformes.

Figura 19-Eletromicrografia de Varredura. A, B- Nanopartículas de Quitosana 4:1(CS/TPP), aumento de $2\mu\text{m}$ e $500\mu\text{m}$ respectivamente. C,D - Nanopartículas de quitosana 4:1(CS/TPP) associadas a extrato de *Kalanchoe daigremontiana*, $2\mu\text{m}$ e $500\mu\text{m}$ respectivamente.



Fonte: Da autora

4.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica FTIR foi utilizada para identificar, por meio das bandas características, os agrupamentos químicos típicos dos grupos funcionais presentes nas amostras. Foram feitas medidas FTIR da quitosana em pó, das nanopartículas de quitosana e do extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana. Os espectros vibracionais na região do infravermelho para estas amostras estão mostrados nas figuras 20A, 20B e 20C, respectivamente. Na figura 20A é apresentado o espectro de infravermelho da quitosana em pó, e na figura 20B o espectro das nanopartículas de quitosana sintetizada de acordo com a metodologia apresentada na seção anterior. No espectro correspondente à quitosana pura 20A podemos observar suas bandas características. A banda larga na faixa de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ corresponde às vibrações de estiramento O-H e N-H além de ligações de hidrogênio intramoleculares. O alongamento da

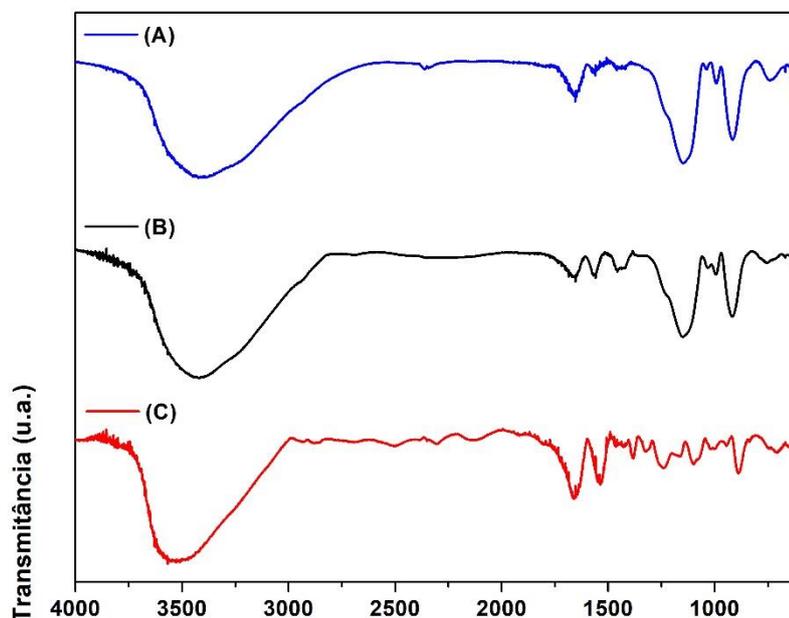
ligação C=O e o alongamento da ligação N-H de amida secundária foram observadas em 1676 e 1590 cm^{-1} respectivamente. A banda na região de 3000 –2800 cm^{-1} são atribuídas as vibrações das ligações C-H. A vibração de estiramento assimétrico da ligação simples C-O-C na ligação glicosídica é observado em 1159 cm^{-1} , enquanto que em 1079 cm^{-1} observa-se a vibração de estiramento C-O.

No espectro FTIR das nanopartículas de quitosana é possível observar mudanças nas intensidades e na posição de alguns picos quando comparados com o espectro da quitosana pura. Assim por exemplo, observa-se que quando a quitosana interage com o TPP, o pico relacionado às vibrações de estiramento O-H tende a aumentar indicando que a força de ligação entre os hidrogênios aumenta. A deslocamento da banda relacionada ao alongamento da ligação N-H de amida secundária de 1590 para 1565 e o surgimento da banda acentuada na faixa de 1235-1080 cm^{-1} , atribuída ao alongamento P=O e a banda em 919 cm^{-1} ao alongamento P-O e P-O-P (KHOERUNNISA *et al*, 2021; CUNLI, P. *et al*. 2020; YONGMEI & YUMIN, 2003) são evidencias da ocorrência de ligações entre o grupo amônio da quitosana e os grupos com o fosfato da molécula de TPP, levando à formação das nanopartículas.

Na figura 20 C é apresentado o espectro de infravermelho do extrato encapsulado em nanopartículas de quitosana. Neste espectro observa-se uma superposição de bandas correspondentes à quitosana e ao extrato hidroetanólico. Segundo a literatura, no caso do extrato hidroetanólico da espécie *Kalanchoe* entre os compostos presentes no extrato encontram-se alcolóides, flavonoides, polifenóis, etc. As principais bandas associadas ao extrato hidroetanólico são: banda correspondente aos grupos hidroxilas, bandas associadas às vibrações de alongamento CH_2 e CH_3 e banda atribuída às vibrações das aminas. (RADWAN-PRAGLOWSKA, *et al*.2021; O. FABORO, *et al* . 2022 ; JAYAPAL, SANGEETHA, THANDAPANI, 2016). No espectro FTIR das nanopartículas de quitosana é possível observar mudanças nas intensidades e na posição de alguns picos quando comparados com o espectro da quitosana pura. Assim por exemplo, observa-se que quando a quitosana interage com o TPP, o pico relacionado às vibrações de estiramento O-H tende a aumentar indicando que a força de ligação entre os hidrogênios aumenta. A banda em 1590 cm^{-1} , relacionada ao alongamento da ligação N-H de amida secundária é deslocado para 1590 cm^{-1} . Além disso, observa-se o surgimento da banda acentuada na faixa de 1235-1080 cm^{-1} , atribuída ao alongamento P=O e a banda em 919 cm^{-1} ao alongamento P-O e P-O-P.(KHOERUNNISA *et al*, 2021; CUNLI, P. *et al*. 2020; YONGMEI & YUMIN, 2003). Na amostra de nanopartículas de quitosana com extrato pode-se observar um aumento de intensidade das bandas relacionadas ao alongamento

da ligação C=O e o alongamento da ligação N-H de amida secundária bem como a diminuição da intensidade da banda atribuída ao alongamento P=O.

Figura 20- FTIR. (A) nanopartículas em pó. (B) nanopartículas diluídas. (C) nanopartículas associadas a extrato de *Kalanchoe daigremontiana*.



4.3 Teste de disco difusão

A partir das condições testadas, usando meio ágar Muller Hilton e as bactérias diluídas em uma taxa de concentração $9,8 \times 10^8$ e os tratamentos por meio de discos de papel filtro, foi observado a formação halos de 8 mm em *Salmonella enteritidis* apenas no tratamento quitosana extrato, como mostrado na figura 21.

Tabela 1: Relação entre os valores médios dos halos formados no cultivo de *Salmonella enteritidis* e os respectivos tratamentos.

Tratamento	Tamanho médio dos halos
Quitosana/extrato	8 mm
Extrato puro	Sem inibição
Quitosana pura	Sem inibição

Fonte: Da autora

Figura 21- Halos formados no tratamento quitosana/extrato em *Salmonella enteritidis*.

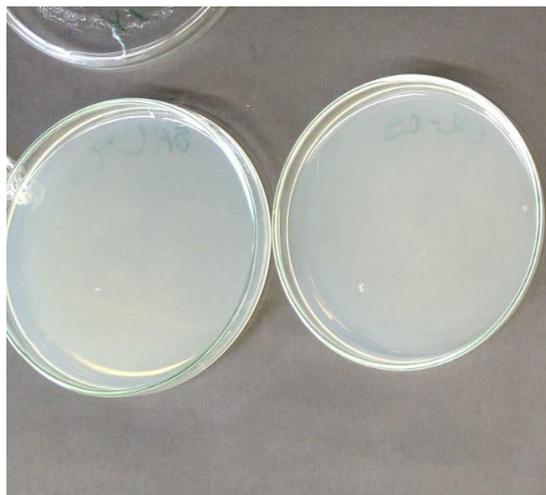


Fonte: Da autora

4.4 Teste de microdiluição

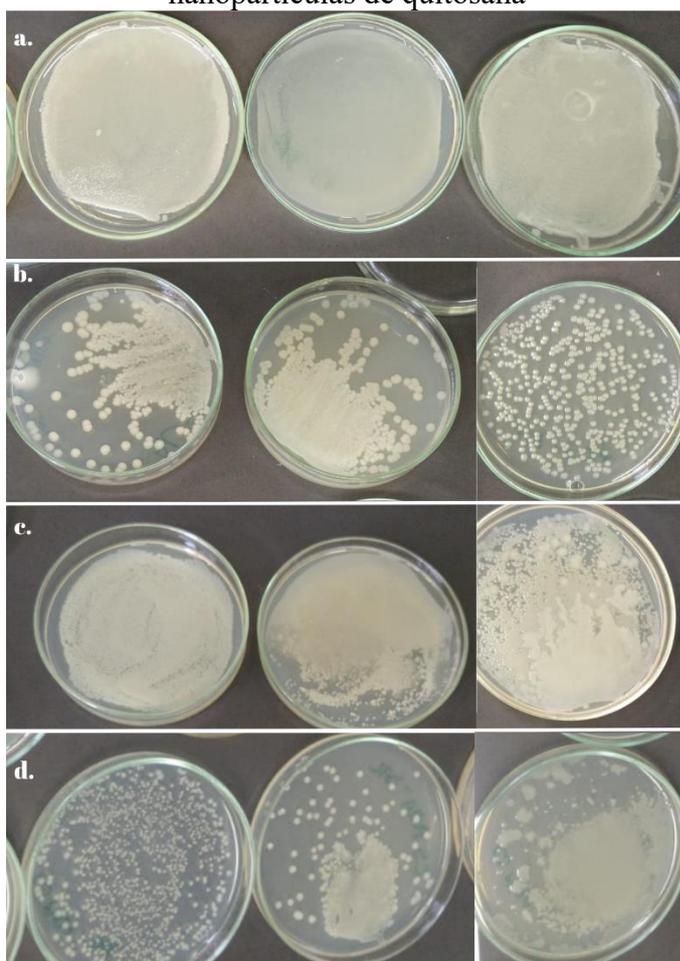
Os testes de microdiluição apresentaram resultado semiquantitativos, visto que é possível observar as diferenças entre os tratamentos apenas visualmente e os controles negativos não apresentaram crescimento bacteriano. Foi possível observar nas condições testadas que em *Salmonella enteritidis* as placas com tratamento do extrato puro e da quitosana pura apresentaram um crescimento menor que do controle sem tratamento. Já no conjunto extrato e quitosana observa-se um crescimento ligeiramente menor que o controle. Em *Bacillus cereus* observamos uma possível inibição apenas no tratamento de quitosana pura nas condições testadas.

Figura 22- Controle negativo do cultivo em placas contendo o meio Ágar Müller Hilton.



Fonte: Da autora

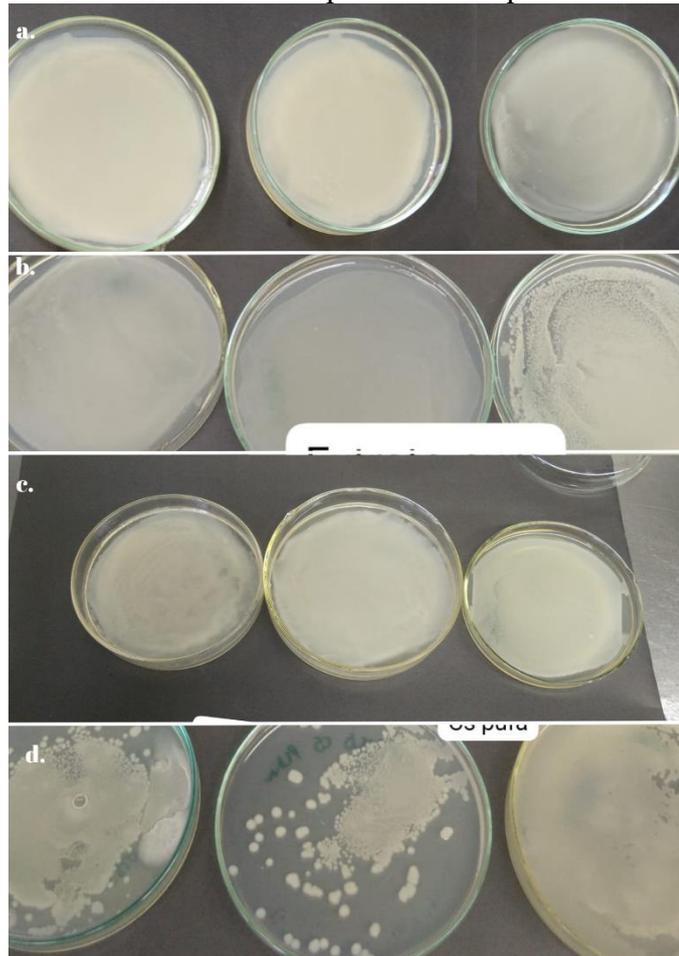
Figura 23- a. Controle positivo de *Salmonella enteritidis*, b. Tratamento extrato de *Kalanchoe daigremontiana*, c. Tratamento nanopartículas quitosa associadas ao extrato, d. Tratamento de nanopartículas de quitosana



Fonte: Da autora

Fig w. (a): controle positivo de *Bacillus cereus*, (b) placas de inóculo contendo o tratamento do extrato de *Kalanchoe daigremontiana*, (c) placas de inóculo contendo o tratamento quitosa + extrato, (d) placas de inóculo contendo o tratamento quitosana

Figura 24- a. Controle positivo de *Bacillus cereus*, b. Tratamento do extrato de *Kalanchoe daigremontiana*, c. Tratamento de nanopartículas de quitosa associadas ao extrato, d. Tratamento de nanopartículas de quitosana.



Fonte: Da autora

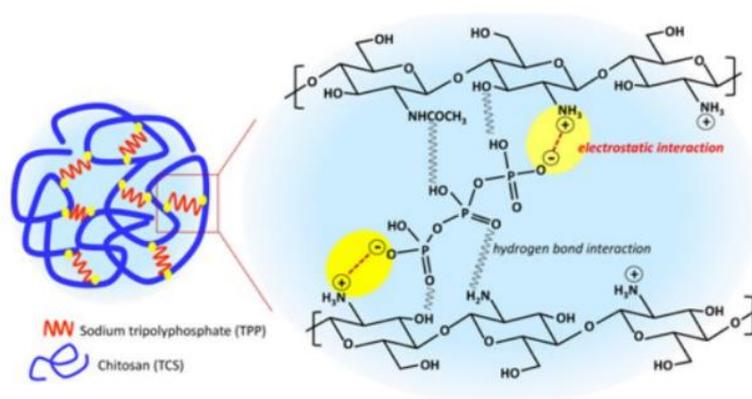
5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Espectroscopia de Infravermelho (FITR)

Nos espectros da quitosana em pó e das nanopartículas observam-se picos característicos do polímero e do TPP. No entanto observam-se mudanças nas intensidades e na posição de alguns picos no espectro das nanopartículas quando comparados com o espectro da

quitosana pura. O pico relacionado às vibrações de estiramento O-H tende a aumentar indicando que a força de ligação entre os hidrogênios aumenta. A banda em 1590 cm^{-1} , relacionada ao alongamento da ligação N-H de amida secundária é deslocado para 1590 cm^{-1} . Além disso, observa-se o surgimento da banda acentuada na faixa de 1235-1080 cm^{-1} , atribuída ao alongamento P=O e a banda em 919 cm^{-1} ao alongamento P-O e P-O-P. (KHOERUNNISA *et al.*, 2021; CUNLI, P. *et al.* 2020; YONGMEI & YUMIN, 2003). No espectro de nanopartículas com extrato observa-se a diminuição da intensidade dos picos relacionados aos grupos fosfatos. Isso pode indicar que alguns grupos funcionais do extrato estão interferindo na ligação do TPP com a quitosana, podendo modificar e/ou prejudicar a reticulação.

Figura 25- Estrutura e interação proposta para nanopartículas. e (b) CS-TPP 2%.



Fonte: KHOERUNNISA *et al.*, 2021

5.2 Caracterização e morfologia (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura demonstram que a quitosana reticulada apresenta partículas no tamanho nanométrico. Segundo a literatura, através da metodologia utilizada é possível a formação de nanopartículas com tamanhos entre 20 nm e 114,12 nm (YOUNGMEI & YUMIN, 2003; KHOERUNNISA *et al.*, 2021).

5.3 Metodologias de avaliação de efeito antibacteriano

No presente trabalho foram usadas duas metodologias para a avaliação do efeito antibacteriano das amostras sobre as bactérias. Entretanto, em ambas as metodologias houveram dificuldades no processo de execução e na quantificação da atividade antibacteriana

dos tratamentos. A metodologia de microdiluição adaptada mostrou-se melhor para testar as amostras do que a metodologia de disco-difusão. Segundo a literatura, um melhor desempenho na avaliação antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e substâncias puras é alcançado utilizando o método de microdiluição e difusão por poço em detrimento ao método de disco difusão (ALVES et al., 2008).

Assim, para futuros trabalhos utilizando esses tratamentos, é interessante utilizar o método de difusão por poços, pois esse é mais sensível a extratos vegetais. Por outro lado, no método de disco-difusão algumas substâncias podem ser aderidas, devido à propriedade hidrofílica da superfície do disco, que possui grupos hidroxila livres presentes em cada um dos resíduos de glicose, impedindo a difusão completa do tratamento para o ágar (AMPARO et al., 2018).

5.4 Efeito do extrato de *Kalanchoe daigremontiana* sobre as bactérias

O extrato produzido neste trabalho não apresentou inibição sobre o crescimento das bactérias *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*. Mayorga et al., (2019) observaram inibição no crescimento das bactérias *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella* spp usando o extrato hidroetanólico de *Kalanchoe brasiliensis*, a concentração de 12,5 mg/mL e a metodologia de microdiluição. Já nesse estudo, mesmo utilizando uma concentração maior com valor de 14,6 mg/mL, não foi observado inibição em *Salmonella enteritidis* e *Bacillus cereus*. Entretanto, a massa e a concentração do extrato não são os únicos fatores que influenciam sobre a inibição bacteriana. As substâncias bioativas encontradas nos extratos do gênero *Kalanchoe* tais como kaempferol, eupafolina e quercetina, mas principalmente os compostos fenólicos e flavonoides também tem uma influência substancial na inibição do crescimento bacteriano. (MAYORGA et al., 2019; ALVES, 2023; COUTINHO et al., 2020).

Os flavonoides se destacam quando o assunto é utilização de extratos medicinais, pois esses apresentam diversos efeitos, dentre eles ações antibacteriana (SILVA et al., 2015). Segundo Silva & Cunha (2021) o extrato de *Kalanchoe daigremontiana* contém flavonoides, esses identificados a partir de teste de Shinoda e testes de flavonoides totais, que apresentaram valores de flavonoides da ordem 68,436 a 139,70 µg/mL. Esse trabalho concluiu que extratos dessa planta que ficaram por menos tempo, 4 horas, dentro do solvente e com menor volume do mesmo apresentaram maior teor de flavonoides (139,70 µg/mL). Assim sugere-se que o extrato hidroetanólico de *Kalanchoe daigremontiana* não inibiu o crescimento bacteriano em

ambas as bactérias desse estudo devido ao tempo em que ficou no solvente (28 dias), podendo assim ter prejudicado a extração dessa importante substância presente na planta.

Diante dos resultados encontrados sugere-se que para futuros trabalhos seja utilizado um tempo menor de extração e que seja realizada a avaliação de flavonoides do mesmo extrato em diferentes tempos, visando obter um extrato com a melhor concentração dessa substância.

Rchwagen et al., (2019) relatam a atividade antibacteriana de *Kalanchoe fedtschenkoi* contra *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* de 50% usando pelo menos 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo Rivero-Pérez et al., (2022), o extrato hidroetanólico de *Kalanchoe daigremontiana* mostrou maior atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* apresentando concentração inibitória mínima de 0,781 mg mL^{-1} e uma inibição um pouco menor sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* apresentando uma concentração mínima inibitória de 100 mg mL^{-1} .

Estes resultados foram comprovados através de ensaios de viabilidade bacteriana celular e ensaios de vazamento de compostos absorventes a 280 nm, nos quais os extratos do estudo apresentaram flavonoides e flavonas, sendo que aqueles obtidos a partir de folhas colhidas no verão apresentaram maior teor de flavonoides. A partir disso, é possível enxergar uma segunda possibilidade para que o extrato puro não inibiu o crescimento bacteriano, visto que as folhas de *Kalanchoe daigremontiana* foram colhidas no inverno, podendo, assim, ter influenciado no teor de flavonoides do extrato.

O extrato puro não apresentou diferença na metodologia de disco difusão para *Salmonella enteritidis*, assim como também não apresentou diferença qualitativa na metodologia de microdiluição para *Bacillus cereus*. Houve diferença apenas para *Salmonella enteritidis* na metodologia de microdiluição.

Essa falta de inibição do extrato pode ser explicada por problemas na metodologia utilizada para avaliação do efeito inibitório, pela época de colheita das folhas para produção do extrato, pelo tempo que este ficou imerso no solvente durante o processo de extração. Por isso, sugere-se que em futuros trabalhos esses parâmetros sejam adequados, além disso, ressalta-se a ausência de estudos do efeito de extratos das espécies de *Kalanchoe* sobre *Bacillus cereus*, sendo assim um campo aberto para futuras pesquisas.

5.5 Efeito das nanopartículas de quitosana sobre as bactérias

A quitosana é um dos biopolímeros mais utilizados na nanotecnologia biomédica, pois essa apresenta propriedades físico-químicas e biológicas funcionais que a torna um material

propenso para aplicações na saúde, como por exemplo: atividade antioxidante e cicatrizante, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (MAO et al., 2001). Além disso, a ação antibacteriana das nanopartículas é potencializada quando elas apresentam tamanhos nanométricos (AHMAD et al., 2023).

Segundo Macedo et al., (2022), todas as hipóteses que explicam a capacidade inibitória da quitosana estão majoritariamente ligadas com a interação que existe entre as cargas positivas dos grupos amino protonados da quitosana e as cargas negativas presentes na membrana/parede celular de bactérias e fungos. Nesse sentido, por meio de sua pesquisa o autor conclui que o grau médio de acetilação e a massa molar média da quitosana são propriedades importantes na determinação de sua ação, pois o grau médio de acetilação da quitosana é diretamente proporcional a sua ação antimicrobiana e já a massa molar média da quitosana ideal varia de acordo com a espécie de bactéria, sua composição e estrutura.

A literatura relata que a produção de nanopartículas de quitosana aumenta a efetividade do polímero e amplia seu campo de aplicações, visto que com a redução do tamanho da quitosana ocorre um aumento da razão área/volume, resultando no aumento de sua reatividade e potencialidade de propriedades quando comparadas a quitosana natural (NUNES et al., 2021). Por isso é possível encontrar estudos usando nanopartículas de quitosana conjugadas a outros compostos. Entretanto, foi possível notar uma escassez de pesquisas acerca da ação das nanopartículas de quitosana sozinhas sobre microrganismos (EJAZ et al., 2023; WEN- LI 2009; AHAMAD 2020).

Além disso, segundo Khoerunnisa *et al.* (2021) as nanopartículas de quitosana apresentam alta densidade de carga superficial o que facilita a dissolução da quitosana, assim as nanopartículas por meio de sua interação quitosana e TPP apresentam uma atividade biocida elevada em relação a quitosana não modificada.

Nas condições testadas, as nanopartículas de quitosana pura não apresentaram resultados sobre as bactérias no método de disco-difusão para *Salmonella enteritidis*. No entanto, no método de microdiluição adaptado esta apresentou inibição visual/qualitativa tanto em *Salmonella enteritidis* quanto em *Bacillus cereus*.

Em *Salmonella enteritidis* a inibição foi visualmente maior em relação a *Bacillus cereus*. A ausência de halos na metodologia de disco difusão pode ser explicada por problemas de ligação das substâncias presentes no papel com a quitosana, como já citado acima (AMPARO et al., 2018). Os resultados de inibição encontrados no método de microdiluição adaptado corroboram com resultados encontrados em estudos anteriores que mostram efeito

inibitório no uso de quitosana (MURAT et al., 2016; EJAZK et al., 2023; MUNIRAH et al., 2023).

A diferença de inibição pode ser explicada pela diversidade na parede celular dessas, visto que *Salmonella enteritidis* é uma bactéria gram-negativa e *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, corroborando com trabalho de LIAN-YING & JIANG-FENG (2003), que observaram um melhor efeito da quitosana de baixo peso molecular em bactérias Gram-negativas assim como a quitosana utilizada no presente estudo. Já em bactérias gram-positivas, foi observado melhor efeito da quitosana com pesos moleculares mais altos, e isso pode ser o motivo de um menor efeito inibitório em *Bacillus cereus*, sendo essa uma sugestão de adequação do experimento para futuros trabalhos. Segundo Khoerunnisa, et al. (2021) o maior efeito das nanopartículas de quitosana sobre as bactérias Gram negativas é explicado pois sua membrana formada por lipossacarídeos são estabilizadas no núcleo interno da camada de lipossacarídeo por grupos aniônicos (fosfato e carboxila), assim a maior carga negativa na superfície celular promove a adsorção de mais nanopartículas de quitosana. Quando às bactérias gram positivas o autor relata que sua membrana formada por ácidos lipoteicos atuam como ligações plausíveis para que as nanopartículas se liguem e parem a função da membrana celular.

5.6 Efeito das nanopartículas de quitosana associadas ao extrato de *Kalanchoe daigremontiana* sobre as bactérias

A combinação do extrato com quitosana, na metodologia de disco-difusão sobre *Salmonella enteritidis*, apresentou efeito inibitório confirmado pela formação de um halo de inibição. No entanto, no teste de microdiluição adaptado não foi observada inibição bacteriana. Uma hipótese para explicar este resultado é que os compostos do extrato estariam ligando-se à carga catiônica da quitosana, deixando assim as nanopartículas de quitosana com menos cargas disponíveis para interagir com superfície da bactéria.

Não foram encontrados estudos que expliquem essa interação química entre nanopartículas de quitosana e o extrato de *Kalanchoe daigremontiana*. Entretanto, de acordo com a literatura, a principal ação da quitosana sobre as bactérias está relacionada à sua estrutura policatiônica, resultante dos grupos aminos protonados (MACEDO et al., 2022; YING et al., 2003). Assim, é possível que a interação química entre as nanopartículas e extrato interfira nessas características que dão caráter antibacteriano as nanopartículas. Essas evidências motivaram fortemente a hipótese levantada acima.

Por outro lado, na literatura também são apresentados resultados que indicam que o efeito de inibição da combinação extrato-quitosana sobre a *Salmonella enteritidis* é maior quando comparado com a ação do extrato e a quitosana separadamente. Assim por exemplo, segundo relatado por Aldayel et al., (2022), a combinação do extrato de *Caspicum annuum* com quitosana na concentração de 10mg/ml, aplicado sobre *Salmonella enteritidis* na metodologia de disco-difusão, apresentou efeito inibitório maior quando comparado com a ação do extrato e a quitosana separadamente. Mostrando que a atividade antimicrobiana da quitosana é potencializada quando associada ao extrato. Por este motivo, sugere-se para futuros trabalhos a realização de teses que combinem nanopartículas de quitosana e extrato de *Kalanchoe daigremontiana* em diferentes concentrações.

Além disso, a partir da observação dos resultados obtidos após as análises de espectroscopia de varredura, observou-se que a quitosana ficou muito mais dispersa quando associada ao extrato, podendo essa ser uma justificativa para não apresentar um maior efeito ou o mesmo efeito observado na quitosana pura.

6 CONCLUSÃO

O método de gelificação iônica utilizado para a obtenção das nanopartículas de quitosana se mostrou um método eficiente e de fácil reprodutibilidade. Através de MEV observou-se que as nanopartículas de quitosana apresentam morfologia majoritariamente esférica, cujos tamanhos variam entre 110 e 160 nm, nas condições de síntese estabelecidas no presente trabalho.

O extrato de *K. daigremontiana* na concentração de 14,6 mg/mL apresentou efeito inibitório sobre *S. enteritidis* quando utilizada a metodologia de microdiluição adaptada. Observou-se que as nanopartículas de quitosana na concentração de 4,3 mg/ml apresentaram melhor ação inibitória quando comparada com o efeito do extrato encapsulado. Uma possível explicação para este resultado seria que o extrato incorporado na matriz da quitosana teria interagido com os grupos NH₂ protonados da cadeia polimérica, perdendo assim sua característica catiônica a qual lhe possibilitava interagir com a superfície do microrganismo.

O extrato encapsulado nas nanopartículas de quitosana na concentração estudada não apresentaram atividade antimicrobiana sobre *Salmonella enteritidis* nas metodologias usadas. É possível que a concentração utilizada no teste de atividade antimicrobiana não foi suficiente para inibir o desenvolvimento das bactérias testadas. Outra hipótese é de que o extrato tenha eliminado os grupos catiônicos livres (-NH₃⁺) na quitosana, e conseqüentemente não houve interação e formação de complexos polieletrólíticos com os polímeros da superfície da célula microbiana.

Mais estudos devem ser feitos sobre o tema, visto que este apresenta alta relevância. Para futuros trabalhos, é possível fazer um estudo mais detalhado sobre a composição química do extrato hidroetanólico de *K. daigremontiana*, os mecanismos envolvidos na interação entre as bacterianas e as nanopartículas. Além disso, adotar medidas quantitativas para determinar a eficiência antibacteriana do extrato de *K. daigremontiana* e das nanopartículas de quitosana.

REFERÊNCIAS

ACOSTA PEDOMONTE N.B. *et al.* Bacillus cereus bacteremia in a patient with an abdominal stab wound. **Revista Argentina de Microbiología**, Santa Fé, Novo Mexico, v.52, n. 2, p. 115-117, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300859?via%3Dihub>. Acesso em: 26 nov. 2023

ALMEIDA, R. S. *et al.* Produção, caracterização e avaliação in vitro de partículas de quitosana e hidroxiapatita para substituição óssea. **Cerâmica**, v. 65, n. 376, p. 569–577, 2019. DOI <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653762682>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ce/a/x76Y5y6LkmCbTfdzTK7cS9H/?lang=pt#>. Acesso em 18 de nov. 2023.

ALVARADO-ZÁRATE, A. *et al.* Bacillus cereus em amostras de arroz pré-cozido e cozido para venda ao público no estado de Colima, México. **Journal of Microbiology & Educação em Saúde**, v. 1, pág. 24–29, 2020. Disponível em: <http://journalmhe.org/ojs3/index.php/jmhe/article/view/8>. Acesso em: 16 nov. 2023

ALVES, C.V. **Estudo químico dos extratos de Kalanchoe pinnata (lam.) pers. nativa do município de Tabatinga AM.2023.** Tese (TCC em Ciências Biológicas), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023. Disponível em: <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br/handle/riuea/5105>. Acesso em 23 nov. 2023.

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Qw4msZB9DH9qjfZyjNP4DhL/?lang=pt#ModalHowcite>. Acesso em 16 set. 2023.

AMPARO, T.R. *et al.* Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity of medicinal plants: the need for standardization, **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 1, p. 50-59, 2018. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/10844>. Acesso em 23 nov. 2023.

ANTUNES P *et al.*, Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clin Microbiol Infect**, v 22, n. 2, p. 110–121, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(15\)01030-7/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(15)01030-7/fulltext). Acesso em 26 nov. 2023.

ANTUNES, F. S.; PIZZORNO, B. B. Nanotecnologia e seus impactos na sociedade. **Revista tecnologia e saúde**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 40, 2020. DOI: [10.3895/rts.v16n40.9870](https://doi.org/10.3895/rts.v16n40.9870). Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rts/article/view/9870>. Acesso em: 25 out. 2023.

ASSIS, L. M. *et al.* Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99–109, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012005000004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/LKt5hYRHMhgQrzHZ4WdWxCp/?lang=pt#ModalHowcite>. Acesso em: 26 nov. 2023.

BANERJI, S. ; SIMON . S ; TILLE, A et al. Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. **Sci rep**, n. 4333, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61254-1>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61254-1#citeas>. Acesso em: 26 nov. 2023.

BERGER, J. *et al.*, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 57, p. 19 – 34, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641103001619>. Acesso em: 29 out. 2023.

BLACK, J. G.; BLACK, L. J. **Microbiologia - Fundamentos e Perspectivas** . Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2021. *E-book*. ISBN 9788527737326. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527737326/>. Acesso em: 29 out. 2023.

BRASIL. Ministério da saúde. Informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil, 2016-2019: Boletim epidemiológico, Ago. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/informe-sobre-surtos-notificados-de-doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos-2013-brasil-2016-2019.pdf/view>. Acessado em: 21 out. 2023

BREIAN J. W. Visão geral de bactérias. **Manual MSD**. 2022 PharmD, University of Washington School of Pharmacy. mai 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/vis%C3%A3o-geral-de-bact%C3%A9rias> . Acessado em 15 de nov. 2023.

CALVO, P. Novas nanopartículas hidrofílicas de quitosana-óxido de polietileno como transportadores de proteínas. **J. Appl. Polim. Ciência**, v. 63, p. 125-132. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4) . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2F%28SICI%291097-4628%2819970103%2963%3A1%3C125%3A%3AAID-APP13%3E3.0.CO%3B2-4>. Acesso em: 26 nov. 2023

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. M7-A6: Metodologia de testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição por bactérias de crescimento aeróbico:norma aprovada. 6.ed. Coordenação de tradução de Silva Figueiredo Costa. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. v.23, n.2.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

COUTINHO, M. A. S. Wound healing cream formulated with *Kalanchoe pinnata* major flavonoid is as effective as the aqueous leaf extract cream in a rat model of excisional wound. **Natural product research**, v. 35, n. 24, p. 6034–6039. DOI: 10.1080/14786419.2020.1817012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32924590/>. Acesso em: 20 nov. 2023.

CUNLI, P. *et al.* Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116349>. Disponível em:(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720305233>). Acesso em 27 nov. 2023.

D'AYALA, GG.; MALINOCONICO, M.; LAURIENZO, P. Polissacarídeos derivados marinhos para aplicações biomédicas: abordagens de modificação química. **Moléculas**, v. 13, n. 9 , p. 2069-2106, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules13092069>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/13/9/2069>. Acesso em: 26 nov. 2023.

Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/14359>. Acesso em: 21 nov. 2023.

DIVYA, K. *et al.* Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. **Fibers Polym**, v. 18, p. 221–230, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s12221-017-6690-1>. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12221-017-6690-1#citeas>. Acesso em 26 nov. 2023.

EHLING- SCHULZ, M. et al. The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 3, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018#tab-citations> Acesso em: 29 out. 2023.

EHLING- SHULZ, M. *et al.* The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 3, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018>. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018#con1>. Acesso em 10 out. 2023.

EL- NAGGAR, N. E. A, *et al.* Síntese verde de nanopartículas de quitosana, otimização, caracterização e eficácia antibacteriana contra Acinetobacter baumannii formador de biofilme multirresistente. **Sci Rep**, v. 12, n.19869, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24303-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-24303-5#citeas>. Acesso em: 26 nov. 2023.

ELIZONDO-LUÉVANO, J. H. *et al.* In-Vitro Effect of Kalanchoe daigremontiana and Its Main Component, Quercetin against Entamoeba histolytica and Trichomonas vaginalis.

Iranian journal of parasitology. **Iranian journal of parasitology**, v. 16, n. 3, p. 394 – 401, 2021. DOI: 10.18502/ijpa.v16i3.7092. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34630584/>. Acesso em: 26 nov. 2023.

FAUSTINO, C. D. *et al.* Propriedades biológicas de diferentes extratos de Kalanchoe daigremontiana ('Mãe de milhãres'): uma revisão. **RPS Pharmacy and Pharmacology Reports**, v. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/rpsppr/rqac009>. Disponível em:

<https://academic.oup.com/rpsppr/article/1/1/rqac009/6827834>. Acesso em: 26 nov. 2023.

FERNANDES, I. M . M. *et al.* Híbridos de quitosana-argila para encapsulamento e liberação controlada do fármaco dexametasona. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, América do Sul, v. 14, n. 3, p. 130-139, 2019. Disponível em:

<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/viewFile/733/496>. Acesso em: 20 nov. 2023

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Grupo A, 2013. *E-book*. ISBN 9788536327068. Disponível em:

<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536327068/>. Acesso em: 29 nov. 2023.

FORTES, J. **Uso indiscriminado de antibióticos pode levar a sérios problemas de saúde; HM incentiva boas práticas entre os profissionais**. Sesa, 2021. Disponível em:

<https://www.saude.ce.gov.br/2021/11/23/uso-indiscriminado-de-antibioticos-pode-levar-a-serios-problemas-de-saude-hm-incentiva-boas-praticas-entre-os-profissionais/>. Acesso em 02 nov. 2023.

GIDEON F. S; ESTRELA, F; ABRAHAM, E, V. **Kalanchoe (Crassulaceae) in Southern Africa**: Classification, Biology, and Cultivation. Cambridge: Academic Press, 2019. *E-book*. Disponível em: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+\(Crassulaceae\)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+(Crassulaceae)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false). Acesso em:

[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+\(Crassulaceae\)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+(Crassulaceae)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false). Acesso em:

[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+\(Crassulaceae\)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=38m3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Kalanchoe+(Crassulaceae)+in+South+ern+Africa+pdf&ots=D4Y-nMWDp6&sig=pCNNi0UA0X1Z2ASHjE3PoCP7N2g#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 10 set. 2023.

GODINHO, J. W. L. S. **Estudo de validação de espécies da flora maranhense na terapêutica do câncer: contribuição para obtenção de bioprodutos e promoção da farmacovigilância.** 2023 Tese (Doutorado em ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/4630>

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de Bacillus subtilis em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, 2007. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/4933> . Acesso em 28 nov. 2023.

GÓMEZ, F. C. P et al. Quitosana: alternativa terapêutica. **Revista Mexicana Periodontol**, v. 4, n. 3, p. 120-122, 2013. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=50843>. Acesso em: 12 out. 2023.

GONTIJO, L. A. P. effect on the synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by DLS and their size-dependent antimicrobial activity. **Matéria**, Rio De Janeiro, v. 25, n. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200004.1145>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rmat/a/TPqXMWLS3yKFCyz3cb33Q3x/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 27 nov. 2023.

GONZÁLEZ GUTIÉRREZ, P. A.; LÓPEZ-PUJOL, J.; GÓMEZ-BELLVER, C. Notas sobre espécies ocasionais e naturalizadas de Kalanchoe (Crassulaceae) em Cuba. **Coletânea Botânica**, v. 38, p. 011, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3989/collectbot.2019.v38.011>. Disponível em: <https://collectaneabotanica.revistas.csic.es/index.php/collectaneabotanica/article/view/282>. Acesso em: 23 nov. 2023.

GRANATO, L. M.; GALDEANO, D. M. **Microbiologia, parasitologia e imunologia.** 1. ed. Curitiba: Intersaberes, 2020. *E-book*. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>. Acesso em: 29 out. 2023.

GUSTAVO, G. & CUNHA, R, N, S. Avaliação de flavonoides totais e da atividade antioxidante de aranto (Kalanchoe daigremontiana),v. 2, n. 18, p. 205-217, 2021, <https://revistas.unipam.edu.br/index.php/perquirere>. Acesso em: 15/11/2023.

HAI-QUAN, M. *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, **Journal of Controlled Release**, HEIJAJI, E. M. A; SMITH, A . M; MORRIS, G.A. Evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan nanoparticles prepared using different chitosan to tripolyphosphate (CS:TPP) ratios. **International Journal of Biological Macromolecules**, Inglaterra, v. 120, p. 1610 – 1617, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.185>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813018340467?via%3Dihub>. Acesso em: 14 de fev. 2023.

<https://doi.org/10.3322/caac.21254>. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254> .Acesso em 11 de fevereiro de 2023.

JAJERE, S. M. Uma revisão de Salmonella enterica com foco particular nos fatores de patogenicidade e virulência, especificidade do hospedeiro e resistência antimicrobiana, incluindo resistência a múltiplos medicamentos. **Veterinary World**, v. 12 , n. 4, p. 504-521, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>. Disponível em: <https://www.veterinaryworld.org/Vol.12/April-2019/5.html>. Acesso em: 26 nov. 2023

JAYAPAL, J. J.; D. SANGEETHA.; THANDAPANI , G.Sunitinib loaded chitosan nanoparticles formulation and its evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 952-958,2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.079>.

JOVANOVIC, J . *et al.* Intoxicação alimentar e toxicoinfecção por *Bacillus cereus* . **Compr Rev Food Sci Food Saf** , v. 20, p. 3719-3761, 2021.DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1111%2F1541-4337.12785>. Acesso em: 25 nov. 2023.

JUNG, B.- O. *et al.* Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, n. 13, p. 1713-1719, 1999. DOI :[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990624\)72:13<1713::AID-APP7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990624)72:13<1713::AID-APP7>3.0.CO;2-T). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1002%2F%28SICI%291097-4628%2819990624%2972%3A13%3C1713%3A%3AAID-APP7%3E3.0.CO%3B2-T>. Acesso em: 21 nov. 2023

Ke, X. *et al.* Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. **International journal of food microbiology**, v. 132, n. 2-3, p. 127–133. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.013> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160509002219?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2023.

KHOERUNNISA , F. *et al.* Physicochemical Properties of TPP-Crosslinked Chitosan Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Fibras Polym.** v. 22 ,p. 2954–2964 ,2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12221-021-0397-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12221-021-0397-z#citeas>. Acesso em 28 nov. 2023.

KHOERUNNISA, F. *et al.* Physicochemical Properties of TPP-Crosslinked Chitosan Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents. **Fibers and Polymers**, v. 22, n, 2021. DOI:[10.1007/s12221-021-0397-z](https://doi.org/10.1007/s12221-021-0397-z).Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/352277826_Physicochemical_Properties_of_TPP-Crosslinked_Chitosan_Nanoparticles_as_Potential_Antibacterial_Agents. Acesso em: 27 nov. 2023.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J. *et al.* Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors-In vitro and in silico study. **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 141–150, 2017.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.051>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28223215/>. Acesso em 15 nov. 2023.

KOWALSKI, L. *et al.* Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020. DOI:<https://doi.org/10.31512/ricsb.v4i1.119>. Disponível em: <https://san.uri.br/revistas/index.php/ricsb/article/view/119>. Acesso em 16 out. 2023.

LARANJEIRA, M. C. M .; Fávere, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009 DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-4042200900030001>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/zMQsDMRnPPXXbBFWbsSspzs/?lang=pt#>. Acesso em: 29 out. 2023.

- LIAN-YING, Z & JIANG-FENG, Z. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003. DOI: 10.1016/j.carbpol.2003.07.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861703002509?via%3Dihub> Acesso em 22 nov., 2023.
- LIU, Y. *et al.* Insights genômicos sobre o status taxonômico do grupo *Bacillus cereus*. *Sci Rep* 5, n. 14082, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep14082>. Acesso em: <https://www.nature.com/articles/srep14082#citeas>. Acesso em: 29 out. 2023.
- LUND, T., DE BUYSER, M.-L. e GRANUM, P.E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular microbiology*, v. 38, n. 2, p. 254–261, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x>. Acesso em: 20 nov. 2023.
- MACEDO, J. B. *et al.* Atividade Antimicrobiana de quitosanas e seus derivados: influências das características estruturais. *Química Nova*, v. 45, n. 6, p. 690–704, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170867>. Acesso em 10 nov. 2023.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Grupo A, 2016. *E-book*. ISBN 9788582712986. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582712986/>. Acesso em: 24 out. 2023.
- MAGALHÃES, D. S. *et al.* Análise fitoquímica da *Kalanchoe daigremontiana*. *Cadernos Macambira*, v. 8, n. 4, p. 12–13, 2023. DOI: 10.59033/cm.v8i4.1062. Disponível em: <http://revista.lapprudes.net/index.php/CM/article/view/1062>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- MAHLER, H. *et al.* Fulminant Liver Failure in Association with the Emetic Toxin of *Bacillus cereus*. *The new england journal of medicine*, v. 336, n. 16, p. 0028-4793, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM199704173361604>. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejm199704173361604>. Acesso em: 05 nov. 2023.
- MARAGON, C. A. **Atividade antimicrobiana de citoxidade de emulsões de quitosana/gelatina/oleo de copaiba**. 2015. Tese (Mestrado em Bioengenharia) - Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.82.2017.tde-03102017-152846>. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-03102017-152846/pt-br.php>. Acesso em: 20 out. 2023.
- MÁRQUEZ, G. I. *et al.* Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International journal of food microbiology*, v. 164, n. 1, p. 108–112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160513001712?via%3Dihub>. Acesso em: 26 nov. 2023.
- MATOS, T. N.; Lopes, F. M.; SIGNIN, R. Uso de Quitosana Aplicada à Liberação Controlada de Fármacos: Uma Revisão Sistemática. *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 3, p.668- 680, 2020. DOI:10.21577/1984-6835.20200053. Disponível em: <https://s3.sa-east-1.amazonaws.com/static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v12n3a11.pdf>. Acesso em 22 nov. 2023.

MAY, M. Statistics: Attacking an epidemic. *Nature*, v. 509, p. 50–51, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/509S50a>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/509S50a#citeas>. Acesso em :11 de fevereiro de 2023.

MAYORGA , O. A. S. *et al.* Promising Natural Source of Antioxidant and Antibiotic Agents against Multidrug-Resistant Pathogens for the Treatment of Salmonella Gastroenteritis. **Oxidative medicine and cellular**, v. 2019, n. 9245951, p. 11, 2019. DOI: [10.1155/2019/9245951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827708/). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31827708/>. Acesso em: 28 nov. 2023.

MAYORGA, O. A. **Perfil químico de potenciais antioxidantes, antibacteriano e anti-inflamatório de extratos hidroetanólicos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess.(Crassulaceae)**. Tese (Mestrado em ciências farmaceuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2017.Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/9789> . Acesso em 23.nov. 2023

MONIUSZKO- SZAJWAJ, B. *et al.* Novos bufadienolídeos isolados de raízes de *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae). **Moléculas**, v. 21, n. 243, 2016.DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21030243>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/3/243>. Acesso em: 01 nov. 2023.

MOREIRA, J. L. B.; BARRERO, C.M.C.; CUNHA, C.F. **Visualização bacteriana e colorações**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015. ISBN: 978-85-7485-238-6. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/16672/1/2015_liv_jlbmoreira.pdf.

MUNIRAH, F. A. The synergistic effect of capsicum aqueous extract (*Capsicum annum*) and chitosan against multidrug-resistant bacteria, **Journal of King Saud University - Science**, v. 35, n. 2, p. 1018-3647, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102438>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101836472200619X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MURAT, K.; MELTEM, A-O.; SEVIL, E. Comparison of antimicrobial activities of newly obtained low molecular weight scorpion chitosan and medium molecular weight commercial chitosan, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1358-1368. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813017317579?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2023.

MUZZARELLI, R.A.A. **Natural Chelating Polymers; Alginic Acid Chitin and Chitosan**. Londres: Pergamon Press, 1973.

NARANJO, M. *et al.* Morte súbita de um jovem adulto associada a intoxicação alimentar por *Bacillus cereus* . **Jornal de Microbiologia Clínica**, v.49 , n. 12, p. 4379–4381.DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.05129-11>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.05129-11>. Acesso em 02 nov. 2023.

NEVES, A. L. P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana**. 2013. Tese (doutorada em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, 2013.

NEW BRASIL. **Você já ouviu falar dessa planta?** Estudiosos de medicina garantem que ela é pode ser uma esperança no tratamento contra tumores. News brasil. Disponível em: < <https://www.1news.ig.com.br/noticia/511892/vida-e-saude/voce-ja-ouviu-falar-dessa-planta-estudiosos-de-medicina-garantem-que-ela-e-pode-ser-uma-esperanca-no-tratamento-contra-tumores-3936-08062018>>. Acesso em: 29 out. 2023.

NUNES, I. S. *et al.* Nanopartículas de quitosana: Técnicas de obtenção e aplicações na indústria de alimentos. In: VERRUCK, S. **Avanços em ciência e tecnologia de alimentos**. Editora científica digital, 2021, p. 345-369. DOI: 10.37885/210303528. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/artigos/nanoparticulas-de-quitosana-tecnicas-de-obtencao-e-aplicacoes-na-industria-de-alimentos>. Acesso em 24 nov. 2023

O. FABORO, E. *et al.*, Phytochemical Analyzes from the Leaves of Bryophyllum pinnatum. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 14, n. 3, p. 1–10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.9734/EJMP/2016/26156>. Disponível em: <https://journalejmp.com/index.php/EJMP/article/view/215>. Acesso em 27 nov. 2023.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. Two novel flavonoids from Bryophyllum pinnatum and their antimicrobial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v 3, n. 2, p. 1-10, 2011. Disponível em: <https://www.jocpr.com/articles/two-novel-flavonoids-from-bryophyllum-pinnatum-and-their-antimicrobial-activity.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2023.

PATRA, J. K, *et al.* Sistemas de entrega de medicamentos baseados em nano: desenvolvimentos recentes e perspectivas futuras. **J Nanobiotechnology**, v. 16, n. 71, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0392-8?ref=hackernoon.com#citeas>. Acesso em 27 nov. 2023.

PENHA, V. C. S. *et al.* Production of chitosan microspheres for pharmaceutical purposes. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 55941–55973, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-129. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/14680>. Acesso em: 15 nov. 2023

PENICHE, C.; ARGUELLES - MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M. Quitina e Quitosana: Principais Fontes, Propriedades e Aplicações. In: Monômeros, Polímeros e Compósitos de Recursos Renováveis. **Elsevier**, p. 516-542. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00025-9>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780080453163000259?via%3Dihub>. Acesso em: 25 out. 2023.

PERIM, M. *et al.* Efeito dos extratos das folhas de Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. sobre bactérias resistentes a multidrogas. **Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, v. 14, n. 1, p. 91-99. DOI: <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i1.143>. Disponível em: <https://boletimcn.museu-goeldi.br/bcnaturais/article/view/143>. Acesso em: 26 nov. 2023.

PINHEIRO, H. S. *et al.* Avaliação do desenvolvimento e da produção de flavonoides de Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. (Crassulaceae) em diferentes condições de luz e nutrição. **Revista Fitos**, v. 10, n. 4, p. 404-416, 2017. DOI: 10.5935/2446-4775.20160029.

Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19271>. Acesso em: 28 nov. 2023.

POWO. Plants of word online. **Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet & H.Perrier**. Disponível em:< <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30060186-2>>. Acessado em 10 de outubro de 2023.

RADWAN-PRAGLOWSKA, J. *et al.* Fungal Chitosan-Derived Biomaterials Modified with *Kalanchoe pinnata* as Potential Hemostatic Agents-Development and Characterization. **Polymers**, v. 13, n. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13081300>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33921117/>. Acesso em: 27 nov. 2023.

RAMARÃO, N. Métodos avançados para detecção de *Bacillus cereus* e seus fatores patogênicos. **Sensores**, v. 20, n. 2667, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/s20092667>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/9/2667>. Acesso em 26 nov. 2023.

RASKO, D. A análise completa da sequência de novos plasmídeos de isolados eméticos e periodontais de *Bacillus cereus* revela uma história evolutiva comum entre os *B* plasmídeos do grupo *cereus*, incluindo *Bacillus anthracis* pXO1. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 1, p. 52–64, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.01313-06>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.01313-06>. Acesso em 26 nov. 2023.

RICHWAGEN, N. *et al.* Antibacterial Activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* Against ESKAPE Pathogens. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00067>. Disponível: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00067/full>. Acesso em: 24 nov. 2023.

RIEDEL, S. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. Porto Alegre: Grupo A, 2022. *E-book*. ISBN 9786558040170. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786558040170/>. Acesso em: 26 nov. 2023.

RIVERO-PÉREZ, N. *et al.* Efeito anti-helmíntico e antibacteriano in vitro do extrato hidroalcoólico de folhas e caules de *Kalanchoe daigremontiana*. **Abanico Veterinário**, v. 12, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.1>. Disponível em: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/article/view/16>. Acesso em: 10 set. 2023.

RODRIGUES, L, S. *et al.* Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicol. argent.**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015. Disponível em: <v-37432015000100004&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 23 nov. 2023.

RUZANNA, A, S. *et al.* Antimicrobial properties of starch films incorporated with chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation, **Carbohydrate Polymers**, v. 230, n. 2020, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115602>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719312706>. Acesso em 28 nov. 2023.

SADAF, E. *et al.* Functionalized chitosan based nanotherapeutics to combat emerging antimicrobial resistance in bacterial pathogen, **Materials Today Communications**, v 37, p. 2352-4928, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107050>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352492823017415?via%3Dihub>. Acesso em 25 nov. 2023.

SÁNCHEZ, J.; CORREA, M.; CASTAÑEDA, L. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. **Revista Facultad Nacional de Salud Pública**, v. 34, n. 2, p.230-242, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.20973>. Disponível em: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/fnsp/article/view/20973>. Acesso em: 26 nov. 2023.

SAVINI, V. **The Diverse Faces of Bacillus Cereus**. London: Elsevier, 2016. *Ebook*. ISBN: 978-0-12-801474-5. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322342493_The_diverse_faces_of_Bacillus_cereu

s_coauthored_book_-_Editor_Vincenzo_Savini_-_Publisher_Elsevier>. Acesso em 12 set. 2023.

SEVERO, A. M. C.; FOOK, M. V. L.; LEITE, I. F. Hidrogéis de PVA/quitosana funcionalizados com óleo de melaleuca visando aplicação como curativos. *Matéria*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620220001.1349>.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rmat/a/HrSbC6kR4QRkhrQJMS7Ypzw/?lang=pt#ModalHowcite>.

Acesso em: 12 fev. 2023.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Nanopartículas de quitosana como ferramenta promissora em nanomedicina com particular ênfase no tratamento oncológico. *Célula Câncer*, v. 21, n. 318, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02025-4>. Disponível em:

<https://cancerbiomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-021-02025-4#citeas>. Acesso em: 27 nov. 2023.

SIEGEL, R. L; MILLER, K. D; JEMAL.A. Cancer Statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, n. 65, p. 5-29, Janeiro, 2015. DOI:

SILVA, G. R. *et al.* Comparação do potencial antioxidante de extratos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe laetivirens* aplicados em biodiesel. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 8, n. 3, p.16998–17015, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n3-100>. Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/44948>. Acesso em 26

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/44948>. Acesso em 26

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher, 2017. ISBN: 978-8521212256. Disponível em:

<<https://www.amazon.com.br/Manual-M%C3%A9todos-An%C3%A1lise-Microbiol%C3%B3gica-Alimentos/dp/8521212259>>. Acesso em 28 out. 2023.

SORLIER, P. *et al.* Light scattering studies of the solution properties of chitosans of varying degrees of acetylation. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 4, p. 1030 a 1040, 2003. DOI:

<https://doi.org/10.1021/bm034054n>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12857089/>. Acesso em: 04 out. 2023.

SOUSA, A. P. A. da S; SILVA R. da S.; Oliveira A. dos S. O uso da planta *Kalanchoe Pinnata* (CORAMA) no processo de cicatrização de úlceras gástricas. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 11, 2023. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e14359.2023>.

STEFANOWICZ-HADJUK, J. *et al.* Identificação de flavonóides e bufadienolídeos e efeitos citotóxicos de extratos de *Kalanchoe daigremontiana* em linhagens celulares de câncer humano. **Planta Medica**, v. 86, n. 04, p. 239-246, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1099-9786>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/a-1099-9786>. Acesso em: 06 out. 2023.

STEFANOWICZ-HADJUK, J. *et al.* Um estudo in vitro anticâncer, antioxidante e fitoquímico em extrato aquoso de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet e H. Perrier. **Molecules**, v. 27, n. 7. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27072280>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2280>. Acesso em: 10 nov. 2023.

STEFANOWICZ-HAJDUK *et al.* Atividades biológicas de extratos de folhas de espécies selecionadas de *Kalanchoe* e sua relação com o conteúdo de bufadienolídeos, *Pharmaceutical Biology*, v. 58, n. 1, p. 732 – 740, 2020. DOI:10.1080/13880209.2020.1795208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32715869/>. 16 nov. 2023.

SWEARINGEN, M. C. et al. Virulência de 32 cepas de *Salmonella* em ratos. **Plos one**, v. 7, n. 4, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036043>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/citation?id=10.1371/journal.pone.0036043>. Acesso em 26 nov. 2023.

TATSIMO, S. J. N. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 158. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158>. Disponível em: <https://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-158#citeas>. Acesso em 26 nov. 2023.

TROVATTI et al.,. Biopolímeros: Aplicações farmacêutica e biomédica. **Eclética Química Journal**, v. 41, n. 01, 2017. DOI: [10.26850/1678-4618eqj.v41.1.2016.p01-31](https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v41.1.2016.p01-31). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/320239947_Biopolimeros_Aplicacoes_farmacaceutica_e_biomedica. Acesso em: 26 nov.2023.

TROVATTI, E. et al. Biopolímeros: aplicações farmacêuticas e biomédicas. **Eclética Química**, v. 41, n. 01, pág. 01–31, 2017. DOI: [10.26850/1678-4618eqj.v41.1.2016.p01-31](https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v41.1.2016.p01-31). Disponível em: <https://revista.iq.unesp.br/ojs/index.php/eletica/article/view/35>. Acesso em: 15 nov. 2023.

TUIPULOTU, D. E. et al. *Bacillus cereus*: epidemiologia, fatores de virulência e interações hospedeiro-patógeno. **Elsevier Ltd**, v. 29, n. 5, p. 458 – 471, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.003>. Disponível em: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(20\)30237-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X20302377%3Fshowall%3Dtrue#articleInformation](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(20)30237-7?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X20302377%3Fshowall%3Dtrue#articleInformation). Acesso em 24 nov. 2023.

ÜRMÉNY, F.G. Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, p. 1707-1714, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600127>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27472283/>. Acesso em 26 nov. 2023.

v. 121, n. 6, p. 678-684, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.11.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389172315004077?via%3Dihub>. Acesso em: 21 nov. 2023.

v. 70, n. 3, p. 399-421, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00361-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00361-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365900003618>. Acesso em 26 nov. 2023.

VAN DUIN, D., & Paterson, D. L. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 377-390, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27208764/>. Acesso em 23 nov. 2023.

XIAO- FANG, L. et al. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism, **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 493-499, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486170900366X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2023.

YING, Y, Yuting, W, Hui, L. Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 425-430, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00104-8). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861703001048?via%3Dihub>. Acesso em 23 nov. 2023.

YONGMEI, X. & YUMIN, D. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 2015-226, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00548-3). Disponível em: (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302005483>). Acesso em: 27 nov. 2023.

AHAMAD, A.A.M. *et al.* *Nigella sativa*-chitosan nanoparticles: Novel intestinal mucosal immunomodulator controls and protects against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in broilers. **BMC Vet Res**, v **19**, n. 103, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03632-1> . Disponível em: < <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-023-03632-1#citeas>> . Acesso em 29 nov. 2023.