



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS - UNICHRISTUS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA MINIMAMENTE
INVASIVA E SIMULAÇÃO NA ÁREA DE SAÚDE / TEMIS

DÉBORA FALES PRADO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE ZÉINA
CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO EM BIOFILME DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM LENTES DE CONTATO

FORTALEZA

2019

DÉBORA FALES PRADO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE ZÉINA
CARREGADAS COM ÁCIDO ANACÁRDICO EM BIOFILME DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM LENTES DE CONTATO

Trabalho submetido ao Programa de Mestrado em Tecnologia Minimamente Invasiva e Simulação na Área de Saúde do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento, aperfeiçoamento e inovação de simuladores, equipamentos e instrumentais para cirurgia minimamente invasiva.

Orientador: Prof. Dra. Ramilye Araújo Lima

FORTALEZA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P896a Prado, Débora Fales.
Atividade antimicrobiana de nanopartículas de zéina
carregadas com ácido anacárdico em biofilme de staphylococcus
aureus em lentes de contato / Débora Fales Prado. - 2019.
41 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -
Unichristus, Mestrado em Tecnologia Minimamente Invasiva e
Simulação na Área de Saúde, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima.

1. Anacardium occidentale. 2. nanopartículas. 3.
Staphylococcus aureus. 4. biofilme. 5. lentes de contato. I. Título.

CDD 610.28

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA MINIMAMENTE
INVASIVA E SIMULAÇÃO NA ÁREA DE SAÚDE / TEMIS
CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS – UNICHRISTUS**

BANCA EXAMINADORA

Aluna: Débora Fales Prado

Orientadora: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

Profa. Dra. Ramille Araújo Lima

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Orientadora

Profa. Dra. Beatriz Gonçalves Neves

Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Christus
Avaliador Interno

Profa. Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Professora do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC)
Avaliador Externo

DATA: 27 de agosto de 2019.

RESUMO

O sentido da visão se mostra muito importante para as atividades cotidianas, de forma pessoal ou profissional, e qualquer alteração que cause baixa visual ou até mesmo a cegueira decorre em prejuízo social e econômico, tanto em um âmbito individual como coletivo. As causas mais prevalentes de baixa visual são os erros refracionais: miopia, hipermetropia, astigmatismo e presbiopia. Os erros refracionais podem ser corrigidos com óculos, lentes de contato ou com cirurgias refrativas. Apesar do advento das cirurgias refrativas nos últimos anos, o uso de lentes de contato ainda se mostra crescente, por serem uma opção prática, confortável e de baixo custo para corrigir as ametropias. Apesar da praticidade, existem alguns riscos que vão desde simples desconfortos até uma possível ceratite infecciosa. Como forma de evitar essas complicações infecciosas potencialmente graves, são usadas substâncias desinfetantes com ação bactericida para higienização das lentes de contato. E diante do desenvolvimento de resistência bacteriana, faz-se necessário a ponderação de novos ativos com esse mesmo propósito. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico, extraído da casca da castanha de caju, em biofilmes de *Staphylococcus aureus*. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Biofilmes de *S. aureus* foram formados em lentes de contato e em fundo de placa de cultura de células de 24 poços. Os seguintes grupos foram testados: 1) Salina – Solução de NaCl 0,89%; 2) Nano – Nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico; 3) Nano + AA - Nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico; 4) Renu - solução desinfetante Renu®. A cada 24h de formação, os biofilmes foram submetidos à imersão por 30 min nas soluções descritas anteriormente. Após 48h, o biofilme foi coletado, diluído e plaqueado. As placas foram incubadas por 24h em estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL). Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados para logaritmo na base dez e foram calculadas as médias e desvios-padrões de cada grupo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson e então realizado o teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey (nível de significância 5%). Como resultados, observou-se no experimento em lentes de contato que o grupo Nano + AA apresentou o menor número de UFC/mL ($3,90 \pm 2,40$), sendo diferente estatisticamente do grupo Salina ($6,80 \pm 0,50$) e do grupo Renu ($7,36 \pm 0,34$). No experimento em fundo de placa, foi verificada a ausência de UFC/mL no grupo Grupo Nano+AA. Conclui-se que a formulação a base de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico apresenta potencial efeito antimicrobiano em biofilmes de *S. aureus* formados em lentes de contato e em placa de cultura.

PALAVRAS-CHAVE: *Anacardium occidentale*; nanopartículas; *Staphylococcus aureus*; biofilme; lentes de contato.

ABSTRACT

The vision proves to be very important for daily activities in a personal or professional level and any alteration that causes a decrease in eye sight or even blindness results in social and economical harm for the one suffering, as well as to the society around them. The main causes for decrease in vision are: refraction disorder, myopia, hypermetropia, astigmatism, and presbyopia. Refraction disorders can be corrected with the use of glasses, contact lenses or surgically. Despite the implementation of refractive surgeries in the last years, contact lens wear keeps growing due to be a practical and comfortable option, and because its low cost to correct ametropias. The downside to these simple choices are the risks that go from just discomfort to infectious keratitis. An option to avoid these complications potentially harmful is the use of bactericidal disinfectants to sanitize contact lenses. In front of the development of bacteria resistance, the need of new formulations with this purpose are needed. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of nanoparticles of zein loaded with anacardic acid extracted from cashew nut in *Staphylococcus aureus* biofilm. The experiments were performed in triplicated. Biofilms of *S. aureus* were formed in contact lenses and 24-well cell culture plates. The following groups were tested; 1) Saline - NaCl 0,89% solution, 2) Nano – nanoparticles of zein not loaded with anacardic acid, 3) Nano + AA - nanoparticles of zein loaded with anacardic acid, 4) Renu – Renu® disinfectant solution. Every 24 hours of formation, the biofilms were immersed for 30 min in the solutions described above. After 48 hours the biofilm was collected, diluted and plated. The plates were incubated for 24 hours in bacteriologic chamber at 37°C. After this, the colony forming units/mL were calculated. The microbiologic results were converted to logarithms, and the average and the standard deviation were calculated in each group. This data was submitted to D'Agostino & Pearson normality test and then ANOVA test was done followed by post-test Tukey's (level of significance 5%). In the results, it was observed that on the experiment with contact lenses, the Nano +AA group presented the lower number of CFU/mL and it was statistically different from the Saline and Renu groups. On the 24-well cell culture plate, it was noted the absence of CFU/mL in the Nano+AA group. In conclusion the formulation of nanoparticles of zein loaded with anarcadic acid presents antimicrobial effect in *S. aureus* biofilms formed in contact lenses and cell culture plate. However, studies analyzing the toxicity of this formulation in ocular tissue and the analysis of possible adverse effects of anacardic acid in the contact lenses are necessary.

KEY-WORDS: *Anacardium occidentale*; nanoparticles; *Staphylococcus aureus*; biofilm; contact lenses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da formação do biofilme. 1. Agregação bacteriana 2. Adesão bacteriana 3. Formação de microcolônia. 4. Biofilme maduro 5. Dispersão do biofilme.

Figura 2. Estrutura química do ácido anacárdico tri insaturado.

Figura 3. Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de *S. aureus* ATCC 25923

Figura 4. Placa de 24 poços contendo meio de cultura BHI caldo (esquerda da imagem) e soluções testadas no experimento (direita da imagem).

Figura 5. Biofilme já formado em lente de contato.

Figura 6. Análise da viabilidade bacteriana de biofilme de *S. aureus* formado em lentes de contato após aplicação das formulações.

Figura 7. Análise da viabilidade bacteriana de biofilme de *S. aureus* formado em fundo de placa de cultura de células de 24 poços após aplicação das formulações.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e Desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia/mL nos diferentes grupos experimentais, no experimento 1 (biofilme formado em lentes de contato). Dados expressos em logaritmo na base 10.

Tabela 2. Média e Desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia/mL nos diferentes grupos experimentais, no experimento 2 (biofilme formado em placa de 24 poços). Dados expressos em logaritmo na base 10.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido anacárdico
BHI	Ágar infusão cérebro-coração
EDTA	Edetato dissódico
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
LCC	Líquido da casca da castanha
MRSA	<i>S. aureus</i> metilicina resistente
NANO	Nanopartículas de zeína
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDI	Índice de polidispersão
PHMB	Polihexametil biguanida
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1.INTRODUÇÃO.....	09
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVO.....	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1Tipo de estudo.....	21
4.2 Obtenção das nanopartículas.....	21
4.3 Preparo do inóculo.....	21
4.4 Ativação e ajuste da concentração do inóculo.....	22
4.5 Formação do biofilme.....	22
4.6Aplicação das formulações controle e experimentais.....	12
4.7 Coleta do biofilme.....	24
4.8 Análise de dados.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

O sentido da visão tem grande valor social, representando um meio de comunicação fundamental, tanto para as relações interpessoais como para as atividades profissionais. A baixa visual é um problema de alta prevalência com frequente impacto negativo, seja sobre a qualidade de vida, autoestima, problemas psicológicos ou ainda econômicos (CASTAGNO, 2009; MEDINA, 2011).

A Classificação Internacional de Doenças 11, de 2018, classifica a perda visual à distância em quatro categorias, segundo a tabela de classificação de Snellen. Dessa forma, classificamos como perda visual leve a acuidade visual até 20/40; moderada, a acuidade visual até 20/60; severa, a acuidade visual até 20/200; e cegueira, a acuidade visual pior que 10/200 ou 20/400. Na prática clínica, a tabela de Snellen é uma das mais usadas para aferição da acuidade visual. Snellen, arbitrariamente, definiu a visão padrão como a habilidade de reconhecer um de seus optotipos com tamanho angular de 5 minutos de arco, sendo o optotipo formado por linhas de espessura e espaçamento de 1 minuto de arco. Essa tabela foi descrita para medir a acuidade visual em unidades angulares, onde o numerador corresponde a distância do teste, em pés ou metros, e o denominador é a distância em que uma letra subentende o ângulo visual padrão de cinco minutos de arco. Cegueira legal é um termo que define um indivíduo com acuidade visual central no melhor olho, com a melhor correção, de 20/200 ou pior. Essa definição é útil como critério de elegibilidade para estar apto a requerer benefícios previdenciários e outros (PASCOLINI & MARIOTTI, 2012).

O número de indivíduos com prejuízo da visão é crescente em todo mundo, e alguns dos fatores relacionados a isso são o envelhecimento populacional, com aumento da expectativa de vida, e as mudanças demográficas. Análises das características de indivíduos com prejuízo da visão e cegueira demonstraram impacto negativo em suas condições de saúde físicas e mentais, particularmente aumento do risco de doenças crônicas, acidentes, exclusão social, depressão e por fim aumento da mortalidade (LIY et al., 2011; JONES et al., 2009; LEE et al., 2012).

As causas principais de diminuição da visão são erros refracionais não corrigidos e catarata, o que os torna problemas de saúde pública, e que são, a cada dia, mais estudadas e elaboradas propostas para diminuir seu impacto na população. Estima-se que haja 285 milhões de pessoas com prejuízo da visão, e desses 39 milhões são cegos. A baixa visual está também relacionada a gênero, etnia, situação socioeconômica, nível educacional, situação de migração, moradores de áreas rurais e tem ainda variedade em diferentes países

de acordo com seu nível de desenvolvimento (BOURNE et al., 2012; ULLDEMOLINS et al., 2012).

A cegueira no Brasil atinge 1,5 milhão de pessoas das quais cerca de 60% são evitáveis e 20% são recuperáveis e uma parcela grande da população atinge a cegueira parcial ou total por falta de assistência, informação e tratamento (KARA-JÚNIOR; DELLAPI; ESPÍNDOLA, 2010).

Como já descrito, erros refracionais não corrigidos lideram as causas de prejuízo na visão, sendo a segunda causa de cegueira no mundo, porém existe tratamento disponível, de baixo custo e fácil acessibilidade, para corrigir miopia, hipermetropia, astigmatismo e presbiopia. Algumas simples intervenções podem reduzir ou prevenir em maiores proporções prejuízos na função visual ou até mesmo sua perda, acarretando consequências positivas não só ao indivíduo como também a comunidade a qual esta inserido, com menor perda de produtividade e menor necessidade de assistência médica (VARMA, 2016).

A detecção e o tratamento das ametropias, erros refracionais, estão incluídas como meta do *Program Vision 2020: the Right to Sight*, uma iniciativa global da Organização Mundial de Saúde, OMS, e outras organizações não governamentais que objetivam eliminar o prejuízo visual evitável até 2020 (CONGDON, 2003).

Durante o exame oftalmológico, os erros refrativos podem ser determinados usando dispositivos específicos. Alguns não necessitam da participação ativa do indivíduo avaliado, chamada de refração objetiva, e outros determinam a ametropia através de perguntas ao paciente enquanto lentes corretivas são dispostas na frente dos olhos, chamada de refração subjetiva. Uma compensação inadequada da ametropia pode causar sintomas de astenopia, como sentir que o olho está seco, dupla visão, sensação de fadiga ou cansaço rápido, dificuldade em ler e dores de cabeça (GREIN, 2014).

As ametropias esféricas estão geralmente relacionadas a discrepância entre o comprimento do olho e a sua capacidade refrativa, ou seja, capacidade do sistema óptico focar a luz ou imagem na retina. De forma resumida, um grande comprimento, normalmente maior que os 24 mm usuais, estão relacionados a miopia, e comprimento reduzido relacionado a hipermetropia, podendo ocorrer variações desta regra em situações especiais. O poder refrativo de uma lente é medido em dioptrias, e esse valor é o inverso da distância focal em metros. Como regra tem-se que a cada milímetro de desvio do comprimento ideal resulta em uma ametropia de 3 dioptrias (WOLFRAM, 2014). Na miopia, objetos distantes não são vistos com qualidade e a razão para isso é que sua imagem se forma em frente a retina, logo desfocada da fóvea, contudo objetos vistos de perto pelo observador são vistos

de forma satisfatória pela aproximação a imagem da região foveal, sem necessidade de acomodação. Na hipermetropia, as imagens também são vistas borradas, mas agora porque a imagem se forma atrás da retina, pessoas jovens podem usar a acomodação para compensar algum grau de hipermetropia, o que vai diminuindo com a idade. A ametropia cilíndrica, vem de uma assimetria do sistema óptico, que cursa com poder refrativo diferente nos diversos meridianos e assim imagem desfocada. A causa usual é a deformidade da córnea e menos comumente alterações do cristalino. Na presbiopia ocorre dificuldade em focar objetos para perto, causada pela perda da acomodação e, geralmente se apresenta, após a quarta década de vida (ULRICH, 2016).

A prevalência de erros refracionais varia de acordo com o local, sendo áreas urbanas diferentes de áreas rurais e essa diferença pode estar relacionada a fatores genéticos e ambientais. Uma avaliação realizada do Brasil mostrou que o astigmatismo foi o erro refracional mais frequente estando presente em todas as faixas etárias e apontando crescimento com o aumento da idade. A hipermetropia foi menos frequente abaixo dos 40 anos, com aumento importante após a quinta década de vida. Miopia foi mais comum entre a segunda e terceira décadas de vida, com diminuição com o aumento da idade (FERRAZ et al, 2014).

Para correção dos erros refracionais, existem algumas opções, como óculos, lentes de contato e cirurgia refrativa. O uso de lentes de contato continua crescendo apesar da crescente popularidade da cirurgia refrativa, e há mais de 34 milhões de usuários somente nos Estados Unidos, sendo 85% usuários de lentes gelatinosas e 15% usuários de lentes rígidas. Existem razões diversas para essa grande popularidade das lentes de contato, como os diversos materiais, desenhos e parâmetros, promovendo boa visão e conforto aos usuários (CONTACT LENS COUNCIL, 2005). A disponibilidade de múltiplos materiais e soluções proporcionam aos pacientes diversas opções de modo de uso e cuidado com as lentes. Nos Estados Unidos, as lentes de uso mensal são as mais prescritas (cerca de 42%). Contudo, é uma tendência global o crescente o uso de lente de descarte diário (MORGAN et al., 2011).

Atualmente, lentes de hidrogel são dispostas em diferentes grupos de acordo com desenho da superfície e quantidade de água, com um grupo separado de silicone hidrogel. As lentes mais recentes são desenvolvidas para superar limitações de desconforto e hipóxia. Materiais como polimetilmetacrilato tem baixa transmissão de oxigênio e apresentam maior relação com hipóxia corneana, sendo esta uma das mais comuns e preocupante complicações no uso de lentes, bem como a ceratite infecciosa. Diversas modificações têm sido feitas para aperfeiçoar as lentes, como novos materiais incorporando diferentes níveis de água. A

biocompatibilidade da lente é influenciada pela estrutura química do material, as lentes de silicone hidrogel são bifásicas, com componentes hidrofóbicos e hidrofílicos, e vários estudos tem sido feitos para avaliar a interação dessa superfície com o filme lacrimal (NICOLSON, 1998).

Em contramão ao conforto e praticidade do uso de lentes de contato, existem algumas limitações e riscos ao seu uso, e vão desde pequenos desconfortos até sérias consequências. O fator mais importante relacionado a isso é o significativo impacto na estrutura e metabolismo corneano, sendo ele no epitélio, no estroma e até no endotélio, que parece estar relacionado principalmente a diminuição da disponibilidade de oxigênio, que é exacerbado com o uso prolongado (STRETTON, 2003; CANAVAGH, 2003).

Além da hipóxia, outra limitação ao longo tempo de uso é a formação de neovascularização corneana periférica relacionada em parte a edema corneano crônico e dilatação dos vasos limbares pela própria hipóxia. O uso de lentes com alta transmissibilidade de oxigênio reduz esses eventos e pode contribuir na regressão dos vasos. A mais temida complicação é a ceratite infecciosa, particularmente a ulceração central que pode prejudicar a visão de forma irreversível (NICOLSON, 2005).

Em especial com lentes de uso prolongado, hipóxia, blefarite, uso de corticóides, diabetes e hábitos de higiene ruins, aumentam o risco de ceratite infecciosa e úlcera de córnea (GREEN et al., 2008). Apesar da ceratite infecciosa ser uma complicação não tão frequente diante do uso extenso de lentes de contato, ela se mostra como um problema de saúde pública diante das graves consequências que pode acarretar ao usuário de lentes, como baixa visual e até mesmo cegueira (STAPLETON et al., 2008).

Na maioria dos casos de ceratite infecciosa, o agente mais comum é o *Pseudomonas aeruginosa*, seguido pelo *Staphylococcus aureus*. A bactéria gram-positivo *S. aureus* pode ser facilmente transmitida aos olhos pela flora das mãos, rosto e mucosa nasal (CHENG et al., 1999). Esta bactéria tem a capacidade de formar um biofilme, que significa uma população de microrganismos que aderem a superfície da lente e são envolvidos por uma matriz extracelular (VU et al., 2009). Biofilmes exercem função importante na resistência bacteriana ao uso de desinfetantes (BRIDIER, 2011).

Recentemente, observou-se que casos de lentes contaminadas, em particular com formação de biofilme, levam a ceratite infecciosa e que a severidade do caso está relacionada com o crescimento de diversos tipos diferentes de bactérias (WILEY et al., 2012). Em estudo que avaliou os hábitos de higiene em jovens universitários usuários de lentes de contato assintomáticos, de Hong Kong verificou-se que em 45% dos indivíduos avaliados havia pelo

menos um item contaminado. Destes, 9% foi na lente de contato, 11% na solução de desinfecção, e no estojo de armazenamento de 34%. A caixa da lente foi identificada como um dos locais mais contaminados quando comparados a outros acessórios, e que baixa aderência a hábitos de higiene quanto aos cuidados com a lente, estão muito relacionados a contaminação. Também foi evidenciado maior contaminação nos acessórios de usuários ocasionais (YUNG et al., 2007).

É possível que durante a inserção e remoção da lente no estojo, bactérias sejam transferidas pelos dedos, e estando presente podem aderir as paredes do próprio estojo ou até mesmo a lente, mudando de fenótipo flutuante livre para um fenótipo sésil em resposta ao ambiente pouco nutritivo. Microrganismos na forma sésil se tornam envoltos por uma matriz, e inicialmente formam uma superfície de aderência fraca, por forças de van der Waals sendo assim facilmente removidos. Contudo essa adesão entre as células tende a aumentar com o tempo, o que proporciona a adesão de outros patógenos que também produzem uma matriz formando o biofilme (DART, 2007). Foi proposto que o baixo metabolismo do biofilme bacteriano contribui para fortalecimento e crescimento do biofilme e para sua resistência a antibióticos e desinfetantes (DRENKARD et al., 2003). A incidência de ceratite microbiana por lentes de contato pode ser reduzida de forma importante através dos padrões de higiene da lente e de seu estojo (TSAOUSIS et al., 2010).

Existe ainda uma necessidade de se entender a natureza e a função do biofilme no mecanismo da infecção. O que já é sabido é que há um comportamento diferenciado por parte dos microrganismos quando formado um biofilme e assim ocorre resposta diferente a atividade dos antibióticos. A maior parte dos antibióticos foi desenvolvida por sua habilidade de inibir o crescimento bacteriano *in vitro*, contudo essa habilidade pode ou não ser reproduzida quando existe um biofilme. Foi proposto que biofilmes são compostos de células bacterianas de uma ou mais espécies de microrganismos interagindo cooperativamente, onde células da superfície da estrutura têm acesso aos nutrientes e se mantêm em contínua atividade e divisão enquanto células mais internas se mantêm em estágio de latência. Essa heterogeneidade fisiológica do biofilme resulta em diferentes respostas aos antibióticos e um mecanismo de defesa mil vezes mais potente quando comparada a uma célula isolada em um meio de cultura. (BEHLAU, 2008).

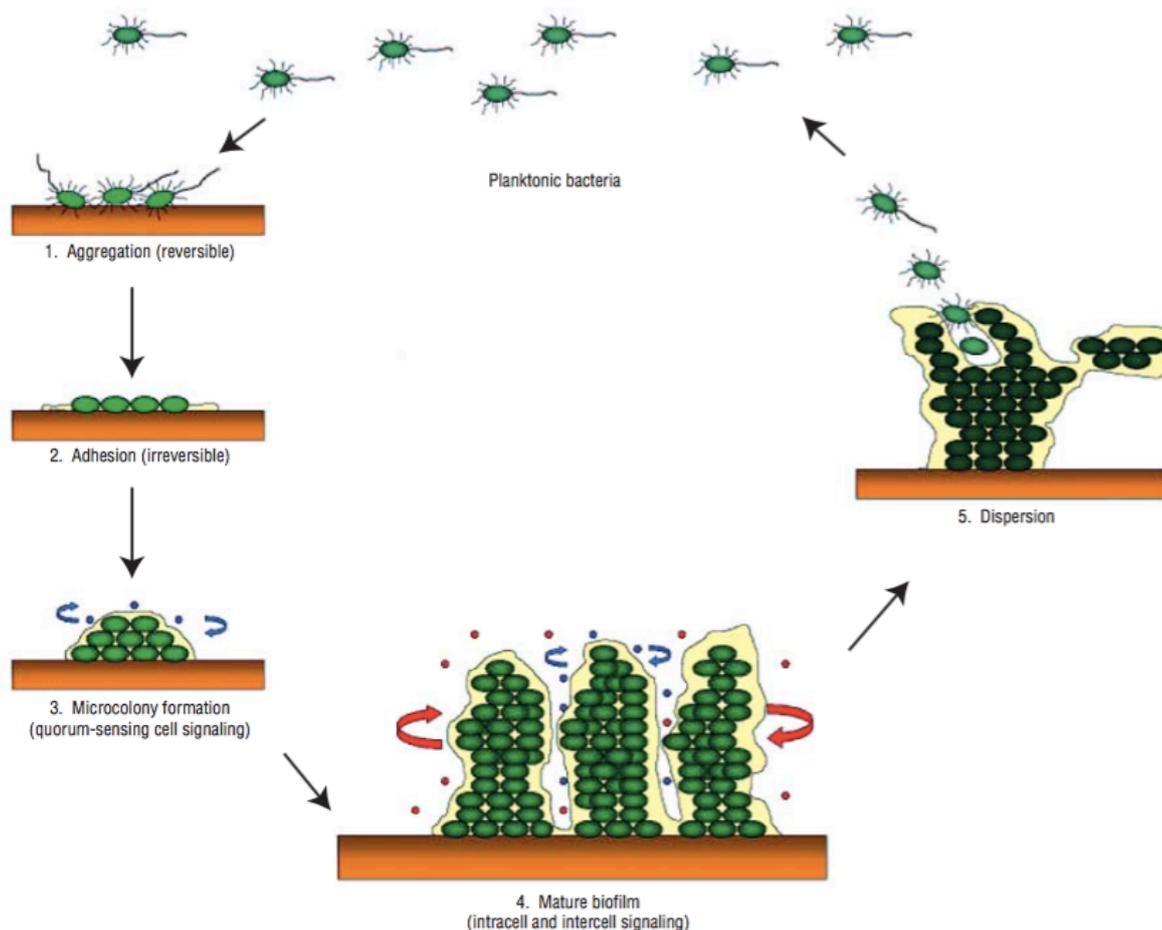


Figura 1. Ilustração da formação do biofilme. 1. Agregação bacteriana 2. Adesão bacteriana 3. Formação de microcolônia. 4. Biofilme maduro 5. Dispersão do biofilme. Fonte: Modificado de BEHLAU, 2008.

Especificamente sobre o biofilme de *S. aureus*, já foi demonstrado que biofilmes já formados têm maior virulência e resistência comparada a forma planctônica da bactéria e que quanto mais espesso for esse biofilme maior seu poder de virulência. Ainda foi visto que o biofilme formado contribui para a sobrevivência intracelular do *S. aureus* e, portanto, pode colaborar para infecções crônicas (OYAMA et al., 2016). Já é sabido que a maioria das drogas têm baixa permeabilidade e pouco poder de penetração no biofilme de *S. aureus*, o que já se mostra uma dificuldade terapêutica, e além disso, acrescenta-se o fato de haver diversos mecanismos bacterianos para desenvolver resistência. Sabe-se que *S. aureus* é resistente à β -lactâmicos e mais recentemente já há relatos indicando resistência a daptomicina, teicoplanina e vancomicina, usadas no tratamento de MRSA (*S. aureus* meticilina resistente) em infecções severas (GARDETE, 2014; GOMÉZ, et al. 2017),

Já foi demonstrado que soluções desinfetantes de lentes de contato, como Biotrue[®] e Opti-Free[®], são capazes de inibir a formação de biofilme por *S. aureus* e *P. aeruginosa*, cujos padrões de teste usados foram publicados no *Internacional Organization for Standardization* 14729 (ARTINI et al., 2015).

Inicialmente, o processo de cuidados com as lentes de contato tinha múltiplas etapas, por exemplo, o procedimento de limpeza separado da desinfecção. Com a introdução do uso das soluções polivalentes, os cuidados foram simplificados já que todas as substâncias ativas, de limpeza e desinfecção, se concentrariam em uma única solução. Uma das substâncias desinfetantes mais usadas é o peróxido de hidrogênio, porém o seu uso constante está relacionado a desenvolvimento de resistência dos microrganismos (MORGAN EFRON, 2006). Existem ainda as soluções com base em polihexametil biguanida (PHMB), o POLIQUAD e o ALDOX. Estudos mostram que as taxas de contaminação são maiores em soluções a base de PHMB quando comparadas ao POLIQUAD ou ALDOX. Foi demonstrado ainda que as soluções contendo ALDOX eram mais efetivas na redução da transferência do biofilme bacteriano dos estojos para as lentes de silicone hidrogel, quando esta permaneceu embebida na solução por 8 horas, se comparadas à soluções a base de PHMB. A cada dia, mais substâncias ativas com ação na formação de biofilmes vêm sendo pesquisadas, pela presença da resistência microbiana (WILLCOX, 2010).

O progressivo desenvolvimento de cepas de bactérias multirresistentes é um problema com o qual a medicina e as políticas públicas têm que lidar nos dias atuais, e diante disso se faz necessária a pesquisa por novas substâncias ativas, estimulando novas abordagens para tratar diferentes doenças infecciosas. Nesse aspecto, produtos naturais vêm ganhando espaço e notoriedade (WHO, 2014; NEWMAN et al., 2003).

A fitoterapia é um campo da medicina que usa plantas e seus princípios ativos para tratar doenças ou como agentes promotores de saúde. O seu uso, geralmente, preserva a composição e integridade da planta original, então é usada toda a planta ou a porcentagem desejada e minimamente alterada em preparações medicinais. Existem várias formas de uso dos fitoterápicos. Através do processo de manufatura, a indústria uniformiza o processo para que o produto final contenha uma concentração padrão da substância em questão (FALZON; BALABANOVA, 2017).

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades de flora do planeta, com 46.096 espécies de plantas em mais de 9 tipos diferentes de ecossistema (Flora do Brasil, 2015). Apesar do uso tradicional e da aceitação da população brasileira quanto ao uso de plantas medicinais, o número de produtos fitoterápicos registrados é menor que em outros países

(WHO, 2014). Desde 2006, o Brasil tem políticas públicas oficiais favorecendo e difundindo o uso de ervas medicinais. Após a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), a homeopatia, as plantas medicinais e fitoterápicos, a medicina tradicional chinesa/acupuntura, a medicina antroposófica e o termalismo social-cronoterapia foram institucionalizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da Saúde, Brasil, 2006).

Vários estudos demonstram o uso de práticas, compreendidas como medicina alternativa e complementar, em diversas partes do mundo, sendo que na França este percentual chegou a 75%, no Canadá atingiu 70% e nos Estados Unidos a 42% (OMS, 2002). A demanda crescente por terapias alternativas está relacionada a percepção, tanto por profissionais como pelos pacientes, das limitações na medicina convencional, aumento das doenças iatrogênicas e crônicas, e ainda busca por alternativas financeiras mais acessíveis (BRASIL, Ministério da Saúde, 2009).

A castanha de caju (*Anacardium occidentale*) é típica do Brasil e foi introduzida em outras partes do mundo com a intenção de conservação do solo. A plantação, atualmente, tem visado a extração da castanha, que tem um mercado já bem estabelecido nos Estados Unidos e na Europa e sua produção vem crescendo todos os anos. Em 2013, chegou a 4.44 milhões de toneladas. O pseudofruto é consumido *in natura*, ou sob a forma de sucos, chás e geleias (RABANY, 2015). Mais especificamente, é uma importante fonte de renda para a Região Nordeste do Brasil, com fazendas de plantio cobrindo cerca de 670.000 hectares, representando 99,5% do cultivo brasileiro. Sua produção ocorre na estação predominantemente seca, o que a favorece estrategicamente (OLIVEIRA, 2008).

A castanha de caju é composta de 35 a 45% pelo núcleo e 55 a 65 % da casca, que contém entre 15 a 30% um líquido viscoso de cor amarronzada chamado líquido da casca da castanha (LCC), que pode ser aproveitado pela indústria para diversas finalidades, ressaltando-se o fato que essa porção do fruto (casca) é geralmente descartado (MUBOFU; MGAYA, 2018). O LCC é um produto ainda pouco comercial, mas com grande potencial de exploração devido a sua constituição e diversos poderes biológicos como, antimicrobiano, anti-inflamatório, antitumoral, antioxidante e propriedade inseticidas (OLIVEIRA, 2010).

O LCC tem vários componentes, porém o ácido anacárdico (AA) é o elemento associado aos efeitos benéficos já descritos. A extração do LCC da casca da castanha requer alguns cuidados pela presença de componentes tóxicos, esse mesmo método de extração influencia em sua constituição. Quando realizado extração à frio contém aproximadamente 60 a 65 % de AA, 15 a 20% de cardol, 10% de cardanol e outras substâncias em menores proporções.

Quando realizada sob calor, o processo térmico conduz a descarboxilação do ácido anacárdico, o que no final do processo confere graus diferentes de dessaturação, sendo em torno de 5% saturado, 49% monoeno, 16% dieno e 30% trieno (SETIANTO et al., 2009).

O AA consiste em uma molécula com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, e sua atividade antimicrobiana é descrita através da interação entre o comprimento da cadeia lateral hidrofóbica com o grupo hidroxila hidrofílico – a porção hidrofílica se liga a um hidrogênio intermolecular da membrana plasmática da célula-alvo e, logo após, a porção hidrofóbica é hábil a entrar na bicamada lipídica da membrana celular, causando seu rompimento (GREEN et al., 2007). Há alguns anos evidenciou-se que o AA é ativo contra bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, *S. mutans* e *B. ammoniagenes* (HIMEJIMA; KUBO, 1991). Em adição a isso, ainda foi observado atividade bactericida do AA contra cepas de *S. aureus* suscetíveis e resistentes a metilina (FATMA; EGID, 2015). Em estudo combinado, onde o AA foi usado com bactericidas de uso padrão, revelou efeito sinérgico de ambos contra cepas de *S. aureus* (MUROI; KUBO, 1996).

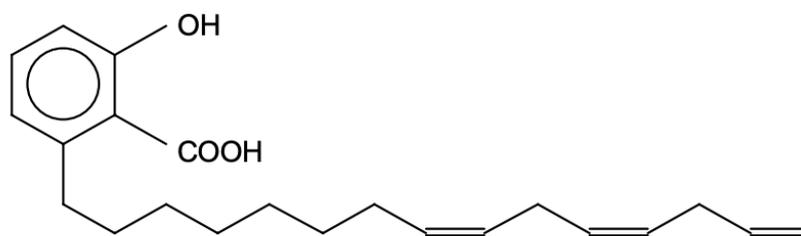


Figura 2. Estrutura química do ácido anacárdico tri insaturado
Fonte: AGOSTINI-COSTA et al., 2005.

A prevenção contra a formação do biofilme pelo *S. aureus* é mais desejável que tratar a infecção já instalada. Apesar de já existirem vários antibióticos e antissépticos, como clindamicina, rifampicina, sulfadiazina de prata e clorexidina, que são usados contra a formação do biofilme, o processo de resistência microbiana já extensamente descrito na literatura, evidencia a necessidade de novos ativos que possam ser empregados com a mesma finalidade (SCHLETT et. al 2014 e ZHOU et. al 2012). Mais recentemente, evidenciou-se a ação de AA contra a formação de biofilme pelo *S. aureus* (SAJEEVAN et al., 2018).

O campo da nanomedicina engloba a utilização de nanopartículas para diagnóstico e tratamento. Em geral, as nanopartículas são usadas como veículos para agentes com as mais diversas finalidades. Inúmeros materiais têm sido empregados nesta função como lipídeos, metais, silicone, polímeros, proteínas e outros. Eles podem resguardar a partícula ativa de

barreiras impostas pelo próprio organismo, diminuir a sua depuração e aumentar a concentração da droga no tecido alvo (PAOLINO et al., 2014; SHEN et al., 2014).

Nanopartículas são estruturas moleculares numa escala de 1-1000 metros (1 nanometro = 10^{-9} metros), com o principal objetivo de transpor barreiras biológicas e servir como carreador para outras substâncias. No campo da oftalmologia já vem sendo usada em doenças como retinopatia, degenerações retinianas e uveítes (MITRA et al., 2016; ADIJANTO; NAASG, 2015; PEPTU et al., 2015).

Como já descrito anteriormente, muitos antibióticos se mostram ineficientes ao tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus* devido à suas estratégias de desenvolvimento de resistência, e a nanomedicina tem se mostrado uma emergente forma terapêutica para superar tais mecanismos, por suas habilidades de inibir a formação do biofilme, penetração na matriz do biofilme e ainda potencializar a atividade antimicrobiana do agente antibacteriano por ela carregado. As nanopartículas tem ainda a capacidade de se acumular passivamente em órgãos e sítios de infecção por suas características especiais como a nano dimensão (PARK et al., 2018; YAZAR et al., 2012).

A zeína é a maior proteína de armazenamento do milho (*Zeamays L.*), insolúvel em água e consiste em quatro frações alfa, beta, gama e delta. A presença de mais de 50% de resíduos apolares como leucina, alanina e fenilalanina conferem sua característica hidrofóbica. Suas nanopartículas têm sido descritas como superiores a diversas outras nanopartículas proteicas para carreamento de drogas lipofílicas e nutrientes, principalmente pela não solubilidade em água, fácil preparação, alta reprodutibilidade, com elevado potencial biodegradável e biocompatível. A zeína tem solubilidade de 50 a 90% em solução aquosa-alcoólica portanto nanopartículas podem ser facilmente formadas, por manipulação de sua solubilidade pelo método de dispersão líquido- líquido. Como carreadora de drogas, a zeína tem ainda as vantagens de baixo custo, de sua origem vir de recursos renováveis, e de seu grande potencial de interação com diversos componentes das mais diferentes formas (LUO; WANG, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Entre as principais complicações por uso de lentes de contato, encontra-se a temida e potencialmente grave ceratite infecciosa. Na tentativa de evitar a contaminação das lentes e de seus estojos de armazenamento usam-se substâncias desinfetantes, porém diante do crescente e rápido processo de resistência bacteriana, faz-se necessário a pesquisa de novas substâncias ativas, e ainda novas formas de empregar as substâncias antimicrobianas já existentes. Nesse sentido, a atividade bactericida do ácido anacárdico já foi demonstrada, assim como a potencialização do efeito antimicrobiano com o uso de nanopartículas carreadoras. Porém a ação de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico em biofilme de *S. aureus* em lentes de contato ainda necessita de investigação.

3. OBJETIVO

Avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de zeínas carregadas com ácido anacárdico em biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados em lentes de contato de silicone hidrogel e em placas de cultura de células.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Este estudo trata-se de uma pesquisa experimental, laboratorial, *in vitro*.

4.2 Obtenção das nanopartículas

As nanopartículas de zeína (Sigma-aldrich®, Saint Louis, Missouri) contendo ácido anacárdico (9,337 mcg/ml) (AaNp) foram preparadas pela nanoprecipitação da proteína (SOUZA; ARAÚJO, 2017). Nanopartículas não carregadas com o ácido foram preparadas da mesma maneira, exceto pela ausência deste. Tamanho, índice de polidispersão (pDI), potencial ζ e pH para as nanopartículas carregadas com ácido foram: 381,6 nm \pm 2,122, 0,067, -15,9 mV e 4,4, respectivamente. A confecção desta formulação encontra-se registrada (patente número BR n 10201701193).

4.3 Preparo do Inóculo

Staphylococcus aureus, cepa ATCC 25923, foi utilizado como inóculo a fim de proporcionar formação de biofilme. Para tanto, foram primeiramente semeados em ágar sangue por 24h a 37°C.

Foram retirados 200 μ l da cepa congelada em meio de cultura BHI-glicerol (Brain Heart Infusion) (Difco Detroit, Michigan, USA) e transferidos para tubos contendo meio de cultura BHI suplementado com glicose (concentração final de glicose 1%). Os tubos foram armazenados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Após 24 horas, realizou-se estriamento por esgotamento desse caldo previamente inoculado em placas de BHI ágar sangue e a placa foi armazenada por 48 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. Assim, foi obtida a placa estoque, que foi utilizada para realização das 3 repetições desse experimento (triplicata) (Figura 3).

Para cada repetição do experimento foram analisados dois grupos distintos, Experimento 1, onde avaliou-se as lentes de contato e Experimento 2, onde foram avaliados os fundos de placa.

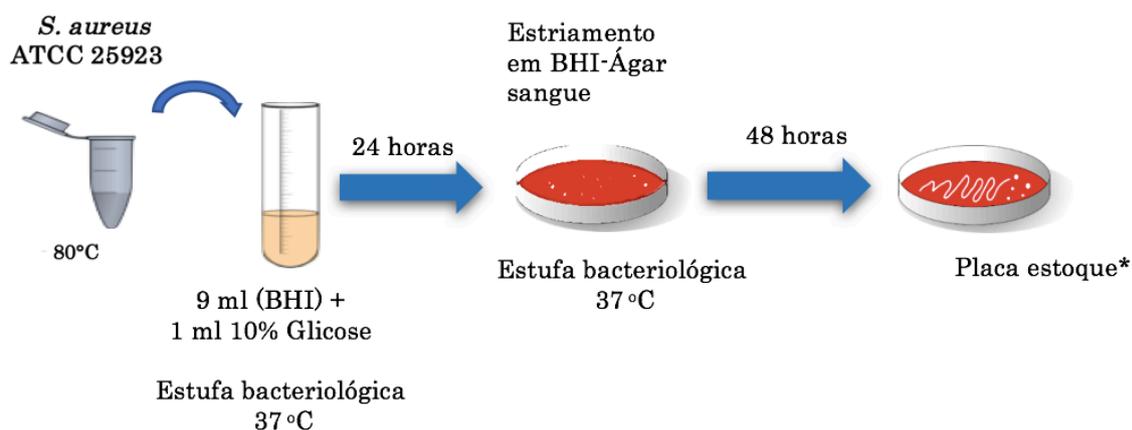


Figura 3. Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de *S. aureus* ATCC 25923. Fonte: Próprio autor.

4.4 Ativação e ajuste da concentração do inóculo

Da placa estoque, retirou-se 5 unidades formadoras de colônia (UFC) e estas transferidas para um tubo contendo 10 mL de BHI glicosado (glicose concentração final 1%). Os tubos permaneceram por 24h em estufa bacteriológica. Após este período, os tubos foram retirados da estufa e foi realizado o ajuste da concentração da cepa para a escala 5 Mac Farland, que corresponde a concentração de 15×10^8 UFC/mL (protocolo adaptado de Sidrim et al., 2016).

4.5 Formação do biofilme

Para a formação do biofilme, 875 uL de caldo BHI glicosado (concentração final de glicose 1%) foi distribuído em cada poço de uma placa de cultura de células de 24 poços (12 poços por experimento) e em seguida foi adicionado a cada poço 125 uL da suspensão previamente ajustada. Dessa forma, a concentração final de microrganismos foi $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (protocolo adaptado de Sidrim et al., 2016)

Em seguida, as lentes de contato foram imersas nos poços contendo o caldo de cultura e essas placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24h. Foram usadas lentes de contato Air Optics Aqua[®], da marca Alcon, lente de contato gelatinosa de uso diário e descarte mensal, composta por Lotrafilcon B 67% e água 33%, e estéreis à vapor.

4.6 Aplicação das formulações controles e experimentais

Após 24h, as placas foram retiradas da estufa e as lentes de contato transferidas para novos poços, estes contendo 1 mL das seguintes formulações, de acordo com os grupos delineados:

- Grupo 1: Solução Salina 0,89%
- Grupo 2: Nanopartícula zeína não carregada com AA
- Grupo 3: Nanopartícula zeína carregada com AA (Concentração 9,337 µg/mL)
- Grupo 4: Solução Renu[®] (Baush & Lomb)

A formulação Renu[®] é uma solução isotônica estéril contendo ácido bórico, edetato dissódico (EDTA), borato de sódio e cloreto de sódio, e tem ingredientes ativos: DYMED, HYDRANATE e POLOXAMINA.

As lentes permaneceram em contato com as soluções por 30 minutos. Após esse período, as mesmas foram transferidas para uma nova placa de 24 poços contendo caldo BHI glicosado. Essa placa foi armazenada em estufa bacteriológica a 37°C por 24h (Experimento 1- Lente de Contato).

Para estudo do biofilme formado no fundo da placa de 24 poços (Experimento 2 – Fundo de Placa), foi realizada a lavagem do biofilme para remoção de células bacterianas fracamente aderidas. Para isso, foi removido, delicadamente, por pipetagem, 500 uL do caldo de cultura e, acrescentado, delicadamente, por pipetagem, 500 uL das formulações de acordo com os grupos experimentais delineados acima. Após 30 minutos, 500 uL foram removidos delicadamente e foram acrescentados 500 uL de caldo BHI glicosado. Em seguida, a placa foi novamente colocada na estufa bacteriológica a 37 °C, aonde permaneceu por um período de 24h (Figura 4).

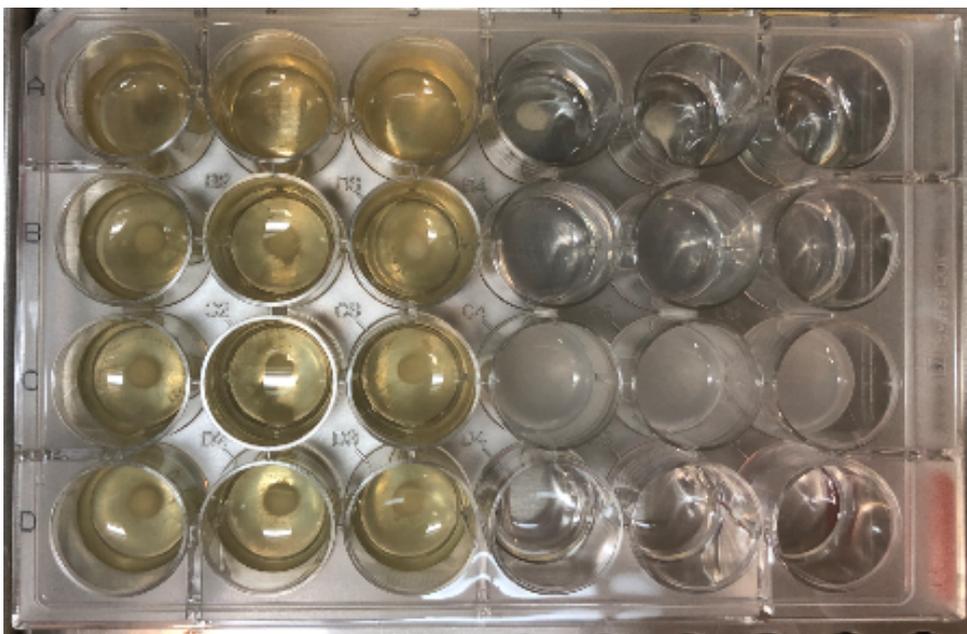


Figura 4. Placa de 24 poços contendo meio de cultura BHI caldo (esquerda da imagem) e soluções testadas no experimento (direita da imagem). Após um período inicial de 24h em contato com o caldo previamente inoculado com *S. aureus*, as lentes foram transferidas para as soluções a serem testadas aonde permaneceram por 30 minutos.

Fonte: Próprio autor.

4.7 Coleta do biofilme

Após 24h, as placas foram retiradas da estufa bacteriológica e foi repetido todo o procedimento realizado no dia anterior. Entretanto, imediatamente após o período de 30 min de imersão nas formulações, as lentes de contato contendo o biofilme foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 1 mL de solução salina 0,89%. Os tubos foram agitados e em seguida realizada diluição seriada até 10^{-4} . Após diluição, as amostras foram plaqueadas pelo método da gota em BHI ágar.

Para coleta do biofilme formado no fundo da placa, após 30 minutos de contato com as formulações, esse biofilme foi ressuspensionado por pipetagem e transferido para tubos eppendorfs. Os tubos foram agitados e em seguida realizada diluição seriada até 10^{-4} . Após diluição, as amostras foram plaqueadas pelo método da gota em BHI ágar (Difco Detroit, Michigan, USA) e as placas permaneceram por 24 h em estufa bacteriológica a 37°C para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).



Figura 5. Biofilme de *S. aureus* formados em lente de contato (48h de formação).
Fonte: Próprio autor.

4.8 Análise de dados

Os resultados dos ensaios microbiológicos foram transformados para logaritmo na base dez e foram calculadas as médias e desvios-padrões de cada grupo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson e então realizado o teste ANOVA seguido de pós-teste Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

No experimento 1 (biofilme formado em lentes de contato) o grupo Nano + AA (nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico) apresentou o menor número de unidades formadoras de colônia por mililitro de suspensão bacteriana (UFC/mL), com uma média \pm desvio padrão do logaritmo de UFC/mL de $3,90 \pm 2,40$, sendo este número inferior estatisticamente ($p < 0,05$) a média \pm desvio padrão observada no grupo salina ($6,89 \pm 0,50$) e no grupo Renu[®] ($7,36 \pm 0,34$). Apesar da maior redução obtida no grupo Nano + AA quanto comparado ao grupo onde as nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico foram testadas (Grupo Nano) (média \pm desvio padrão $5,21 \pm 1,45$), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1).

	Salina	Nano	Nano + AA	Renu [®]
Média	6,890	5,216	3,907	7,368
Desvio Padrão	0,505	1,458	2,406	0,349

Tabela 1. Média e Desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia/mL nos diferentes grupos experimentais, no experimento 1 (biofilme formado em lentes de contato). Dados expressos em logaritmo na base 10. Legenda: Salina (solução NaCl 0,89%); Nano (solução de nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico); Nano + AA (solução de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico); Renu[®] (solução comercial Renu[®]).

A viabilidade bacteriana observada após aplicação das formulações testadas no experimento 1 (biofilme formado em lentes de contato) pode ser visualizada na Figura 6.

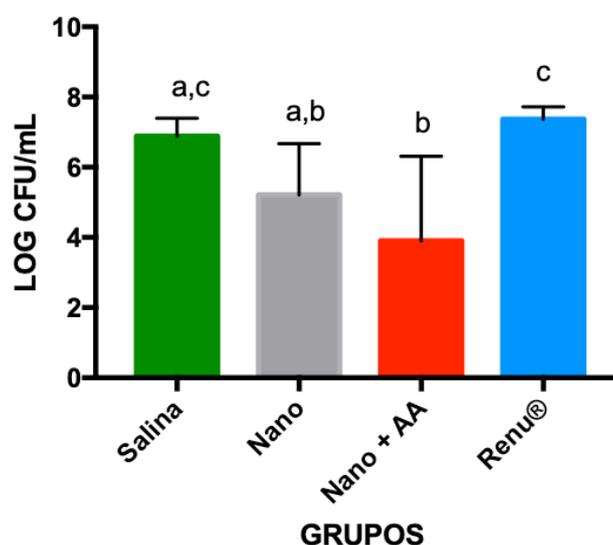


Figura 6. Análise da viabilidade bacteriana de biofilme de *S. aureus* formado em lentes de contato após aplicação das formulações. Legenda: Salina (solução NaCl 0,89%);

Nano (solução de nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico); Nano + AA (solução de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico); Renu[®] (solução comercial Renu[®]). Letras iguais representam grupos iguais estatisticamente.

O resultado do experimento 2 (biofilme formado no fundo da placa de cultura de células de 24 poços) pode ser visualizada na Tabela 2. Foi verificada a ausência de UFC/mL no grupo aonde a formulação experimental de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico foi testada (Grupo Nano+AA). Também foi observada uma discreta redução da viabilidade bacteriana no grupo controle positivo (Renu[®]) ($6,77 \pm 0,23$) quando comparada aos grupos onde foi testada a solução de NaCl 0,89% (Grupo Salina) ($7,38 \pm 0,50$) e a solução de nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico (Grupo Nano) ($7,44 \pm 0,46$) ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos Salina e Nano ($p > 0,05$).

	Salina	Nano	Nano + AA	Renu [®]
Média	7,389	7,447	0	6,771
Desvio Padrão	0,508	0,462	0	0,234

Tabela 2. Média e Desvio padrão do número de unidades formadoras de colônia/mL nos diferentes grupos experimentais, no experimento 2 (biofilme formado em placa de 24 poços). Dados expressos em logaritmo na base 10. Legenda: Salina (solução NaCL 0,89%); Nano (solução de nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico); Nano + AA (solução de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico); Renu[®] (solução comercial Renu[®])

A viabilidade bacteriana observada após aplicação das formulações testadas nos diferentes grupos pode ser visualizada na Figura 7.

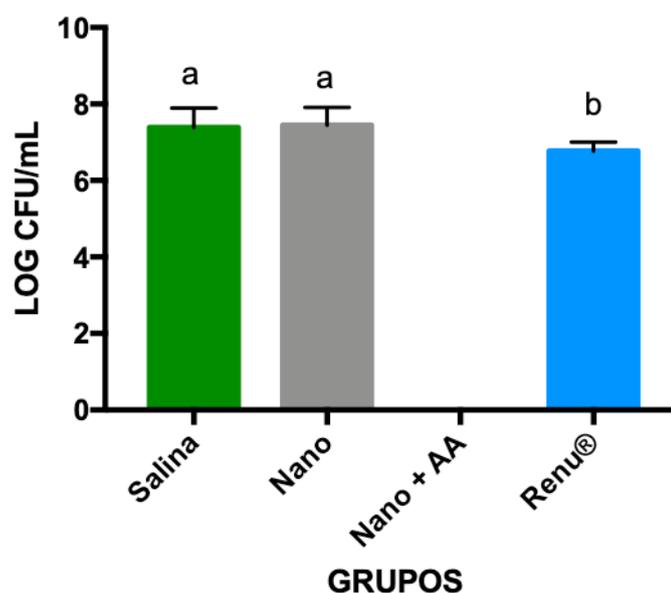


Figura 7. Análise da viabilidade bacteriana de biofilme de *S. aureus* formado em fundo de placa de cultura de células de 24 poços após aplicação das formulações. Legenda: Salina (solução NaCL 0,89%); Nano (solução de nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico); Nano + AA (solução de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico); Renu[®] (solução comercial Renu[®]). Letras iguais representam grupos iguais estatisticamente.

6. DISCUSSÃO

Erros refrativos não corrigidos lideram as causas de impacto na saúde visual nos indivíduos em todo o mundo. Terapias de baixo custo podem fornecer à população diferentes formas de correção proporcionando conforto e qualidade de vida, dentre elas estão o uso de lentes de contato (SWETHA et al., 2017). Contudo, o uso prolongado das lentes de contato está relacionado a variadas formas de comprometimento da saúde ocular, como hipóxia, neovascularização corneana e a mais temida ceratite infecciosa. A patogênese dessa infecção é multifatorial e inclui propensão a adesão bacteriana na lente de contato e quebra nos mecanismos de defesas (GARY, 2006).

Sabe-se que há diferenças na microbiota de usuário de lentes de contato quando comparadas a de não usuários, contudo em análises de cultura, mais de 50% dos swabs de conjuntiva ocular mostraram crescimento de bactérias semelhantes a pele, a maioria coagulase-negativo, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* e *Corynebacterium* porém em concentrações um pouco mais elevadas (BOUSLIMANI et al., 2015). A maioria dos casos de ceratite bacteriana, bem como a formação de úlcera corneana periférica, está relacionado a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, sendo que esta última é facilmente transmitida da pele saudável e mucosas para os olhos (CHENG, 1999).

No presente estudo optou-se por utilizar cepa de *S. aureus* para formação de biofilme em lentes de contato e assim avaliar a ação antimicrobiana do ácido anacárdico. McLaughlin-Borlace, em 1998, já havia demonstrado que crescimento bacteriano através da formação do biofilme dificulta a atividade de agentes antimicrobianos em lentes de contato.

Na análise dos resultados do grupo Salina, grupo controle negativo, com os demais grupos, tanto no experimento 1 (biofilme formado em lentes de contato) como no experimento 2 (biofilme formado no fundo da placa de 24 poços), ficou evidente não haver atividade antimicrobiana frente a biofilmes de *Staphylococcus aureus*. Em comparação com o grupo Nano (nanopartículas de zeína não carregadas com ácido anacárdico), nos dois experimentos, não houve diferença significativa. Entretanto, no experimento 1, o grupo Nano demonstrou alguma atividade antimicrobiana, reduzindo a viabilidade bacteriana, sendo esta redução comparável estatisticamente a obtida no grupo Nano + AA (nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico), não sendo possível

identificar se essa ação seria na inibição da formação, na dispersão do biofilme, ou através de outro mecanismo bactericida.

O glicocálix, principal componente do biofilme bacteriano, é tipicamente aniônico, e algumas nanopartículas catiônicas carregadas com agentes antimicrobianos são uma nova promessa de tratamento para infecções com *S. aureus*, como por exemplo a ceftazidima catiônica lipossomal que demonstrou notável inibição a formação do biofilme de *S. aureus*, quando comparada a solução simples de ceftazidima (ZHOU et al., 2012). A atividade antimicrobiana da nanopartículas é determinada por sua capacidade de penetrar células e alcançar o alvo predeterminado por diferentes mecanismos, incluindo fagocitose e nanofagocitose, que podem influenciar na absorção e distribuição celular, interferindo nos efeitos terapêuticos (XIE, 2014). Dentro da oftalmologia, as nanopartículas já vem sendo usadas de formas variadas, em lentes de contato para administração de acetazolamida em portadores de glaucoma (DHESINGH; PRAKASH, 2016), implantes subconjuntivais de ciclosporina para tratar olho seco (YAVUZ et al., 2016) e ainda para tratar uveítes e retinopatias. Outros materiais nanoparticulados, como nanopartículas de ouro e prata, também foram testados como antimicrobianos em biofilmes de *S. aureus* formados em lentes de contato (HERNANDEZ, 2008).

A nanopartícula zeína é utilizada como carreador de uma diversidade de materiais para fins antimicrobianos, incluindo fitoterápicos (KAMALEDDIN, 2017), prata e óxido de magnésio (VAHEDIKIA et al., 2019; EL-RASHIDY et al., 2018; NAGUIB et al., 2018).

O grupo Nano + AA evidenciou uma importante ação antimicrobiana, após os 30 minutos de exposição à formulação, tanto no experimento 1 quanto no experimento 2. Esta ação foi mais evidente em biofilmes formados em fundo de placa (experimento 2), onde não foi identificada viabilidade bacteriana após exposição à droga. Este grupo pode se assemelhar aos estojos de armazenamento de lente de contato, apesar do fundo da placa de 24 poços ser um local mais propício para proliferação microbiana e formação de biofilme. Estudo anterior demonstrou que nos estojos das lentes de contato foram identificados maiores índices de contaminação do que nas próprias lentes de contato, o que viria a sugerir que eles seriam fonte inicial da contaminação, já que os mesmos são um meio estático e com pouca oferta de nutrientes, configurando meio favorável a formação do biofilme (MCLAUGHLIN-BORLACE, 1998). Mesmo sendo em diferentes materiais e protocolo, a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico em biofilmes de *S. aureus* já havia sido demonstrada em estudo anterior, quando foi testada a sua atividade antimicrobiana em cateteres de silicone e então foi evidenciada atuação antimicrobiana na inibição da

colonização pelo *S. aureus*, e na dispersão de biofilmes pré-formados (SAJEEVAN, 2018). Não foram encontrados estudos que relacionem a ação antimicrobiana do ácido anacárdico em lentes de contato ou em seus estojos, logo o presente estudo vem para dar início a uma possível alternativa.

A atividade antimicrobiana do AA também já foi demonstrada diante do biofilme de *S. mutans* em diversos estudos (HIMEJIMA; KUBO, 1991; MUROI; KUBO, 1993). Em estudo mais recente foi sugerido que a atividade antimicrobiana do AA contra o biofilme de *S. mutans* poderia não ser tão eficiente (GREEN et al., 2007). Contudo, no presente estudo observou-se a atividade do AA nanoparticulado, o que sugere que essa combinação otimize o efeito antimicrobiano descrito em alguns estudos. O pequeno diâmetro das nanopartículas aumenta não somente suas propriedades mecânicas, mas também sua ação antimicrobiana devido a sua alta relação superfície-volume, provocando dano às membranas celulares. Sua grande vantagem sobre os antimicrobianos convencionais é não ser afetada pelos mecanismos que fazem com que os organismos fiquem a eles resistentes, pois formam um contato direto com a parede celular bacteriana, em vez de penetrá-la, sendo também sistemas ideais de entrega de drogas (BAPAT et al., 2018)

Os grupos não foram avaliados após o tempo de 30 minutos, o que poderia identificar incremento, no grupo Nano +AA, de seu potencial de atividade antimicrobiana no experimento 1 (lente de contato). Em soluções polivalentes de desinfecção já usadas pelo mercado, essa atividade tende a crescer com o passar do tempo (ALI, 2016).

Com o objetivo de evitar a contaminação das lentes de contato e a consequente infecção, estão disponíveis diversas formulações, entre elas SOLO care[®], Opti-Free[®] e Renu[®]. Em estudo comparativo entre elas, todas mostraram-se eficientes antimicrobianos, com atividade crescente ao longo do tempo, utilizando como parâmetros os tempos preconizados pelos fabricantes, de 4 horas para o Renu e de 6 horas para o SOLO-care e Opti-Free. Foi identificada ainda melhor atividade antimicrobiana em relação ao *S. aureus* das soluções Renu e Opti-Free quando avaliado período de tempo mais curto de sua atividade, cerca de 90 minutos e quando avaliado período maior de atividade, cerca de 5 horas, a solução SOLO-care se mostrou mais efetiva (ALI, 2016). No presente estudo, a solução Renu[®] foi utilizada como controle positivo, por um período de 30 minutos. Contudo, esta solução não mostrou atividade antimicrobiana como relatado nos estudos descritos anteriormente. A este achado pode implicar-se o fato de o tempo de exposição à solução não ter sido suficiente, apesar do estudo de Ali, em 2016, já descrever suas atividades nas primeiras horas de exposição a droga.

Logo, quando se analisa o fator tempo de 30 min e viabilidade bacteriana nos respectivos grupos contendo ácido anacárdico (AA) e Renu, o primeiro evidenciou maior atividade antimicrobiana e pode revelar-se uma nova alternativa para soluções desinfetantes de lentes e estojos de lentes de contato em curto espaço de tempo.

Já foi reportado que biofilmes formados em superfícies de lentes de contato apresentam crescente resistência bacteriana às usuais substâncias ativas das soluções de desinfecção (SZCZOTKA-FLYNN, 2009).

Em decorrência desse fato, a necessidade de novas soluções antimicrobianas para desinfecção se faz presente e foi demonstrada por Fraga, em 2015, que avaliou a eficácia de uma nova formulação, Avizor Alvera® , a base de aloe vera, que se mostrou eficiente antimicrobiano e confortável ao uso. A efetividade de uma nova substância desinfetante, a base de cloridrato de amônia, foi analisada e obteve bons resultados em *Acanthamoeba castellanii* (FEARS, 2018). Ambos os estudos corroboraram com a ideia original do presente ensaio, que seria prover ao mercado uma nova substância antimicrobiana que possa ser usada também em lentes de contato.

Diante do fato de que a evolução dos patógenos e o desenvolvimento de resistência bacteriana são mais rápidos que a descoberta e desenvolvimento de novas drogas, o sistema de nanopartículas com múltiplos mecanismo de ação bactericidas se mostra eficaz. Frente a esses desafios terapêuticos nas infecções por *S. aureus*, é necessário descobrir e desenvolver novos nanosistemas com real ação, já que a efetividade antimicrobiana das nanopartículas não depende somente do carregamento e apresentação da droga, mas também da localização e do mecanismo de interação entre a o sistema de transporte, o agente e a bactéria (XIE, 2014).

Apesar da significativa atividade antimicrobiana de nanopartículas de zeína carregadas com ácido anacárdico frente à biofilmes de *S. aureus* evidenciada no presente estudo, ressalta-se que outros estudos analisando a toxicidade desta formulação em tecido ocular, e a análise de possíveis efeitos adversos do ácido anacárdico na estrutura da lente de contato são necessários.

7. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram uma atividade em potencial quanto ao uso do AA carregado pela nanopartículas de zeína, por seu evidenciado efeito antimicrobiano em biofilme de *S. aureus*, sendo esta uma possibilidade de alternativa futura ao mercado de soluções desinfetantes para lente de contato.

REFERÊNCIAS

ADIJANTO, J.; NAASH, M. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 95, p.353-67, 2015.

AGOSTINI-COSTA.; et al. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/186370/1/cot122.pdf>, 2005.

ALI, K.; MUSTAFA I.; KAYA. S.. The comparison of antimicrobial effectiveness of contact lens solutions. **Int Ophthalmol**, 2016.

ARTINI, M.; et al. Evaluation of contact lens multi- purpose solutions on bacterial biofilm development. **Eye Contact Lens**, v. 41, n.3, p.177–182, 2015.

BAPAT, R. A.; et al. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. **Drug Discov Today**, v. 00, p.1-14, 2018.

BEHLAU, I. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Archives of Ophthalmology*, v. 126, n. 11, p. 1572, 2008.

BOBROW, J. C.; BREADSLEY, T. L.; JICK, S. L. et al. Lens and cataract. **San Francisco: American Academy of Ophthalmology**, 2016.

BOUSLIMANI, A.; et al. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, p. 2120–2129, 2015.

BOURNE, R.; PRICE, H.; STEVENS, G.; GROUP GBDVLE. Global burden of visual impairment and blindness. **Arch Ophthalmol**, v. 130, n.5, p. 645–647, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências**, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**, 2009.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNE, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017–1032, 2011.

CASTAGNO, V. D.; FASSA, A. C. G.; SILVA, C. M.; CARRET, M. L. V. Carência de atenção à saúde ocular no setor público: um estudo de base populacional. **Cad. Saúde Pública**. v. 25, p. 2260- 2272, 2009.

CAVANAGH, H. D. The effects of low- and hyper-Dk contact lenses on corneal epithelial homeostasis. **Ophthalmol Clin North Am**, v. 16, p. 311–325, 2003.

CHENG, K. H; et al. Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. **Lancet**, v. 354, p. 181–185, 1999.

CONGDON, N. G.; FRIEDMAN, D. S.; LIETMAN, T. Important causes of visual impairment in the world today. **JAMA**, v. 290, 2003.

CONTACT LENS COUNCIL website (<http://www.contactlenscouncil.org/stats.htm>)
Accessed June 15, 2005.

DANDONA, R.; DANDONA, L.; SRINIVAS, M.; et al. Population-based assessment of refractive error in India: the Andhra Pradesh eye disease study. **Clin Exp Ophthalmol**, v. 30, p. 84–93, 2002.

DART, J. The inside story: why contact lens cases become contaminated. **Contact Lens Anterior Eye**, v. 20, p.113–8, 1997.

DHESINGH, R. S.; PRAKASH, M.; Nanoparticle Modified Drug Loaded Biodegradable Polymeric Contact Lenses For Sustainable Ocular Drug Delivery. **Curr Drug Deliv**, 2016.

DRENKARD, E.; Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes Infect**, v. 5, p. 1213–9, 2003.

EL-RASHIDY, A. A.; et al. Antibacterial activity and biocompatibility of **zein** scaffolds containing silver-doped bioactive glass. *Biomed Mater.* v. 6. 2018.

FALZON, C. C.; BALABANOVA, A. Primary Care: Clinics in Office Practice. **Phytotherapy**. n. 44, v. 2, p. 217–227, 2017.

FATMA, B.; HAMAD, E.; MUBOFU, B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **Int J Mol Sci**, 2015.

FEARS, C. A.; et al. Comparative in vitro effectiveness of a novel contact lens multipurpose solution on *Acanthamoeba castellanii*. **J ophthalmic inflamm infect**, 2018.

FERRAZ, F. H.; et al. Refractive errors in a Brazilian population: age and sex distribution. **Ophthalmic and Physiological Optics**, v. 35, n. 1, p. 19–27, 2014.

FLORA DO BRASIL, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>, 2015.

FRAGA, J. P.; ARAUZO, F. B.; RODRIGUEZ, R. U.; GARCIA, M. G. Evaluation of safety and efficacy of a new multipurpose disinfecting solution on silicone hydrogel contact lens. **J Optom**, 2015.

GARDETE S, TOMASZ A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest**, v. 124, n. 7, p. 2836–2840. 2014.

GARY, N.; FOULKS, M. D. Prolonging Contact Lens Wear and Making. Contact Lens Wear Safer. **Am J Ophthalmol**, v. 141, p. 369–373, 2006.

GÓMEZ, C. N.; SILLER, R., M.; MUÑOZ, B. J. L. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. **Rev Esp Quimioter**, v. 30, n. 6, p. 391–396. 2017.

GREEN, M.; APEL, A.; STAPLETON, F. Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. **Cornea**. v. 27, n. 1, p. 22–27, 2008.

- GREEN, I. R.; et al. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6236–6241, 2007.
- GREIN, H. J.; SCHMIDT, O.; RITSCHKE, A. Zur Reproduzierbarkeit von Refraktionsbestimmungen. **Ophthalmologe**. v. 11, p. 1057–64, 2014.
- HERNANDEZ, S. J. F.; et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomed Nanotechnol Biol Med**, v.4, p. 237–40, 2008.
- HIMEJIMA, M., KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 418–421, 1991.
- JONES, G. C.; et al. Effects of depressive symptoms on health behavior practices among older adults with vision loss. **Rehabil Psychol**, v. 54, n. 2, p.164-172, 2009.
- KAMALEDDIN, M. A. Nano-ophthalmology: Applications and considerations. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.13, n. 4, p. 1459–1472, 2017.
- KARA-JÚNIOR, N.; DELLAPI, R. J. R.; ESPÍNDOLA, R. F. D. Dificuldades de acesso ao tratamento de pacientes com indicação de cirurgia de catarata nos Sistemas de Saúde Público e Privado. **Arq Bras Oftalmol**, v. 74, p. 323–325, 2011.
- LEE, D. J.; et al Visual acuity impairment and mortality in US adults. **Arch Ophthalmol**, v.120, n. 11, p.1544-1550, 2002.
- LI, Y.; et al. Visual impairment and health-related quality of life among elderly adults with age-related eye diseases. **Qual Life Res**, v. 20, n. 6, p.845-852, 2011.
- MCLAUGHLIN-BORLACE; STAPLETON; MATHESON; DART. Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, n.5, p. 827–838. 1998.
- MEDINA, N. H; MUÑOZ, E. H. Atenção a saúde ocular da pessoa idosa. **Bepa**, v. 8, n. 85, p. 23-28, 2011.
- MITCHELL, L.; et al. Mechanisms for how inhaled multiwalled carbon nanotubes suppress systemic immune function in mice. **Nat Nanotechnol**, v. 4, p. 451, 2009.
- MITRA, R. N.; et al. Nanoparticle-mediated miR200-b delivery for the treatment of diabetic retinopathy. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 236, p.31-7, 2016.
- MORGAN, P. B.; EFRON, N. A. Decade of contact lens prescribing trends in the United Kingdom (1996–2005). **Contact Lens Anterior Eye**, n. 29, p. 59–68, 2006.
- MORGAN, P. B.; et al. Incidence of keratitis of varying severity among contact lens wearers. **Br J Ophthalmol**, v. 89, p. 430 – 436, 2005.

- MORGAN, P. B.; et al. Global trends in prescribing contact lenses for extended wear. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 34, n. 1, p. 32–5, 2011.
- MUBOFU, E. B.; MGAYA, J. E. Chemical Valorization of Cashew Nut Shell Waste. **Topics in Current Chemistry**, 2018.
- MUROI, H.; KUBO, I.; Antibacterial activity of anacardic acid and totarol, alone and in combination with methicillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Bacteriol**, v. 80, p. 387–394, 1996.
- NAGUIB, G. H.; et al. Zein based magnesium oxide nanoparticles: Assessment of antimicrobial activity for dental implications. **Pak J Pharm Sci**, v. 3, n. 1, p, 245-250. 2018.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod**, v. 66, p. 1022–1037, 2003.
- NICOLSON, P. C.; BARON, R. C.; CHABRECEK, P. Methods of forming an extended wear ophthalmic lens having a hydrophilic surface. **Ciba Vision Corporation, assignee. US patent 5306352**. August 4, 1998.
- OLIVEIRA, M. S. C.; et al. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents, **Acta Trop**, 2010.
- OLIVEIRA, V. H.; Cashew crop. **Rev. Bras. Frutic**, v. 30, n. 1, p. 284. 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Estratégia da OMS Sobre Medicina Tradicional. 2002-2005. Genebra: OMS, 2002.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2014.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). 7o IRCH meeting. Lisboa, 2014.
- OYAMA, T.; et al. Biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survive in kupffer cells and exhibit high virulence in mice. **Toxins**. v. 8, p.7, n. 98, 2016.
- PARK, S. B.; et al. Proteomic analysis of antimicrobial effects of pegylated silver coated carbon nanotubes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J Nanobiotechnology**, v. 16, p. 1, n.31. 2018.
- PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. **Br J Ophthalmol**, v. 96, n. 5, p. 614-8, 2012.
- PAOLINO, D.; COSCO, D.; GASPARI, M.; et al. Targeting the thyroid gland with thyroid stimulating hormone (TSH)-nanoliposomes. **Biomaterials**, v. 35, n. 25, p.7101–7109, 2014.

PEPTU, C. A.; POPA, M.; SAVIN, C.; POPA, R. F.; OCHIUZ, L. Modern drug delivery systems for targeting the posterior segment of the eye. **Curr Pharm Des**, v. 21, n. 42, p.6055-69, 2015.

RABANY, C.; RULLIER, N.; RICAU, P.; The African cashew sector in 2015. **General trends and country profiles**, 2015.

SAJEEVAN, S. E.; et al. Impregnation of catheters with anacardic acid from cashew nut shell prevents *Staphylococcus aureus* biofilm development. **Journal of Applied Microbiology**, 2018.

SCHLETT, C. D.; et al. Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 58, n. 4404–4410, 2014.

SETIANTO, W. B.; et al. Pressure profile separation of phenolic liquid compounds from cashew (*Anacardium occidentale*) shell with supercritical carbon dioxide and aspects of its phase equilibria. **J. Supercrit. Fluids**, v. 48, p. 203–210, 2009.

SIDRIM, J. J. C.; et al. Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, v. 33, n. 1, p. 88-97, 2017.

SOUZA, F. F. O.; ARAÚJO, J. T. C. Nanopartículas de ácido anacárdico extraído do caju e seu uso como agente bactericida e larvicida. Número do registro: BR n 10201701193. **Universidade Federal do Amapá**, 2017.

SHEN, J.; KIM, H. C.; SU, H.; et al. Cyclodextrin and polyethylenimine functionalized mesoporous silica nanoparticles for delivery of siRNA cancer therapeutics. **Theranostics**, v. 4, n. 5, p. 487–497, 2014.

STAPLETON, F.; et al. The incidence of contact lens-related microbial keratitis in Australia. **Ophthalmology**. v. 115, n. 10, p. 1655–1662, 2008.

STRETTON, S.; JALBERT, I.; SWEENEY, D. F. Cornea hypoxia secondary to contact lenses: the effect of high-Dk lenses. **Ophthalmol Clin N Amer.** v. 16, p. 327–340, 2003.

SZCZOTKA-FLYNN, L. B.; IMAMURA, Y.; CHANDRA, J.; et al. Increased resistance of contact lens-related bacterial biofilms to antimicrobial activity of soft contact lens care solutions. **Cornea**, v. 28, p. 918–926, 2009.

TSAOUSIS, G.; SAKKIAS, N.; KOZEIS.; TAHIAOS P.A. Management dilemma: infectious keratitis associated with soft contact lens use and dubious treatment compliance. **Case Rep. Med.** n. 1, p. 3. 2010.

ULLDEMOLINS, A. R.; LANSINGH, V. C.; VALENCIA, L. G.; et al. Social inequalities in blindness and visual impairment: a review of social determinants. **Indian J Ophthalmol**, v. 60, n. 5, p.368–375, 2012.

ULRICH, S.; et al. Refractive errors. Epidemiology, Effects and Treatment Options *Deutsches Ärzteblatt International* | **Dtsch Arztebl Int**, v.113, p. 693–702, 2016.

V, SWETHA.; et al. Refractive error in underserved adults: causes and potential solutions. **Curr Opin Ophthalmol**, v.28, p. 299–304, 2017.

VARMA, R.; VAJARANANT, T. S.; BURKEMPER, B.; WU, S.; TORRES, M.; HSU, C.; et al. Visual Impairment and Blindness in Adults in the United States: Demographic and Geographic Variations From 2015 to 2050. The study evaluated the demographic and geographic variations in VI and blindness in US adults in 2015 and estimated the projected prevalence in 2050. **Jama Ophthalmol**, v.134, n.7, p. 802–9, 2016.

VAHEDIKIA, N.; et al. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 1, n. 177, p. 25-32, 2019.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535–2554, 2009.

WILEY, L.; et al. Bacterial biofilm diversity in contact lens-related disease: emerging role of *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, and *Delftia*. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, p. 3896–905, 2012.

WILLCOX, M. D.; et al. Contact lens case contamination during daily wear of silicone hydrogels. **Optom Vis Sci**, v. 87, p. 456–64, 2010.

WOLFRAM, C.; HÖHN, R.; KOTTLER, U.; et al. Prevalence of refractive errors in the European adult population: the Gutenberg Health Study(GHS). **Br J Ophthalmol**, v. 98, p. 857–61, 2014.

XIE, S.; et al. Biodegradable nanoparticles for intracellular delivery of antimicrobial agents. **J Control Release**, v. 187, p. 101–117. 2014.

Y, LUO.; Q, WANG. **Journal of Applied Polymer Science**, v.131, 2014.

YAVUZ, B.; et al. In vivo tissue distribution and efficacy studies for cyclosporin A loaded nano-decorated subconjunctival implants. **Drug Deliv**, v. 23, n. 9, p. 3279-84, 2016.

YAZAR, E.; et al. Determination of intracellular (neutrophil and monocyte) concentrations of free and liposome encapsulated ampicillin in sheep. **Veterinární Medicína**, v. 51, n. 2, p. 51–54. 2012.

YUNG, M.S.; BOOST, M.; CHO, P.; YAP, M. Microbial contamination of contact lenses and lens care accessories of soft contact lens wearers (university students) in Hong Kong. **Ophthalmic Physiol Opt**, v. 27, p. 11–21, 2007.

ZHOU, W., et al. Molecular characterization of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a Chinese teaching hospital from Anhui, China. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 240, 2012.

ZHOU, T. H.; et al. Nano-hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ceramics scaffolds loaded with cationic liposomal ceftazidime: preparation, release characteristics *in vitro* and inhibition to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 38, n. 11, p. 1298–1304. 2012.