



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

MIRELLE TAKAKI

**“ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DE
DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA CONTRA FUNGOS
DO GÊNERO *Aspergillus*: INTERAÇÃO COM MODELOS DE
MEMBRANAS”**

São José do Rio Preto
2015

MIRELLE TAKAKI

**“ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DE
DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA CONTRA FUNGOS
DO GÊNERO *Aspergillus*: INTERAÇÃO COM MODELOS DE
MEMBRANAS”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química – Área de Concentração Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto

2015

Takaki, Mirelle.

Estudo físico-químico da atividade fungicida de derivados anfílicos de quitosana contra fungos do gênero *Aspergillus* : interação com modelos de membranas / Mirelle Takaki. -- São José do Rio Preto, 2015

77 f. : il., tabs.

Orientador: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química. 2. Físico-química. 3. Quitosana. 4. Atividade antifúngica. 5. *Aspergillus flavus*. I. Tiera, Vera Aparecida de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 541.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

MIRELLE TAKAKI

**“ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DE
DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA CONTRA FUNGOS
DO GÊNERO *Aspergillus*: INTERAÇÃO COM MODELOS DE
MEMBRANAS”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química – Área de Concentração Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Dayane Batista Tada
UNIFESP – São José dos Campos

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Cássio e Devanir, que são meus exemplos de vida e os principais responsáveis pelo meu desejo de ser, a cada dia, uma pessoa melhor, em todos os aspectos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tudo de maravilhoso que tem feito em minha vida, por ter me dado coragem para seguir em frente, sabedoria para vencer as dificuldades, determinação para alcançar meus objetivos e fé para nunca desistir. Agradeço, também, por ter colocado em minha vida pessoas tão maravilhosas que colaboraram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Cássio e Devanir, pelo amor incondicional em todos os momentos de minha vida, por todo apoio, por sempre acreditarem na minha capacidade e por nunca terem medido esforços para que eu realizasse os meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão, Alexandre, pela preocupação, pela ajuda e pelo apoio.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vera Tiera pelos 5 anos de orientação, pela confiança em mim e em meu trabalho, pela amizade, preocupação, paciência, disponibilidade, por todo conhecimento compartilhado e por ter me propiciado as melhores oportunidades durante todo o tempo que trabalhamos juntas.

Ao Prof. Dr. Marcio Tiera pela amizade, pela confiança, disponibilidade em me ajudar nos momentos de dúvida e por todo o conhecimento compartilhado.

Às irmãs que a vida me deu, Amanda e Anna Carolina, os meus braços direito e esquerdo, que sempre estiveram comigo, que me apoiaram nos momentos de decisão, me ajudaram nos momentos de dificuldade, me tranquilizaram nos momentos de desespero e com quem eu sempre pude contar.

À Dr^a Márcia Cabrera por toda colaboração, ensinamentos, pela paciência, por ter me ajudado durante toda a realização dos experimentos envolvendo as vesículas e por toda a disponibilidade.

Ao Pedro por todo carinho, amizade, companheirismo, apoio, prontidão em me socorrer nos momentos de necessidade e por ter tornado os meus dias mais alegres e menos difíceis.

À todos os amigos de laboratório, a família LBN, pelos momentos de descontração e por tornarem a realização deste trabalho muito mais prazerosa e divertida. Agradeço especialmente ao Vitor, Ricchard, Aline e Larissa.

Aos meus amigos de mestrado Bruno Trevizan, Airton, Mariana, Vágner, Hortênsia, Laís, Isabela, Maria Eduarda e Éder, pelos momentos de descontração, pelas risadas, por todo o incentivo que sempre demos uns aos outros.

Ao Rafael Pedro, por todos os ensinamentos transmitidos desde o meu ingresso no laboratório, pela amizade e pela ajuda em todos os momentos que precisei. Agradeço também à Juliana e à Hellen, minhas parceiras de laboratório desde 2009 e amigas com quem eu sempre pude contar em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE, especialmente ao Claudinei e à Eliane.

À Ana Claudia Vieira, técnica do Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, pela ajuda com as análises de microscopia confocal à laser.

Ao Fábio e ao Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular pelas análises de RMN de ^1H realizadas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas em minha iniciação científica e em meu mestrado, que possibilitaram a aquisição de materiais, a participação em eventos científicos e que foram de tamanha importância para o meu crescimento profissional.

Por fim, agradeço à todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho.

MUITÍSSIMO OBRIGADA!

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio” (Martin Luther King).

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese, caracterização e estudo das propriedades antimicrobianas de derivados anfifílicos de quitosana contra o fungo *Aspergillus flavus*. A quitosana utilizada nas sínteses foi obtida a partir da reação de desacetilação heterogênea de quitosana comercial. O grau médio de desacetilação foi determinado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, cujo resultado foi de 97,3%. As massas moleculares das quitosanas comercial e desacetilada foram determinadas por cromatografia de permeação em gel e os resultados obtidos foram 338,46 kDa e 137,12 kDa, respectivamente. Os derivados anfifílicos foram sintetizados em um processo de duas etapas: inicialmente realizou-se a alquilação da quitosana desacetilada pela inserção de uma proporção fixa de grupos dodecila (4%) na cadeia polimérica com posterior redução da base de Schiff empregando-se borocianohidreto de sódio. Em seguida foram inseridas proporções crescentes do grupo quaternário pentiltrimetilamônio. Os graus de substituição com grupos dodecila (GS_{DD}) e grupos pentiltrimetilamônio (GD_{PE}) foram determinados por RMN de ¹H. O GS_{DD} obtido foi de 4,0%, enquanto que os GD_{PE} foram de 4,8; 12,7 e 46,3%. Todos os derivados sintetizados foram testados *in vitro* contra o fungo *Aspergillus flavus* em concentrações crescentes. Os ensaios microbiológicos mostraram que os derivados modificados com grupos dodecila e pentiltrimetilamônio são mais eficientes em inibir o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* quando comparado à quitosana desacetilada e que a presença de grupos hidrofóbicos na cadeia do polímero proporciona uma interação mais forte com a membrana celular. Os resultados dos estudos utilizando modelos de membranas corroboraram com os dos ensaios microbiológicos, evidenciando que a presença de grupos dodecila na cadeia da quitosana aumenta a interação com as vesículas, resultando em um aumento no diâmetro e no potencial zeta. Em princípio pode-se postular que o mecanismo de ação da quitosana contra os fungos é favorecido pela interação hidrofóbica entre os derivados de quitosana e os lipídeos de membrana e podem envolver tanto à adsorção na parede celular, bem como a desestruturação da membrana celular do fungo.

Palavras-chave: quitosana, derivados anfifílicos, atividade antifúngica, *Aspergillus flavus*, modelo de membranas, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol.

ABSTRACT

In this work is described the synthesis, characterization and study of antimicrobial properties of amphiphilic derivatives of chitosan against *Aspergillus flavus*. Deacetylated chitosan was obtained from the heterogeneous deacetylation of the commercial chitosan. The degree of deacetylation was determined by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance and the result was 97.3%. Molecular weights of commercial and deacetylated chitosans were determined by gel permeation chromatography and the obtained values were 338.46 kDa and 137.12 kDa, respectively. The hydrophobic derivatives were synthesized by a reductive amination reaction with dodecylaldehyde followed by reduction with sodium cyanoborohydride. Next increasing proportions of the quaternary group pentyltrimethylammonium was inserted on hydrophobic derivative. The degrees of substitution by dodecyl (4.0%) and pentyltrimethylammonium groups (4.8, 12.7 and 46.3%) were determined by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance. All synthesized derivatives were tested *in vitro* against *Aspergillus flavus* at increasing concentrations. The results showed that the modified derivatives with pentyltrimethylammonium and dodecyl groups are more effective in inhibiting the growth of the fungus *Aspergillus flavus* when compared to deacetylated chitosan and the presence of hydrophobic groups in the polymer chain provides a stronger interaction with the cell membrane. The results of studies with model membranes agreed with the results of microbiological tests, showing that the presence of hydrophobic groups in chitosan backbone increases the interaction with lipid vesicles resulting in an increase in vesicles diameter and zeta potential. At first, it can be postulated that the mechanism of chitosan action against fungi is favored by hydrophobic interactions between chitosan derivatives and membrane lipids and may involve the adsorption on the cell wall and cell membrane disruption.

Keywords: chitosan, amphiphilic derivatives, antifungal activity, *Aspergillus flavus*, model membranes, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. (Modificado de MICOTOXINAS, 2009). 19
- Figura 2** – Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana (Modificado de GOY, BRITTO & ASSIS, 2009). 20
- Figura 3** – Tipos de agregados de lipídeos anfifílicos formados em meio aquoso. (Modificado de NELSON & COX, 2004). 23
- Figura 4** – Estrutura da fosfatidilcolina (PC). R' e R'' são resíduos de ácidos graxos, de modo que, geralmente, R' é saturado e R'', insaturado. 26
- Figura 5** – Estrutura do lipídeo fosfatidilglicerol (PG). R₁, R₂, R₃ e R₄ são resíduos de ácidos graxos. 26
- Figura 6** – Micrografias de *S. aureus* (A e B) e *E. coli* (C e D) obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Modificada de LEE & JE, 2013). 28
- Figura 7** – Representação esquemática da síntese de derivados quaternários de quitosana (Modificado de DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013). 31
- Figura 8** – Índices de inibição percentuais das quitosanas comercial, desacetilada e seus derivados contendo grupos pentiltrimetilamônio e dodecila sobre o fungo *Aspergillus flavus* (Figura extraída de TAKAKI *et al.*, 2014). 32
- Figura 9** – Estrutura química da quitosana desacetilada marcada com rodamina (isotiocianato de rodamina B). 40
- Figura 10** – Esquema de síntese dos derivados de quitosana contendo grupos dodecila e pentiltrimetilamônio. 45
- Figura 11** – Espectro de RMN de ¹H para a quitosana desacetilada. 47
- Figura 12** – Espectro de RMN de ¹H para o derivado de quitosana contendo grupos dodecila (QD4DD). 48
- Figura 13** – Espectro de RMN de ¹H para o derivado de quitosana contendo 4,0% de grupos dodecila e 12,7% de grupos pentiltrimetilamônio (QD4DD13PE). 49

Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H para os derivados de quitosana contendo 4% de grupos dodecila e 4,8 e 46,3% de grupos pentiltrimetilamônio (QD4DD5PE e QD4DD46PE, respectivamente).	51
Figura 15 – a) Ensaio típico dos experimentos de inibição de <i>A. flavus</i> na presença dos derivados de quitosana na concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$, 7º dia de experimento. b) Índices de inibição do crescimento de <i>A. flavus</i> em concentrações crescentes dos derivados.....	53
Figura 16 – Imagens microscópicas de lâminas contendo o fungo e quitosanas marcadas com rodamina: (a) <i>A. flavus</i> na ausência de quitosana (controle); (b) <i>A. flavus</i> na presença de QD4DD $0,1 \text{ g L}^{-1}$; (c) <i>A. flavus</i> na presença de QD4DD $1,0 \text{ g L}^{-1}$	56
Figura 17 – Microscopia confocal a laser do fungo <i>A. flavus</i> incubado na presença do derivado QD4DD, concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$	57
Figura 18 – Efeito da adição dos derivados anfifílicos de quitosana QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE no diâmetro médio das vesículas de PC em diferentes concentrações (pH 5,5).....	59
Figura 19 – Efeito da adição de diferentes concentrações dos derivados anfifílicos de quitosana no diâmetro médio de vesículas com carga superficial negativa PC:PG (pH 5,5).....	61
Figura 20 – Efeito da adição dos derivados anfifílicos de quitosana no potencial zeta das vesículas de PC (pH 5,5).....	63
Figura 21 – Efeito da adição de derivados anfifílicos de quitosana no potencial zeta das vesículas aniônicas de PC:PG (pH 5,5).....	64
Figura 22 – Porcentagem de vazamento de fluoresceína induzida pelo polímero QD4DD13PE (pH 7,5).	65
Figura 23 – Porcentagem de vazamento de fluoresceína induzida pelo polímero QD4DD46PE (pH 7,5).	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos lipossomos de acordo com suas propriedades estruturais e métodos de preparação (Modificado de CROMMELIN & SCHREIER,1994).....	25
Tabela 2 – Reagentes utilizados.....	35
Tabela 3 – Caracterização das quitosanas modificadas.....	52
Tabela 4 – Índices de inibição em porcentagem com seus respectivos desvios padrão para as quitosanas comercial, desacetilada e os derivados sintetizados.	52
Tabela 5 – Medidas do diâmetro médio das vesículas de PC na presença dos derivados de quitosana (QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE) em concentrações de 0,1 a 1,0 g L ⁻¹ (pH 5,5).....	59
Tabela 6 – Medidas do diâmetro médio das vesículas de PC:PG (80:20) na presença dos derivados de quitosana sintetizados em concentrações de 0,1 a 1,0 g L ⁻¹ (pH 5,5).	60
Tabela 7 – Medidas de potencial zeta das vesículas de PC na presença dos derivados de quitosana (pH 5,5).....	63
Tabela 8 – Medidas de potencial zeta das vesículas de PC:PG após a adição dos derivados de quitosana sintetizados (pH 5,5).....	64

LISTA DE ABREVIações

BDA	Meio de Cultura Batata Dextrose Ágar
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
GA	Ácido gálico
GA-quitosana	Derivado de quitosana contendo 118,92 miligramas de ácido gálico por grama de composto
GD	Grau de desacetilação
GS_{DD}	Grau de substituição com grupos dodecila
GS_{PE}	Grau de substituição com grupos pentiltrimetilamônio
I_{Met-D}	Área integrada do sinal correspondente aos hidrogênios dos grupos dodecila
I_{Met-P}	Área integrada do sinal correspondente aos hidrogênios dos grupos trimetilamônio
I_{Met-A}	Área integrada do sinal correspondente aos hidrogênios dos grupos acetamida
I_{H1}	Área integrada do sinal correspondente aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos
kDa	Kilodaltons
MIC	Concentração Mínima Inibitória
M_v	Massa molecular viscosimétrica
PC	Fosfatidilcolina
QC	Quitosana comercial
QD	Quitosana desacetilada
QD4DD	Quitosana desacetilada substituída com 4% de grupos dodecila

- QD4DD13PE** Quitosana desacetilada substituída com 4% de grupos dodecila e 12,7% de grupos pentiltrimetilamônio
- QD4DD46PE** Quitosana desacetilada substituída com 4% de grupos dodecila e 46,3% de grupos pentiltrimetilamônio
- QD4DD5PE** Quitosana desacetilada substituída com 4% de grupos dodecila e 4,8% de grupos pentiltrimetilamônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 QUITOSANA.....	20
1.2 VESÍCULAS ZWITERIÔNICAS E ANIÔNICAS	22
1.3 ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE QUITOSANA	27
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVOS GERAIS	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 METODOLOGIA	35
3.1 REAGENTES.....	35
3.2 <i>Aspergillus flavus</i>	36
3.3 REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA	36
3.3.1 Determinação do grau de desacetilação (GD) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H)	36
3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA.....	37
3.4.1 Alquilação da quitosana desacetilada	37
3.4.2 Reação com brometo de 5-bromopentiltrimetilamônio	37
3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)	38
3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	38
3.6.1 Preparo da suspensão de conídios	38
3.6.2 Preparo das soluções de quitosana e da solução controle	39
3.6.3 Preparo das soluções polímero-BDA	39
3.6.4 Controle do crescimento	39
3.7 ANÁLISES MICROSCÓPICAS	40

3.7.1	Marcação dos derivados de quitosana com rodamina	40
3.7.2	Microscopia confocal a laser	41
3.8	ESTUDO COM MODELOS DE MEMBRANAS	41
3.8.1	Preparação das vesículas de PC	41
3.8.2	Medidas de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta	42
3.8.3	Experimento de vazamento de vesículas por fluorimetria	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1	PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DE QUITOSANA	44
4.2	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)	46
4.3	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ¹ H)	46
4.4	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ¹ H)	47
4.4.1	Derivados de quitosana contendo o grupo dodecila	47
4.4.2	Derivados anfifílicos quaternários de quitosana	48
4.5	ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	52
4.6	MICROSCOPIA CONFOCAL À LASER	55
4.7	ESTUDO COM MODELOS DE MEMBRANAS	58
4.7.1	Determinação do diâmetro médio das vesículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	58
4.7.2	Medidas de potencial zeta	62
4.7.2	Experimento de vazamento de vesículas por fluorimetria	64
5	CONCLUSÃO	68
6	DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, muitos avanços foram alcançados na agricultura, principalmente no que se refere à eficiência na produção de alimentos e no controle de pragas. O uso extensivo de agroquímicos no controle de doenças de plantas tem provocado um desequilíbrio ecológico nos micro-organismos presentes no solo, ocasionando o desenvolvimento de cepas de patógenos resistentes, contaminação das águas subterrâneas e riscos à saúde humana e animal (MEENA & KANWAR, 2015). Visando minimizar os impactos causados no meio ambiente, um dos maiores desafios ecológicos enfrentados atualmente é o desenvolvimento de alternativas ambientalmente seguras para substituir os pesticidas químicos atualmente utilizados no combate de uma variedade de doenças das culturas (ONGENA & JACQUES, 2008).

Dentre as novas alternativas conhecidas, a quitosana tem as melhores perspectivas quanto à sua utilização como agente de controle biológico (BADAWY, RABEA & TAKTAK, 2014). Estudos demonstraram a atividade antimicrobiana da quitosana contra vários tipos de fungos, dentre eles, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* (COTA-ARRIOLA *et al.*, 2011; KUMAR, 2000). Alguns estudos sugerem que a quitosana atue de diferentes formas contra os micro-organismos, dependendo das características físico-químicas do polissacarídeo e das características da membrana do micro-organismo em questão (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA; 2006).

Alguns fungos são considerados um grande problema na produção e armazenamento de grãos e embora muitos avanços tenham sido alcançados na agricultura, sobretudo em relação à eficiência na produção de alimentos e no controle de pragas, estes ainda preocupam as agências de saúde. Além de promoverem a degradação e contaminação dos alimentos, com alterações na cor e textura, aumento de ácidos graxos livres, redução dos valores nutricionais e da capacidade de germinação, algumas espécies de fungos produzem toxinas geralmente muito prejudiciais à saúde humana e de animais (LEWIS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011; DHINGRA *et al.*, 2001; MAIA, SABBAG & SAKATA, 2011).

Um tipo em particular dessas toxinas são as aflatoxinas, compostos altamente termoestáveis na natureza, que não são degradadas mesmo com o cozimento do alimento contaminado (RUBERT, SOLER & MANES, 2012). As aflatoxinas pertencem ao grupo de policetídeos derivados das furanocumarinas e são produzidas principalmente por cepas toxigênicas de certas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, como, por exemplo, *Aspergillus flavus* (PRAKASH *et al.*, 2011; SHUKLA *et al.*, 2009).

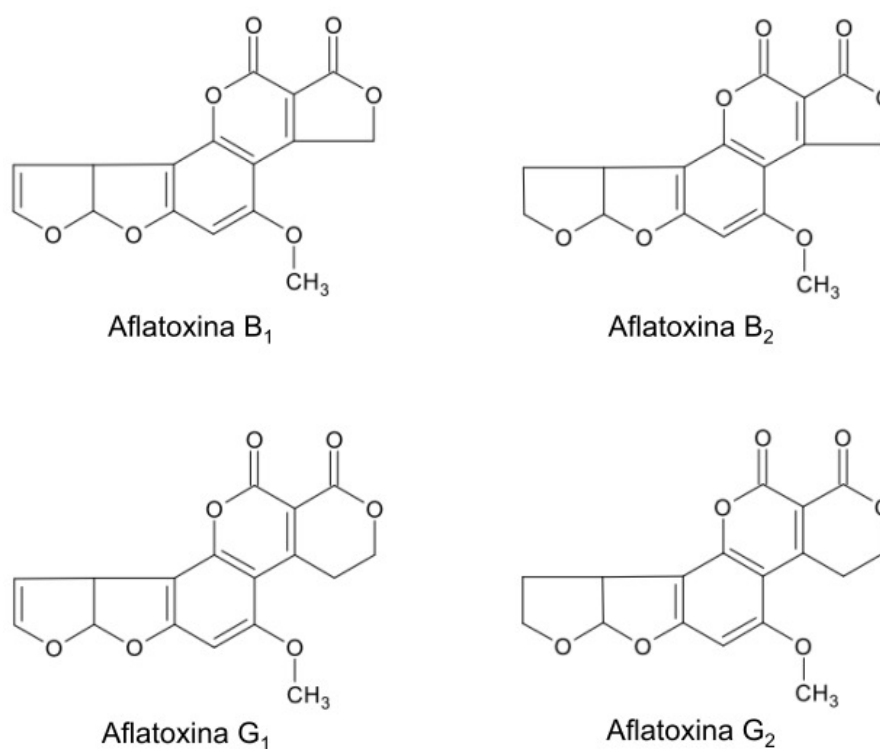
O gênero *Aspergillus* compreende cerca de 250 espécies de fungos, comumente reconhecidas por apresentarem características morfológicas similares (DYER & O'GORMAN, 2012). O *Aspergillus flavus* é um fungo assexuado e filamentosos, que se desenvolve em vários *habitats*, além de poder estar presente em amendoim, milho, trigo, algodão, castanha, leite, ovos, queijo, figos e outros alimentos (KIRK *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2011; PATERSON & LIMA, 2010). A contaminação dos alimentos por esse organismo pode ocorrer no campo, tanto nos períodos de pré e pós-colheita, como no transporte, processamento e armazenamento do produto (KAWASHIMA, 2004). A espécie *A. flavus* é o fungo mais comumente associado à contaminação dos alimentos devido à produção de conídios, estruturas de reprodução assexuada, que permitem a sobrevivência do fungo mesmo em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento (CHANG e ENRLICH, 2010).

As aflatoxinas são produzidas quando as condições ambientais são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento do fungo. Segundo Ehrlich *et al.* (2005), as aflatoxinas não são metabólitos essenciais para o crescimento dos fungos, entretanto elas provavelmente são produzidas para remover o excesso de carbono presente no meio onde este está se desenvolvendo (BU'LOCK, 1965), agir como sinal químico entre espécies (LILLEHOJ, 1991) e proteger o mesmo contra a microbiota do solo (EHRlich, YU & COTTY, 2005). Dessa forma, o desenvolvimento do fungo não implica na produção de aflatoxinas, assim como a ausência de sinais de contaminação pelo micro-organismo não garante a ausência de aflatoxinas no produto, já que essas substâncias podem permanecer no substrato mesmo que os fungos responsáveis por sua produção não estejam mais presentes (KAWASHIMA, 2004).

Nos produtos agrícolas, existem aproximadamente 100 espécies de fungos encontrados no próprio campo de produção ou em produtos alimentares armazenados que são capazes de produzir micotoxinas, dentre as quais, 20 destas espécies causam efeitos deletérios em animais (MICOTOXINAS, 2009).

Vários tipos de aflatoxinas são produzidos pelos fungos *Aspergillus*, destacando-se os tipos B₁, B₂, G₁ e G₂ (figura 1). Estas substâncias estão entre os mais cancerígenos compostos conhecidos, apresentam caráter teratogênico, hepatotóxico, mutagênico e imunossupressor, além de provocarem intoxicação aguda e até a morte do indivíduo, dependendo da quantidade ingerida. (GONÇALEZ, FELICIO & PINTO, 2001; TIAN *et al.*, 2012; REDDY *et al.*, 2011).

Figura 1 – Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. (Modificado de MICOTOXINAS, 2009).



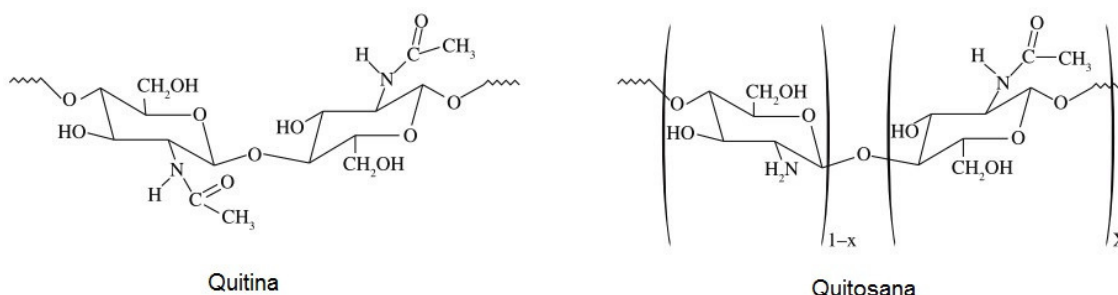
Diante desta realidade, muito se tem feito para encontrar compostos de origem natural capazes de controlar o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas. Extratos de algumas plantas, óleos essenciais e alguns produtos naturais como a quitina e quitosana são exemplos de compostos que, por apresentarem baixa toxicidade, biodegradabilidade, serem renováveis e facilmente

obtidos da natureza, estão sendo amplamente estudados na tentativa de se diminuir a contaminação dos alimentos e dos compartimentos ambientais por agroquímicos (GONÇALEZ, FELICIO & PINTO, 2001; KENAWY *et al.*, 2005).

1.1 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo que ocorre naturalmente em alguns fungos dos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*, podendo também ser obtida quimicamente por meio da reação de desacetilação da quitina (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, 2006; LARANJEIRA & DE FÁVERE, 2009). A quitina, polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, pode ser extraída de várias fontes, como, por exemplo, exoesqueleto de artrópodes, de crustáceos, insetos, moluscos e anelídeos, celenterados, fungos e leveduras (DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013; SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, 2006). Os copolímeros quitina e quitosana são constituídos por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) em porções variáveis, de modo que a quitina é composta predominantemente pela primeira destas unidades e a quitosana pela segunda (Figura 2) (CAMPANA-FILHO & SIGNINI, 2001).

Figura 2 – Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana (Modificado de GOY, BRITTO & ASSIS, 2009).



O parâmetro para diferenciar a quitina da quitosana é o grau médio de desacetilação (GD), que relaciona a quantidade de monômeros contendo grupos amina livres com a quantidade total de monômeros na cadeia polimérica (DAMIAN *et al.*, 2005). Assim, quando o grau médio de desacetilação do composto atinge 50%

ou mais, o biopolímero passa a ser denominado quitosana (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007). O processo de desacetilação, uma reação de hidrólise de amida, pode ser realizado tanto em condições ácidas, quanto em condições básicas. Apesar desta última apresentar maior eficiências, ambas condições podem causar a degradação da cadeia polimérica (CAMPANA-FILHO & SIGNINI, 2001).

Outra diferença importante entre quitina e quitosana é solubilidade. Enquanto a quitina é insolúvel em soluções ácidas diluídas, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico na presença destas soluções, sendo solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico diluído (SANTOS *et al.*, 2003). A propriedade de solubilização da quitosana, apesar de dependente da força iônica do meio, da massa molecular e concentração do biopolímero, está diretamente relacionada com o número de grupos amina presentes em sua estrutura, que após serem protonados ($-NH_3^+$), provocam uma maior repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SANTOS *et al.*, 2003).

Algumas propriedades da quitosana, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, bioadesividade e baixa toxicidade tem contribuído para o aumento do interesse da comunidade científica para sua utilização como biomaterial (MOURA, 2012). Além disso, a presença de grupos amina e hidroxila possibilitam que a quitosana comporte-se como um nucleófilo, facilitando a ocorrência de diversas modificações químicas em sua estrutura, dentre as quais pode-se citar a acetilação, quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, sulfonação, amidação e a formação de complexos polieletrólíticos e de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (KUMAR *et al.*, 2004; LARANJEIRA & DE FÁVERE, 2009; SANTOS *et al.*, 2003).

Neste sentido, a síntese de derivados de quitosana por meio da inserção de diferentes grupos funcionais à cadeia polimérica confere diferentes propriedades a esse polímero, permitindo sua aplicação em uma variedade de campos, tais como medicina, biotecnologia, produtos têxteis, tratamento de efluentes, cosméticos e agricultura (XU *et al.*, 2010), transportadores de fármacos (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA & AMINABHAVI, 2004), em pré-concentração de íons metálicos (QIN *et al.*, 2003), para a imobilização de enzimas (KILINC *et al.*, 2006), como

agentes bactericidas (SEO *et al.*, 2008) e fungicidas (RABEA *et al.*, 2006), na agricultura para o controle de pragas (DUKE *et al.*, 2003), na estocagem de frutas (GONZALEZ-AGUILAR *et al.*, 2009) e outros alimentos (RAO, CHANDER & SHARMA, 2008).

A capacidade de inibir o desenvolvimento de fungos está entre as propriedades mais importantes da quitosana. A ação da quitosana é assumida como fungistática, uma vez que esta suprime o desenvolvimento de tubos de alongação germinativo, o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de esporos dos fungos patogênicos (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009; VELÁZQUEZ-DEL VALLE *et al.*, 2012).

De acordo com o trabalho de Jolles & Muzzarelli, o crescimento de *Aspergillus flavus* em milho e em amendoim foi completamente inibido por quitosana, assim como o crescimento de *Botrytis spp.* em berinjelas. Quando revestidas com filmes de quitosana, frutas e vegetais apresentam um aumento na qualidade e podem ser armazenadas por tempos mais longos, devido à inibição do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (JOLLES & MUZZARELLI, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos por Maghsoudlou *et al.* (2012) ao avaliarem a atividade antifúngica da quitosana contra fungos do gênero *Aspergillus* em castanhas de pistache. Maghsoudlou e colaboradores observaram que a quitosana inibiu significativamente o crescimento de *Aspergillus*, sendo este efeito aumentado com o aumento da concentração de polímero (MAGHSOUDLOU *et al.*, 2012).

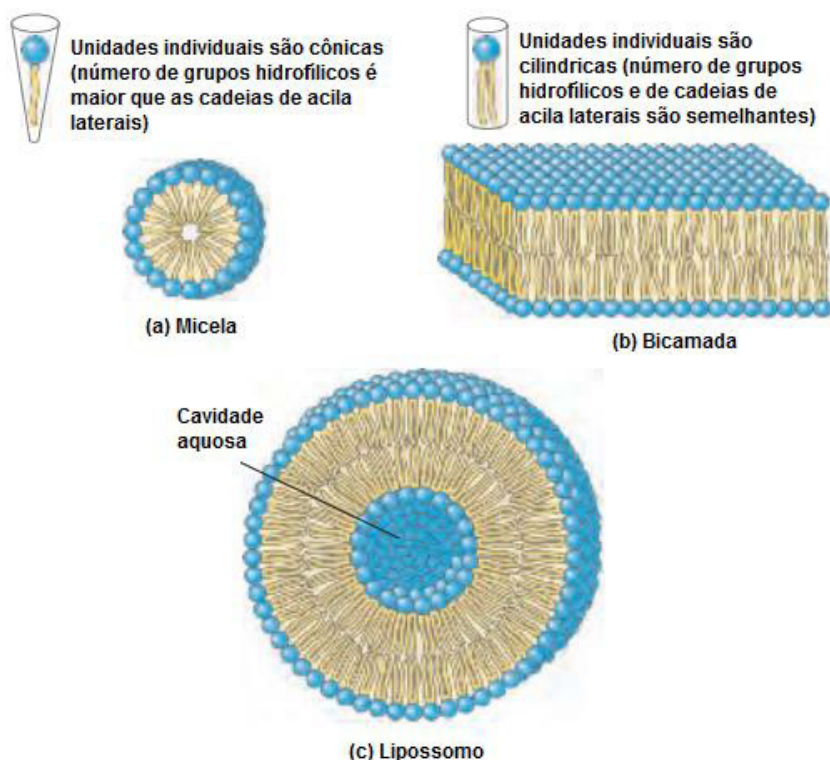
1.2 VESÍCULAS ZWITERIÔNICAS E ANIÔNICAS

As membranas celulares são estruturas flexíveis, altamente especializadas, que regulam várias funções celulares, principalmente a interação e transporte de substâncias (NELSON & COX, 2004). Uma vez que os sistemas biológicos, como as membranas celulares, apresentam grande complexidade, geralmente opta-se por estudar eventos independentes e controlados empregando sistemas simplificados que contenham características fundamentais e conhecidas. O modelo mais simples de uma membrana biológica é uma bicamada lipídica, formando uma vesícula lipídica (ARCHILHA, 2008).

As vesículas, também conhecidas como lipossomos (Figura 3c), são estruturas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolípídeos. Quando dispersos em água, devido a seu caráter anfifílico, estes lipídeos organizam-se espontaneamente de modo a não exporem seus grupos hidrofóbicos ao meio aquoso. Assim, as porções hidrofóbicas se conectam mutuamente no interior da estrutura (protegidas da água), enquanto que as porções hidrofílicas localizam-se externamente, interagindo com a água que a cerca (PENTAK *et al.*, 2008; ZANIN, 2001). Entretanto, alguns lipídios anfifílicos não formam lipossomos em meio aquoso, dando origem a outros agregados lipídicos, tais como micelas e bicamadas (ZANIN, 2001).

A formação de micelas (Figura 3a) é favorecida quando o número de grupos hidrofílicos é maior que a(s) cadeia(s) acila(s) lateral(is). Já as bicamadas (Figura 3b), que são originadas quando duas monocamadas lipídicas formam uma lâmina bidimensional, é favorecida quando o número de grupos hidrofílicos e as cadeias de acila laterais são semelhantes (NELSON & COX, 2004).

Figura 3 – Tipos de agregados de lipídeos anfifílicos formados em meio aquoso. (Modificado de NELSON & COX, 2004).



As vesículas são utilizadas principalmente como carreadores de drogas e modelos de biomembranas, uma vez que, além de serem auto-organizadas, apresentam vantagens como a facilidade e conveniência de preparação, biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (CHUNG & CHUNG, 2002).

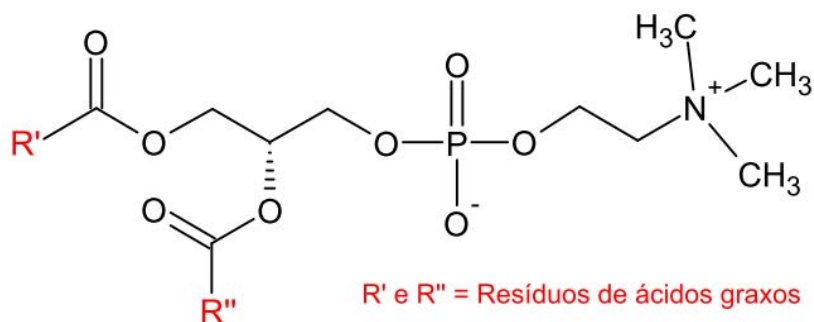
Estas estruturas podem variar quanto aos métodos de preparação utilizados e quanto ao tamanho, número e posição das lamelas, de modo que o número de lamelas define o tamanho das vesículas. De acordo com Crommelin & Schreier (1994), as classificações mais comuns para as vesículas são as baseadas em suas propriedades estruturais e na forma que são preparadas (tabela 1). Dependendo do tipo de lipídeo e das técnicas e condições de preparação, os lipossomos podem ter grande variação no tamanho, número e posição das lamelas, carga e rigidez da bicamada (estado líquido cristalino *versus* estado gel) (CROMMELIN & SCHREIER, 1994).

Tabela 1 – Classificação dos lipossomos de acordo com suas propriedades estruturais e métodos de preparação (Modificado de CROMMELIN & SCHREIER, 1994).

Abreviação	Descrição
DE ACORDO COM OS PARÂMETROS ESTRUTURAIS	
MLV	Vesículas grandes multilamelares (> 0,5 µm)
OLV	Vesículas oligolamelares (0,1 – 1 µm)
UV	Vesículas unilamelares (Todas as faixas de tamanho)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (10 – 100 nm)
MUV	Vesículas unilamelares médias
LUV	Vesículas unilamelares grandes (> 100 nm)
GUV	Vesículas unilamelares gigantes (> 1 µm)
MVV	Vesículas multivesiculares (> 1µm)
DE ACORDO COM O MÉTODO DE PREPARAÇÃO	
REV	Vesículas simples ou oligolamelares obtidas por método de evaporação em fase reversa
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtidas por método de fase reversa
SPLV	Vesículas plurilamelares estáveis
FATMLV	MLV obtida pelo método de congelamento-descongelamento
VET	Vesículas obtidas pelo método de extrusão
DRV	Vesículas obtidas pelo método de desidratação-reidratação

Nos últimos anos, a fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidilglicerol (PG) tem sido fosfolipídeos amplamente utilizados em estudos envolvendo vesículas. A fosfatidilcolina (figura 4), um fosfolipídeo zwitteriônico que possui o grupo colina como grupo polar, é considerado o principal componente de membrana de células eucarióticas (cerca de 50%), cuja função principal é fornecer um quadro estrutural para a membrana e manter a barreira de permeabilidade. Além disso, é o precursor de vários outros lipídeos, como lisofosfatidilcolina bioativa, ácido fosfatídico, diacilglicerol, lisofosfatidilcolina e ácido araquidônico (KENT & CARMAN, 1999).

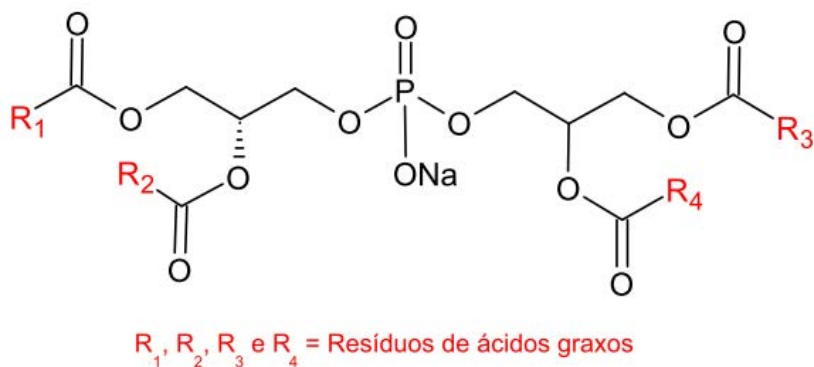
Figura 4 – Estrutura da fosfatidilcolina (PC). R' e R'' são resíduos de ácidos graxos, de modo que, geralmente, R' é saturado e R'', insaturado.



A fosfatidilcolina pode ser obtida de diversas fontes, como, por exemplo, fígado, gema do ovo, feijão de soja, amendoim, espinafre e trigo (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 1998). A fosfatidilcolina obtida a partir de gema de ovo (utilizada neste trabalho) tem sua porção hidrofóbica (ácidos graxos) constituída de, aproximadamente, 33% C16:0 (palmítico), 13% de C18:0 (esteárico), 31% de C18:1 (oleico), 15% de C18:2 (ácido linoleico) e outros ácidos graxos em menores proporções (SIGMA ALDRICH).

Já o fosfatidilglicerol (PG – figura 5), um lipídeo aniônico, é dos principais componentes de algumas membranas bacterianas, sendo também encontrado em membranas de plantas e animais. É utilizado como o precursor para o difosfatidilglicerol (cardiolipina), que está localizado na membrana mitocondrial interna e é necessária para o bom funcionamento das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa (THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY LIPID LIBRARY).

Figura 5 – Estrutura do lipídeo fosfatidilglicerol (PG). R₁, R₂, R₃ e R₄ são resíduos de ácidos graxos.



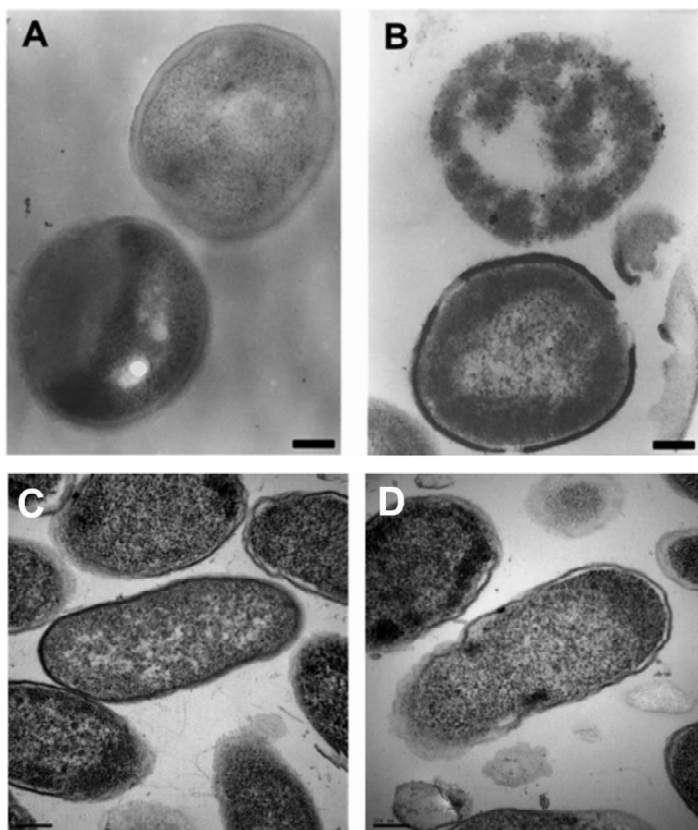
1.3 ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE QUITOSANA

A membrana citoplasmática das células é uma rede complexa de lipídeos e proteínas com uma organização molecular que contribui para manter tanto a integridade estrutural das células, quanto a atividade das proteínas que estão associadas à bicamada lipídica. A visão atual é que as moléculas de lipídeos presentes no interior da bicamada são dinâmicas e estão ativamente envolvidas em múltiplas funções biológicas. Na busca por antimicrobianos eficientes, a membrana celular tem sido um alvo frequente no desenvolvimento de novas moléculas (PHOENIX, DENNISON & HARRIS, 2012). No caso de quitosana, sua afinidade com a membrana celular tem sido amplamente divulgada e aplicada contra uma variedade de micro-organismos como bactérias, vírus e fungos (KONG *et al.*, 2010).

Segundo estudos reportados na literatura, vários parâmetros tem sido indicados como importantes para explicar a atividade antimicrobiana da quitosana: (1) a interação eletrostática entre as cargas positivas da quitosana e de seus derivados quaternários com as cargas negativas da superfície das células bacterianas, o que pode ocasionar o vazamento de proteínáceos e de outros componentes intracelulares (YANG, CHOU & LI, 2005); (2) a ligação da quitosana com os lipídeos da membrana, predominantemente ácido lipoteicóico, que resulta em uma sequência de eventos, conduzindo à morte bacteriana (RAAFAT *et al.*, 2008); e (3) as significativas interações eletrostáticas e hidrofóbicas, além de ligações de hidrogênio entre lipídios e a quitosana podem provocar a remoção de lipídeos da membrana bacteriana (WYDRO, KRAJEWSKA & HĄC-WYDRO, 2007).

Em trabalho recente, Lee & Je (2013) avaliaram a eficiência de quitosanas modificadas com ácido gálico (GA) contra 10 diferentes tipos de bactérias, dentre elas *E. coli* e *S. aureus*. Os derivados apresentaram elevadas atividades antimicrobianas, dentre os quais o melhor deles (GA-quitosana I) demonstrou ser 4 vezes mais eficiente do que a quitosana não modificada. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação deste derivado, após serem tratadas durante 18 horas com o composto, as cepas bacterianas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (figura 6).

Figura 6 – Micrografias de *S. aureus* (A e B) e *E. coli* (C e D) obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Modificada de LEE & JE, 2013).



A: *S. aureus* controle. **B:** *S. aureus* tratada com 128 µg/mL de GA-quitosana I. **C:** *E. coli* controle. **D:** *E. coli* tratada com 1024 µg/mL de GA-quitosana I.

As imagens mostraram que as células não tratadas apresentaram superfície lisa e compacta, sem liberação de componentes intracelulares e rupturas ou poros notáveis na superfície celular (figuras 6A e 6C). Por outro lado, as células tratadas com o derivado GA-quitosana I, quando comparadas com o controle, apresentaram mudanças morfológicas evidentes. As células de *S. aureus* tratadas (figura 6B) aparentam ter sofrido danos na membrana celular, resultando na liberação de seus componentes celulares para o meio ambiente até finalmente ficarem vazias. Já no caso das células de *E. coli*, a membrana celular foi diminuída, sendo os componentes celulares também liberados no meio extracelular (LEE & JE, 2013).

Para avaliar a importância da presença de grupos catiônicos e hidrofóbicos na atividade antimicrobiana de derivados de quitosana, Sajomsang e

colaboradores (2009) estudaram derivados quaternizados com diferentes graus de substituição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa), avaliando a concentração inibitória mínima (MIC) de cada composto. Os resultados de MIC mostraram que o grau de substituição com grupos quaternários influenciava diretamente a atividade antibacteriana dos polímeros, de modo que os derivados com maiores graus de quaternização proporcionaram os menores valores de MIC e a presença de grupos hidrofóbicos, particularmente os grupos N-benzil com grau de substituição de 11%, exibiu excelente atividade antibacteriana contra os micro-organismos estudados (SAJOMSANG *et al.*, 2009).

Devido à sua estrutura catiônica, vários mecanismos postulados para a atividade antimicrobiana da quitosana apresentam similaridades com aqueles exibidos por peptídeos antimicrobianos, cuja interação com a membrana celular pode levar diretamente à inativação dos microrganismos via lise celular ou indiretamente por meio da internalização destes peptídeos, facilitando o ataque de alvos intracelulares (ZASLOFF, 2002, PARK *et al.*, 1995; POWERS & HANCOCK, 2003; YEAMAN & YOUNT, 2003).

Liu e colaboradores (2004) relataram que a atividade bactericida da quitosana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* se deve a um aumento na permeabilidade da membrana exterior e interior e, finalmente, no rompimento das membranas celulares das bactérias, acarretando a liberação dos constituintes celulares. A interação e consequente dano à parede celular é creditado principalmente às interações eletrostáticas dos grupos NH_3^+ com os grupos fosforil dos fosfolípidos componentes das membranas celulares (LIU *et al.*, 2004).

A importância das cargas positivas na estrutura do polímero foi confirmada em trabalhos comparativos entre a atividade antifúngica de carboximetilquitosana e derivados de carboximetilquitosana modificados com grupos quaternários de amônio contra os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Geotricum candidum* e *Candida albicans* (MOHAMED *et al.*, 2013). Segundo os resultados obtidos, todos os derivados modificados com grupos quaternários se mostraram mais eficientes em inibir o desenvolvimento dos fungos do que a quitosana carboximetilada de origem (MOHAMED *et al.*, 2013). Foi observado em outros trabalhos que a atividade antifúngica também depende da massa molecular da quitosana (LI *et al.*, 2011) e da

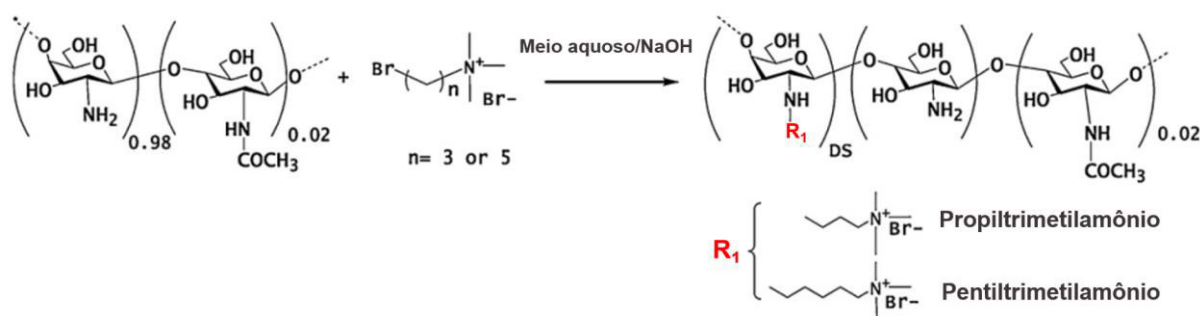
hidrofobicidade dos derivados (RABEA *et al.*, 2006; SAJOMSANG *et al.*, 2009). O mecanismo exato ainda não é claro, mas a atividade é parcialmente creditada à atração eletrostática entre os polímeros e as paredes celulares carregadas negativamente (KONG *et al.*, 2010).

No entanto, tem sido demonstrado que, a presença de cargas positivas é importante, mas não é suficiente para proporcionar uma atividade eficaz, e que, dependendo do tipo de agente patogênico, a massa molecular dos derivados de quitosana tem papel fundamental, de modo que oligômeros de quitosana podem exibir atividades antimicrobianas inferiores (ZHENG & ZHU, 2003) ou superiores (RÚNARSSON *et al.*, 2010; AMAIKE & KELLER, 2011) quando comparadas à quitosanas de alta massa molecular. Em relação à hidrofobicidade dos derivados, os resultados recentes indicam que os grupos hidrofóbicos ligados à cadeia de quitosana podem aumentar a atividade antimicrobiana (RABEA *et al.*, 2005), mas, para derivados com altos graus de substituição, a atividade pode diminuir novamente (SAJOMSANG *et al.*, 2009).

O mecanismo mais aceito para explicar a ação biofúngida da quitosana se baseia na proposta de desestruturação da parede celular, a qual é causada pelas interações eletrostáticas entre o polímero, positivamente carregado, e macromoléculas com resíduos de carga negativa como lipossacarídeos e proteínas (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009; MARTINEZ-CAMACHO *et al.*, 2010).

No caso de derivados catiônicos de quitosana, acredita-se que quanto maior o número de cargas positivas presentes no polímero, maior será a sua atividade fúngida (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009). Desse modo, quitosanas modificadas com grupos quaternários de amônio foram sintetizadas por De Oliveira Pedro e colaboradores (2013), como mostra o esquema de síntese na figura 7 (DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013).

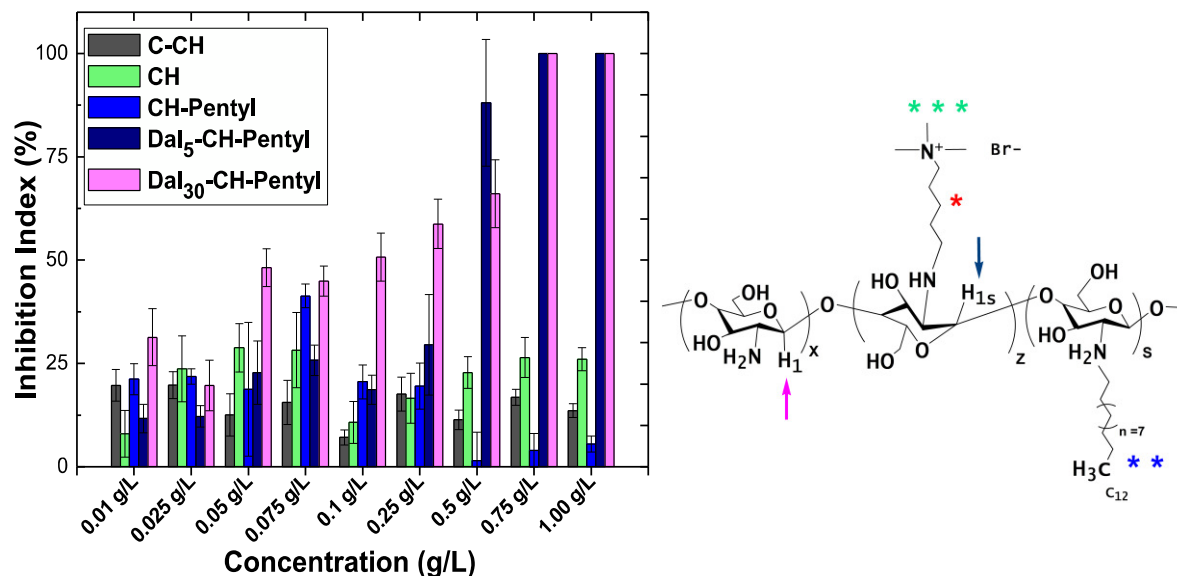
Figura 7 – Representação esquemática da síntese de derivados quaternários de quitosana (Modificado de DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013).



Esses derivados quaternizados permitiram aumentar em até seis vezes atividade antimicrobiana de quitosana, o que confere aos derivados deste tipo, potencial para substituição de fungicidas químicos convencionais. Além disso, os derivados substituídos com grupos quaternários de amônio são solúveis em água numa ampla faixa de pH. Ao contrário da quitosana, que é solúvel somente em soluções diluídas de ácidos orgânicos, os derivados obtidos foram solúveis em pH neutro, o que reduz a possibilidade de hidrólise da cadeia e facilita a sua aplicação na forma de solução aquosa (DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013). Os resultados de De Oliveira Pedro *et al.* (2013) indicaram ainda que a maior atividade dos derivados contendo o grupo pentiltrimetilamônio poderia ser devida ao maior conteúdo hidrofóbico, e portanto, à interações mais fortes com a parede celular do fungo.

Tendo como objetivo avaliar o efeito da contribuição hidrofóbica no mecanismo de inibição, Viegas de Souza *et al.* (2013) sintetizaram derivados de propiltrimetilamônio-quitosana com proporções crescentes do grupo dodecila. Os resultados dos índices de inibição atingiram 100% de inibição para o derivado contendo 83% de grupos propiltrimetilamônio e 29% de grupos dodecila na concentração de 0,5 g L⁻¹ e 100% na concentração de 1,0 g L⁻¹ para todos os demais polímeros modificados (VIEGAS DE SOUZA *et al.*, 2013). Resultados similares foram obtidos com os derivados anfifílicos tendo em sua estrutura 74% do grupo pentiltrimetilamônio e com proporções crescentes de grupos dodecila (5 e 25%) (Figura 8). Os índices de inibição atingiram 100% para o derivado Dal5-CH-Pentil nas concentrações acima de 0,75 g L⁻¹ (TAKAKI *et al.*, 2014).

Figura 8 – Índices de inibição percentuais das quitosanas comercial, desacetilada e seus derivados contendo grupos pentiltrimetilamônio e dodecila sobre o fungo *Aspergillus flavus* (Figura extraída de TAKAKI *et al.*, 2014).



** C-CH: quitosana comercial; CH: quitosana desacetilada; CH-Pentyl: quitosana desacetilada contendo 74% de grupos pentiltrimetilamônio; Dal₅-CH-Pentyl: quitosana desacetilada contendo 74% de grupos pentiltrimetilamônio e 4,81% de grupos dodecila; Dal₃₀-CH-Pentyl: quitosana desacetilada contendo 74% de grupos pentiltrimetilamônio e 24,1% de grupos dodecila.

Portanto, derivados quaternários de quitosana, posteriormente modificados com grupos dodecila exibiram índices de inibição crescentes com o conteúdo lipofílico e com a concentração de polímero (DE OLIVEIRA PEDRO *et al.*, 2013, VIEGAS DE SOUZA *et al.*, 2013, TAKAKI *et al.*, 2014). Na concentração de 0,5 g L⁻¹, todos os derivados anfífilos com graus de substituição de 7,0 a 29% de grupos dodecila, inibiram completamente o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Os valores de concentração mínima inibitória foram até 16 vezes inferiores aos da quitosana não modificada, indicando a importância também do conteúdo hidrofóbico na atividade antimicrobiana (VIEGAS DE SOUZA *et al.*, 2013).

Para avaliar a importância das interações hidrofóbicas e eletrostáticas na atividade buscamos sintetizar derivados de quitosana com proporção constante de conteúdo hidrofóbico (4%) e variando-se o conteúdo de cargas positivas permanentes na cadeia do polímero. Além da síntese, o estudo foi direcionado à

elucidação do mecanismo de ação utilizando membranas modelo de L- α -fosfatidilcolina (PC) e L- α -fosfatidilcolina/L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PC:PG) na proporção 80:20 (%).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto teve como objetivo a síntese e caracterização de derivados quaternários anfifílicos de quitosana e o estudo do mecanismo de ação utilizando duas metodologias principais:

- i) Estudo da interação dos derivados com membranas modelo com composição fosfolipídica conhecida;
- ii) Marcação fluorescente dos derivados e estudo de sua interação com o fungo *Aspergillus flavus* via microscopia óptica, confocal e de transmissão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Sintetizar e caracterizar derivados de quitosana com proporção constante do conteúdo hidrofóbico e conteúdo crescente de cargas positivas permanentes na cadeia do polímero.

II. Estudar a atividade antifúngica dos derivados contra o fungo *Aspergillus flavus*.

III. Estudar o efeito da composição e concentração dos anfifílicos na interação com modelos de membrana com diferentes cargas superficiais.

IV. Analisar o efeito biológico dos derivados de quitosana sobre os microorganismos por microscopia eletrônica de transmissão, microscopia óptica e/ou microscopia confocal.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Reagentes utilizados.

Reagentes	Procedência
Acetato de sódio	Synth
Ácido Acético	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Borocianohidreto de sódio	AldrichChemical Co
Brometo de 5-bromopentiltrimetilamônio	AldrichChemical Co
5-carboxifluoresceína	Sigma Aldrich
Cloreto de deutério	AldrichChemical Co
Cloreto de sódio	Dinamica
Clorofórmio	Sigma Aldrich
Dodecanal	Fluka
Etanol	Synth
Hidróxido de sódio	Synth
Isotiocianato de rodamina B	Sigma Aldrich
L- α -Fosfatidilcolina	Sigma Aldrich
L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol	Sigma Aldrich
Meio de cultura batata dextrose ágar	Himedia
Sal dissódico de ácido etilenodiaminotetraacético	Synth
Óxido de deutério	AldrichChemical Co
Propanona	Synth
Quitosana comercial	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda
Tris (hidroximetil) amino metano	Vetec
Triton X-100	Sigma Aldrich

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto quando indicado. Nos experimentos utilizou-se água deionizada em sistema purificador de água da Gehaka modelo DG e água Milli-Q[®].

3.2 *Aspergillus flavus*

As cepas de *Aspergillus flavus* CBMAI 0551 foram obtidas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/UNICAMP, em Campinas/SP.

3.3 REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA

A reação de desacetilação da quitosana foi realizada conforme os procedimentos descritos por De Oliveira Pedro *et al.* (2013) e Viegas de Souza *et al.* (2013). Assim, 8,0 g do polímero foram dispersos, sob agitação vigorosa, em 400,0 mL de água deionizada. Em seguida, adicionou-se 8,0 mL de ácido acético glacial e a solução foi mantida sob agitação magnética durante 12 horas para a completa solubilização do polímero. Posteriormente, a suspensão obtida foi aquecida até 100°C em manta de aquecimento. Ao atingir esta temperatura, adicionou-se lentamente à solução de quitosana 100,0 mL de solução de NaOH 23,5 mol L⁻¹. A suspensão foi mantida a 100 °C por 90 minutos em refluxo sob atmosfera de nitrogênio. Decorrido esse tempo, a solução obtida foi transferida para um béquer contendo 3,5 L de água deionizada a 60°C. A quitosana precipitada foi decantada, lavada com água deionizada até a obtenção de pH entre 6 e 8 e, posteriormente, isolada por filtração a vácuo. O procedimento foi realizado duas vezes para a obtenção de um maior grau de desacetilação e, após a última filtragem, o produto foi lavado com propanona e secado em estufa a 40°C.

3.3.1 Determinação do grau de desacetilação (GD) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H)

Aproximadamente 15,0 mg da amostra de quitosana previamente seca em estufa foi solubilizada em 1,0 mL de óxido de deutério contendo 10 µL de cloreto de deutério. A solução foi agitada até a completa solubilização do polímero. As análises de RMN de ¹H foram realizadas no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular do Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e

Ciências Exatas - IBILCE/UNESP, em um espectrômetro Bruker de 400 MHz, temperatura de 70 °C.

3.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA

3.4.1 Alquilação da quitosana desacetilada

A síntese de derivados de quitosana contendo 4% de grupo dodecila foi realizada baseada no procedimento descrito por Desbrières *et al.* (1996). Para isto, 10,0047 g de quitosana foram dissolvidos em 550 mL de uma solução de ácido acético 0,4 mol L⁻¹. Após a dissolução, para permitir a solubilização do dodecanal, adicionou-se, sob agitação vigorosa, 380 mL de etanol, obtendo-se uma solução homogênea e clara. Uma vez que o pH ótimo para reação varia entre 4 e 8, este foi, então, ajustado para 5,1 para evitar a precipitação dos derivados. Foram, então, adicionados 0,69 mL de dodecanal e após 1 hora, adicionou-se um excesso de borocianohidreto de sódio (três mols do reagente por monômero de quitosana). A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas e, posteriormente, purificada em diálise contra água deionizada utilizando-se uma membrana semipermeável de 3,5 kDa. O produto obtido foi recuperado por liofilização e caracterizado por RMN de ¹H.

3.4.2 Reação com brometo de 5-bromopentiltrimetilamônio

A reação para a inserção de grupos quaternários à cadeia da quitosana foi realizada com base nos procedimentos descritos por De Oliveira Pedro *et al.* (2013) e Viegas de Souza *et al.* (2013). Na síntese do derivado contendo 12,8% de grupos pentiltrimetilamônio, 2,4974 g de quitosana previamente modificada com grupos dodecila foram solubilizados em 150 mL de solução de ácido acético 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, o pH foi ajustado para 8 com uma solução de hidróxido de sódio concentrada. A solução de quitosana foi levada para banho de água a 55 °C e adicionou-se lentamente 2,8720 g de brometo de 5-bromopentiltrimetilamônio dissolvido em uma quantidade mínima de água deionizada. A solução permaneceu

em banho-maria a 55 °C por 3 dias e seu pH foi rigorosamente monitorado durante todo o procedimento para que fosse mantido próximo de 8. A solução obtida foi purificada por diálise utilizando-se uma membrana semipermeável de 3,5 kDa. Inicialmente foi dialisada contra solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ por 1 dia e, em seguida, contra água deionizada por 4 dias. O produto foi recuperado por liofilização e caracterizado por RMN de ¹H.

3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

A massa molecular das quitosanas comercial e desacetilada foi estimada no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20) com detecção por índice de refração modelo RID-10^a. Foi utilizado como eluente solução tamponante ácido acético/acetato de sódio (0,3 mol L⁻¹/0,2 mol L⁻¹), pH 4,5, temperatura de 35° C e tendo como padrões pululananas na faixa de 805 a 6,2 kDa.

3.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

3.6.1 Preparo da suspensão de conídios

Uma alçada de conídios da cepa original foi transferida para tubos de ensaios contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) solidificado e inclinado. Estes tubos foram incubados por 7 dias a 25 °C e após este período, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma quantidade de conídios foi transferida para um tubo de Eppendorf[®] contendo aproximadamente 1,5 mL de água deionizada. A suspensão foi agitada por 3 minutos em vórtex para a dispersão dos conídios. A concentração da suspensão de conídios foi determinada pela contagem direta em microscópio empregando-se câmara de Neubauer e o resultado foi de 1,0x10⁶ conídios/mL. Posteriormente, empregando-se uma pipeta automática esterelizada, 2,0 µL da suspensão de conídios foram transferidos para uma placa de petri de 9,0 cm de diâmetro contendo meio BDA solidificado. As placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C.

3.6.2 Preparo das soluções de quitosana e da solução controle

Para se preparar as soluções contendo quitosana, a massa de quitosana foi solubilizada em 50,0 mL de solução de ácido acético 1% (v/v) e mantida sob agitação até sua completa solubilização. Já para o controle, empregou-se 50,0 mL da solução de ácido acético 1% (v/v). Uma vez que o pH ótimo para o desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* é 5,5, é necessário que o pH das soluções controle e de quitosana seja corrigindo para 4,9 para que a mistura final BDA + solução de quitosana tenha o pH 5,5. Os experimentos *in vitro* foram realizados nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 g L⁻¹.

3.6.3 Preparo das soluções polímero-BDA

As soluções de BDA foram preparadas em erlenmeyer de 250 mL adicionando-se 3,9 g do meio em 50,0 mL de água deionizada. Esta solução foi aquecida em micro-ondas para total solubilização. Os erlenmeyers contendo as soluções de BDA foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos e, posteriormente, as soluções de quitosana e a solução controle previamente preparados de acordo com o item 3.6.2 foram incorporados ao BDA.

3.6.4 Controle do crescimento

A inibição do crescimento do fungo pela quitosana e seus derivados foi determinada na placa de petri de 9,0 cm de diâmetro contendo meio BDA. O crescimento radial da colônia foi medido com um paquímetro milimetrado no quinto e sétimo dias, sendo, no entanto, o resultado do sétimo dia utilizado para fins comparativos (fim do primeiro ciclo de crescimento do micro-organismo). Todas os experimentos foram realizados em quadruplicata. Para a análise da eficiência do derivado de quitosana, o índice de inibição foi calculado de acordo com o proposto por Guo *et al.* (2008):

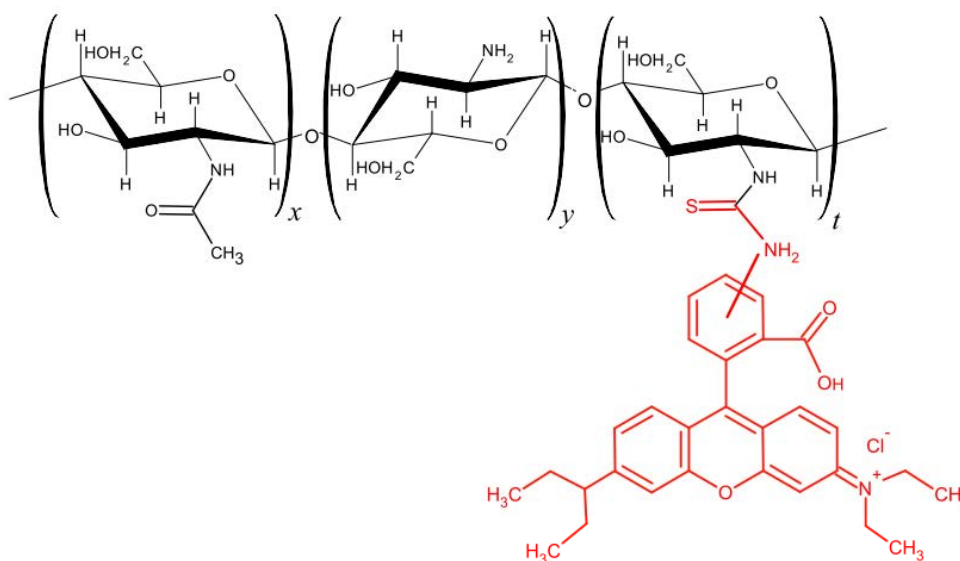
$$\text{Índice de inibição (\%)} = \left[1 - \left(\frac{D_a}{D_b} \right) \right] \times 100 \quad (1)$$

sendo D_a o diâmetro da colônia das placas contendo o derivado de quitosana e D_b , o diâmetro das placas controle.

3.7 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Com o objetivo de avaliar a nível microscópico o efeito que a quitosana provoca no fungo *Aspergillus flavus*, foram realizadas análises microscópicas de lâminas contendo amostras dos fungos incubados em presença de quitosana ligada a rodamina (Figura 9).

Figura 9 – Estrutura química da quitosana desacetilada marcada com rodamina (isotiocianato de rodamina B).



3.7.1 Marcação dos derivados de quitosana com rodamina

Os derivados de quitosana QD e QD4DD foram marcados com o marcador fluorescente rodamina segundo o procedimento descrito por Ma *et al.* (2008). Assim, 0,2 g de quitosana foram dissolvidos em 25 mL de água Milli-Q e 25 μ L de ácido acético. O pH foi ajustado para 6,2 com solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e

a amostra foi mantida sob agitação em atmosfera de N₂. Em seguida, 12 mg de rodamina previamente solubilizadas em 6 mL de metanol foram gotejados na solução de quitosana sob agitação. A reação foi mantida sob atmosfera de N₂ e agitação por 18 h à temperatura ambiente. A mistura reacional foi dialisada contra NaOH 0,05 mol L⁻¹ por 1 dia e contra água deionizada por 3 dias. O produto foi isolado por liofilização. Todo o procedimento será feito na ausência de luz.

3.7.2 Microscopia confocal a laser

As imagens foram obtidas no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LCE/DEMa – UFSCar) em um Microscópio Confocal a Laser de Medição em 3D, modelo LEXT - OLS4100 - Olympus. A intensidade do laser bem como o aumento utilizado variam de acordo com a amostra de modo a otimizar a captação da imagem desejada.

3.8 ESTUDO COM MODELOS DE MEMBRANAS

3.8.1 Preparação das vesículas de PC

As vesículas foram preparadas com base no procedimento descrito por Pinnaduwege & Bruce (1996). Para preparação de 4 mL de uma solução com concentração de 1 mmol L⁻¹ de vesículas, 0,0077 g do lipídeo foram transferidos para um tubo de fundo redondo, dispersos em 1 mL de clorofórmio e agitados até completa solubilização. O solvente foi, então, evaporado utilizando-se N₂ gasoso de modo a formar um filme fino no fundo do frasco. O tubo foi levado ao dessecador sob vácuo por 3 h para a completa evaporação do solvente e, posteriormente, adicionou-se 4 mL de solução tamponante ácido acético/acetato de sódio 20 mmol L⁻¹, contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 5,5. A solução foi agitada com o auxílio de um vortex e para homogeneizar o tamanho das vesículas, foi posteriormente extrusada em extrusor Avanti's Mini-Extruder for LUV Preparation utilizando-se membranas de 400 nm (6 extrusões lentas) e 100 nm (11 extrusões lentas).

3.8.2 Medidas de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

Os experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta foram realizados em um equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) no Laboratório de Estudo em Peptídeos do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE/UNESP. Os experimentos foram realizados a 25 °C em solução tamponante ácido acético/acetato de sódio 20 mmol L⁻¹, contendo 150 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 5,5 e a concentração dos polímeros foi variada de 0,1 a 1,0 g L⁻¹.

3.8.3 Experimento de vazamento de vesículas por fluorimetria

Os experimentos de vazamento de vesículas foram realizados utilizando-se o marcador fluorescente carboxifluoresceína e a técnica de espectroscopia de fluorescência. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no fluorímetro Hitachi F4500 (Spectronic Inc., Rochester, NY) no Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE/UNESP. A supressão da fluorescência da carboxifluoresceína e sua liberação foram usados como marcadores do processo de permeabilização de vesículas. Os espectros de emissão de fluorescência ao longo do tempo foram obtidos em 520 nm, com abertura de fenda de 2,5 nm, durante intervalos de 15 minutos. A amostra foi excitada em 490 nm, com abertura de fenda de 2,5 nm e tensão na fotomultiplicadora de 700 V. Em intervalos regulares, a porcentagem de carboxifluoresceína (CF) liberada é calculado como:

$$\% \text{ vazamento} = \left(\frac{F - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

de modo que F é a intensidade de fluorescência medida (em unidades arbitrárias), F_0 corresponde à intensidade de fluorescência das vesículas intactas e F_{100} é a intensidade de fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas provocada pela adição do detergente Triton X-100 a 1%.

3.8.3.1 Preparação das vesículas contendo carboxifluoresceína

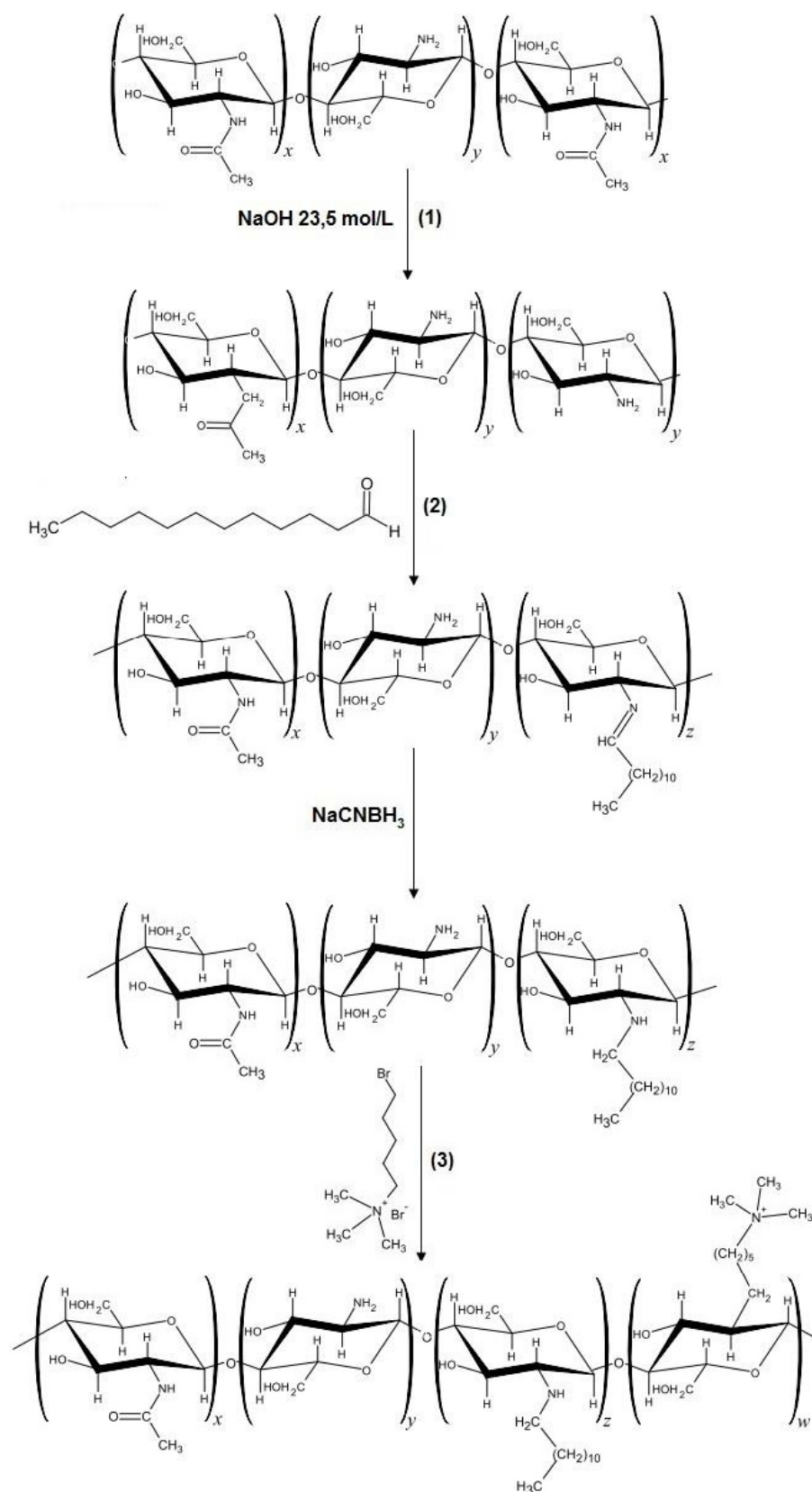
O filme de fosfolípidos foi preparado conforme descrito no item 3.7.1. A suspensão de vesículas foi obtida pela hidratação do filme com 2,0 mL de solução tamponante Tris/HCl 10 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA, pH 7,5 contendo 0,025 mol L⁻¹ do corante fluorescente carboxifluoresceína. A carboxifluoresceína foi utilizada em alta concentração, uma vez que nestas condições, ocorre a auto supressão do marcador. Em seguida, a suspensão foi igualmente agitada em vórtex por 2 min e 30 s e, então, submetida à extrusão (equipamento Avanti Mini-Extruder), utilizando membranas de 0,4 µm (6 extrusões lentas) e 0,1 µm (11 extrusões lentas). Após descanso de uma hora, foi realizada filtração em gel da suspensão em coluna Sephadex G 25 M, PD-10. Esta coluna foi previamente equilibrada com solução tamponante Tris/HCl 10 mmol L⁻¹, 0,15 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ Na₂EDTA, pH 7,5 e as vesículas foram eluídas com a mesma solução. A suspensão de aspecto levemente turbido e de cor alaranjado, sem brilho fluorescente, foi mantida sob refrigeração e usada dentro de um período de 72 horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DE QUITOSANA

A síntese dos derivados anfifílicos de quitosana foi realizada em três etapas, como é apresentado na figura 10. Na primeira etapa, realizou-se a desacetilação da quitosana com o intuito de aumentar satisfatoriamente o número de grupos amina livres na estrutura da quitosana comercial. Em seguida, foi realizada a alquilação da quitosana desacetilada pela inserção de uma porção fixa de grupos dodecila (4%) na cadeia polimérica com posterior redução da base de Schiff empregando-se borocianohidreto de sódio. Na terceira etapa, foram inseridas proporções crescentes do grupo quaternário pentiltrimetilamônio.

Figura 10 – Esquema de síntese dos derivados de quitosana contendo grupos dodecila e pentiltrimetilamônio.



4.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

Conforme descrito no item 3.5. da parte experimental, as quitosanas comercial e desacetilada tiveram sua massa molecular estimada por GPC, tendo como padrão pululanas de 805 a 6,2 kDa. Os valores de massa molecular obtidos foram 338,46 kDa para a quitosana comercial e 137,12 kDa para a quitosana desacetilada.

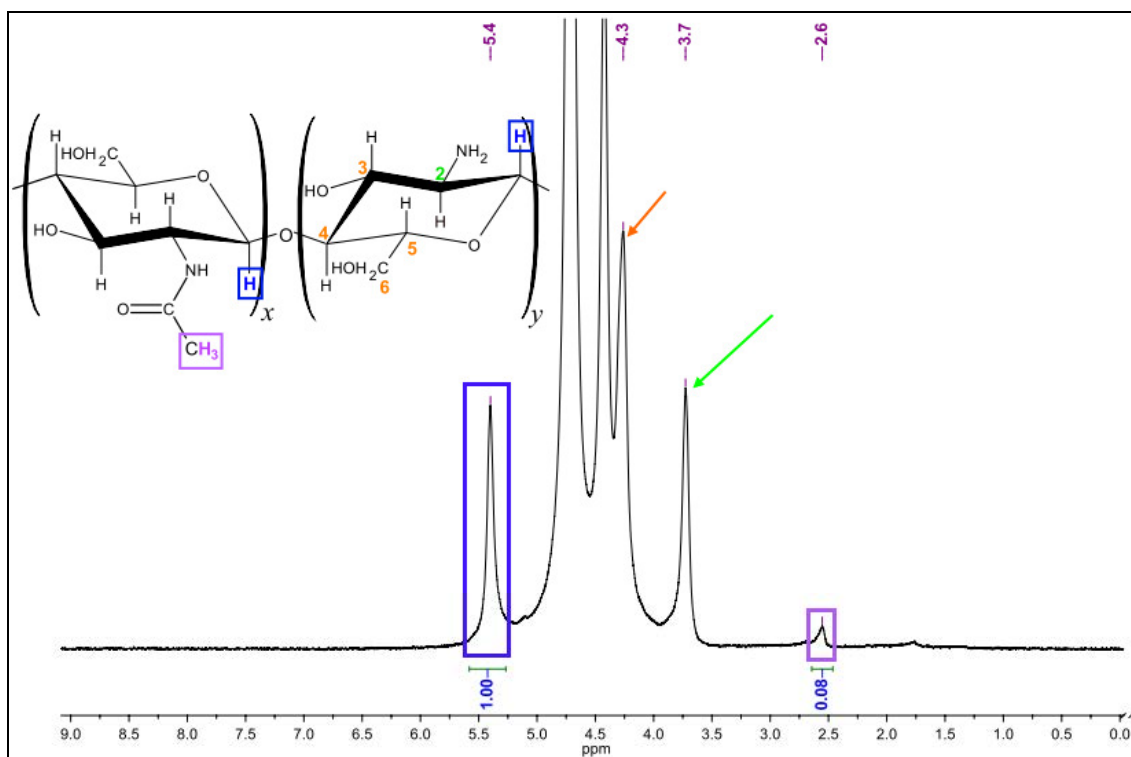
4.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ^1H)

A caracterização por RMN de ^1H para a quitosana desacetilada é mostrada na figura 11. O sinal localizado na região de 5,4 ppm corresponde ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono anomérico C1 enquanto que o sinal localizado na região de 4,3 ppm corresponde aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono 3, 4, 5 e 6 da unidade de glicopiranosose. O sinal centrado em 3,7 ppm corresponde ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel e aquele centrado em 2,6 ppm corresponde aos átomos de hidrogênio pertencentes aos grupos acetamida. O grau de desacetilação foi determinado utilizando-se a equação 3 e os valores de integração dos sinais localizados em 2,6 ppm e em 5,4 ppm (indicados em lilás e azul, respectivamente).

$$GD_{\%} = \left[1 - \left(\frac{I_{Met-A}}{3} \right) \right] \times 100 \quad (3)$$

de modo que I_{Met-A} é a área integrada do sinal localizado em 2,6 ppm correspondente aos hidrogênios dos grupos acetamida e I_{H1} é a área integrada do sinal localizado em 5,4 ppm, que corresponde aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos. O resultado obtido para o grau de desacetilação foi 97,3%.

Figura 11 – Espectro de RMN de ^1H para a quitosana desacetilada.

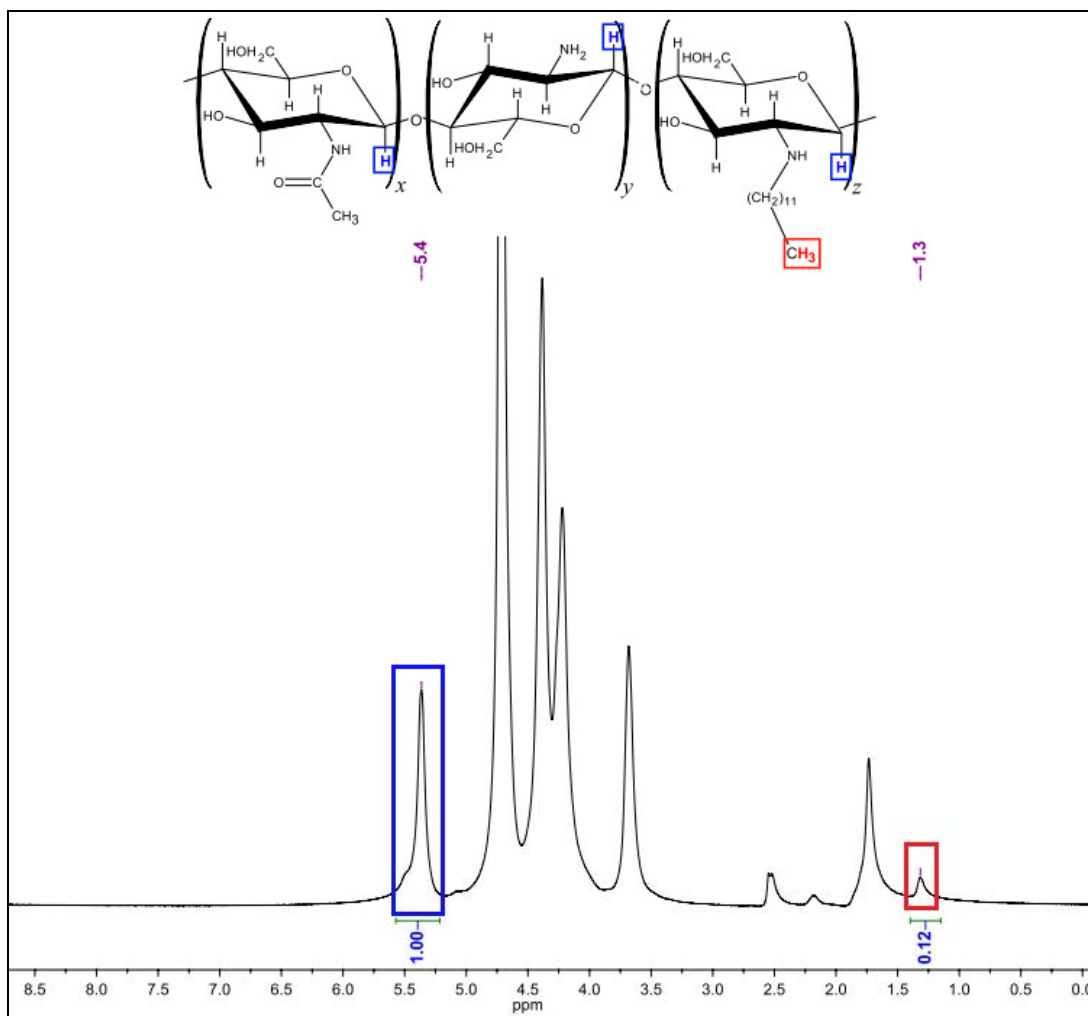


4.4 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE ^1H)

4.4.1 Derivados de quitosana contendo o grupo dodecila

Na figura 12 é apresentado o espectro de RMN de ^1H para o derivado de quitosana contendo grupos dodecila (QD4DD). Além dos sinais característicos da quitosana, é possível observar em 1,3 ppm o sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metila presente na cadeia hidrocarbônica do grupo dodecila. O sinal em 5,4 ppm corresponde aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos. A porcentagem de grupos dodecila na cadeia da quitosana foi calculada comparando-se a integração do sinal correspondente aos hidrogênios metílicos do grupo dodecila ($I_{\text{Met-D}}$) com o valor correspondente à integração do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos (I_{H_1}). A relação utilizada está apresentada em (4).

Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H para o derivado de quitosana contendo grupos dodecila (QD4DD).



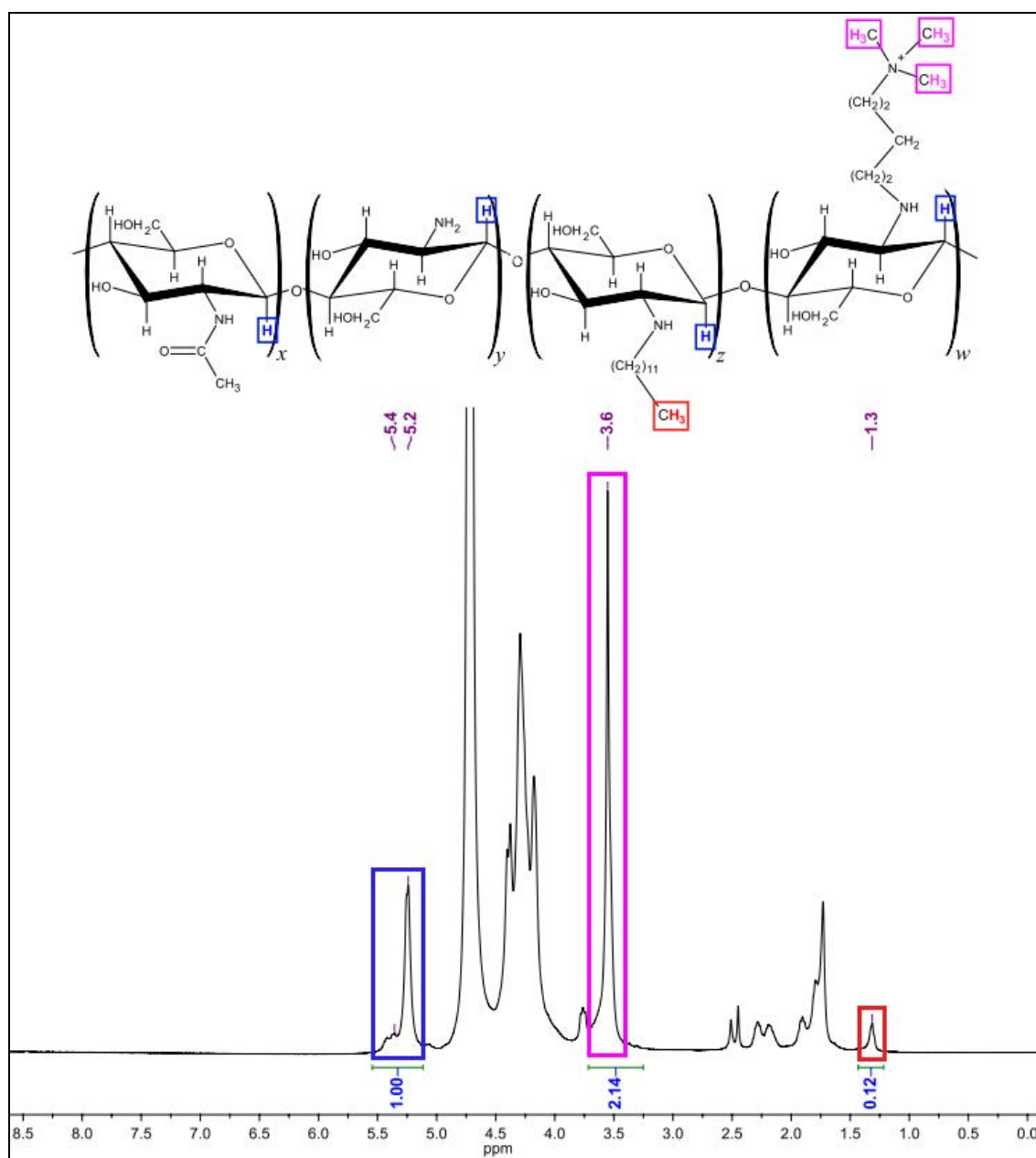
$$GS_{DD\%} = \left(\frac{I_{\text{Met-D}}}{\frac{3}{I_{H1}}} \right) \times 100 \quad (4)$$

O grau de substituição com grupos dodecila foi de 4,0%.

4.4.2 Derivados anfífilicos quaternários de quitosana.

O espectro de RMN de ^1H para o derivado de quitosana contendo 4,0% de grupos dodecila e 12,7% de grupos pentiltrimetilamônio (QD4DD13PE) é apresentado na figura 13.

Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H para o derivado de quitosana contendo 4,0% de grupos dodecila e 12,7% de grupos pentiltrimetilamônio (QD4DD13PE).



Na figura 13, além dos sinais característicos da quitosana, podem ser observados os sinais correspondentes aos hidrogênios do grupo pentiltrimetilamônio e o desdobramento do hidrogênio anomérico (5,24 e 5,36 ppm) devido à substituição. Em 3,6 ppm aparece o sinal referente aos nove hidrogênios metílicos do grupo trimetilamônio (indicado em rosa).

A porcentagem do grupo pentiltrimetilamônio na cadeia da quitosana foi calculada comparando-se a integração do sinal dos hidrogênios metílicos do grupo

trimetilamônio (I_{Met-P}) com o valor correspondente às integrações dos hidrogênios anoméricos (I_{H1}). A relação utilizada é apresentada em (5):

$$GS_{PE\%} = \left[\frac{\left(\frac{I_{Met-P} - 1}{9} \right)}{I_{H1}} \right] \times 100 \quad (5)$$

O valor “1,0” é subtraído do valor da integração do sinal dos hidrogênios metílicos do grupo trimetilamônio devido a superposição do sinal do hidrogênio ligado ao carbono 2. Para os derivados anfifílicos apresentados na figura 14, cujos graus de substituição com grupos pentiltrimetilamônio são 4,8 e 46,3% (QD4DD5PE e QD4DD46PE, respectivamente), não há necessidade de subtrair esse valor, pois os sinais aparecem separados. A tabela 3 reúne todos os dados de caracterização das quitosanas modificadas.

Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H para os derivados de quitosana contendo 4% de grupos dodecila e 4,8 e 46,3% de grupos pentiltrimetilamônio (QD4DD5PE e QD4DD46PE, respectivamente).

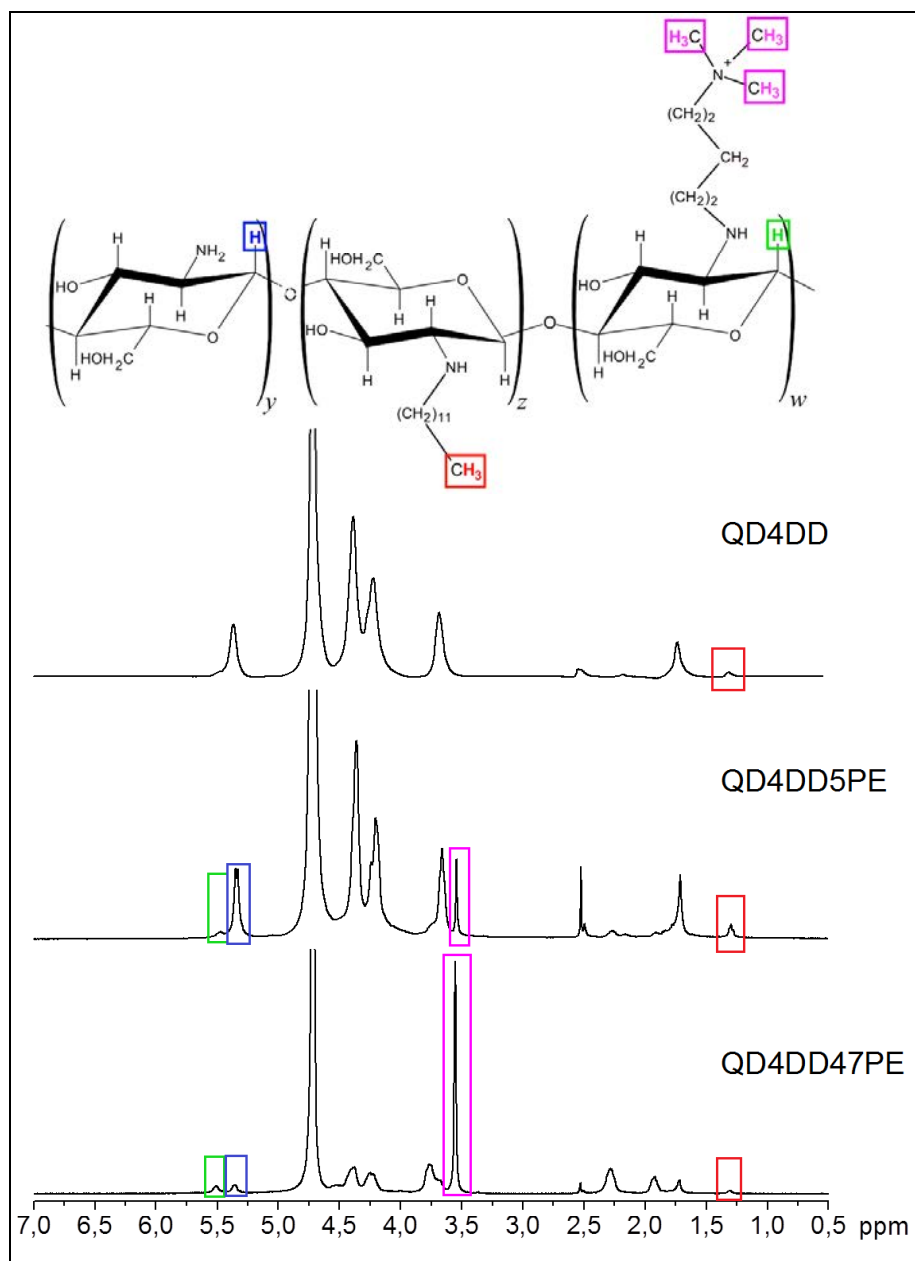


Tabela 3 – Caracterização das quitosanas modificadas.

Polímero	GD ¹ (%)	GS _{DD} ² (%)	GS _{PE} ³ (%)	Mw ⁴ (kDa)	Polidispersividade	Razão Molar ⁵	
						Dod/ NH ₂	Pentil/ NH ₂
QC	-	-	-	338,46	4.36	-	-
QD	97,3	-	-	137,12	3.46	-	-
QD4DD	97,3	4,0	-			0,05	-
QD4DD5PE	97,3	4,0	4,8			0,05	1,85
QD4DD13PE	97,3	4,0	12,7			0,05	0,67
QD4DD57PE	97,3	4,0	46,3			0,05	3,76

¹Grau de desacetilação. ²Grau de substituição com grupos dodecila. ³Grau de substituição com grupos pentiltrimetilamônio. ⁴Massa molecular estimada por cromatografia de permeação em gel. ⁵Razão molar utilizada na reação.

4.5 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

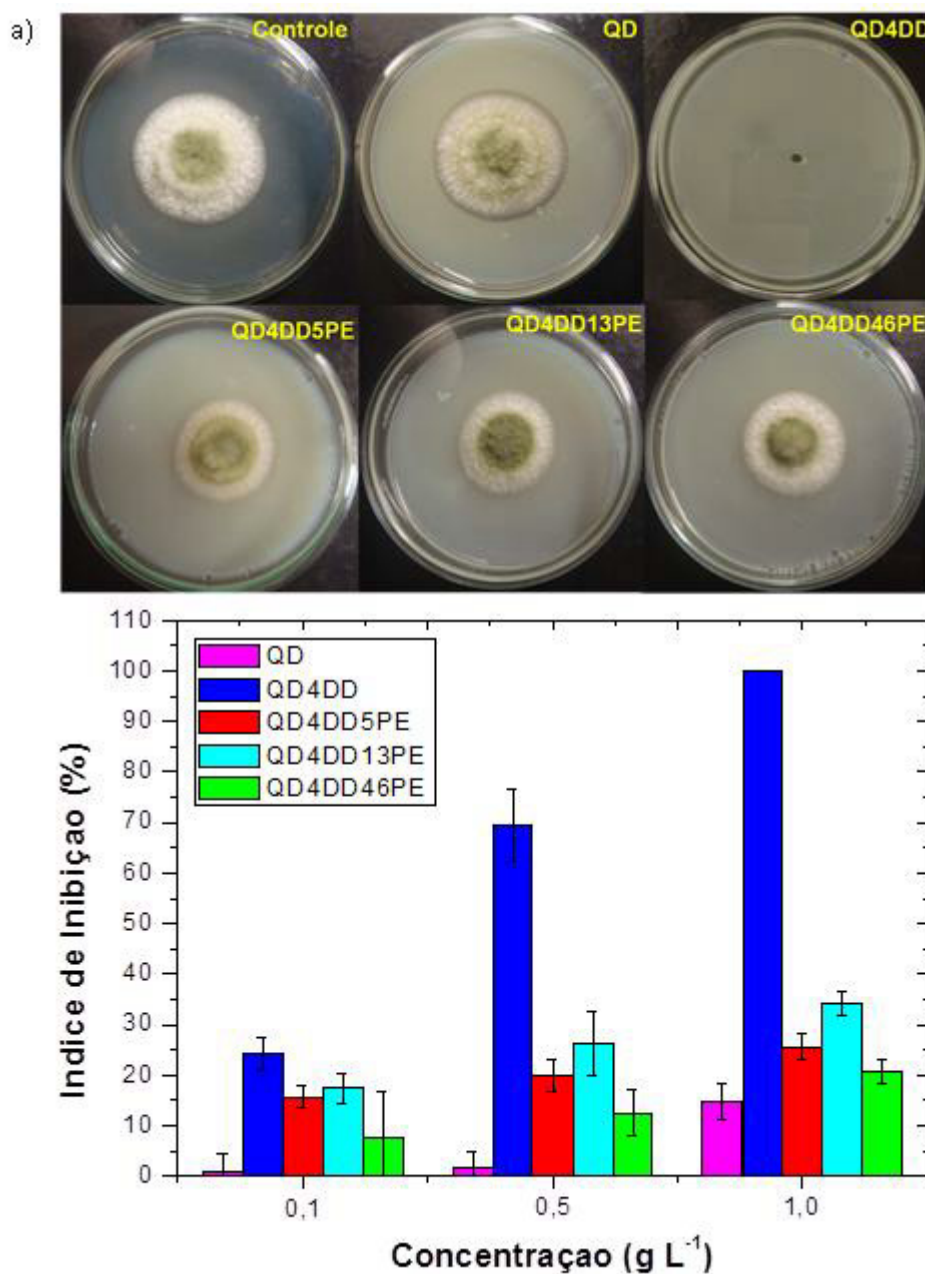
Os ensaios microbiológicos foram realizados com QD e os derivados QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE. Na tabela 4 estão resumidos os índices de inibição em porcentagem e seus respectivos desvios padrão referentes ao 7º dia de incubação obtidos para todos os derivados de quitosana testados *in vitro* contra o fungo *Aspergillus flavus*.

Tabela 4 – Índices de inibição em porcentagem com seus respectivos desvios padrão para as quitosanas comercial, desacetilada e os derivados sintetizados.

Concentração de polímero (g L ⁻¹)	Índice de Inibição do crescimento do fungo (%)				
	QD	QD4DD	QD4DD5PE	QD4DD13PE	QD4DD46PE
0,1	0,86 ± 3,69	24,31 ± 3,05	15,66 ± 2,14	17,36 ± 3,13	7,68 ± 8,96
0,5	1,77 ± 3,05	69,46 ± 7,06	19,93 ± 3,09	26,37 ± 6,27	12,50 ± 4,53
1,0	14,81 ± 3,59	100,00	25,54 ± 2,61	34,18 ± 2,22	20,83 ± 2,38

Na figura 15, é apresentado um estudo comparativo dos índices de inibição da quitosana desacetilada e dos derivados sintetizados.

Figura 15 – a) Ensaios típicos dos experimentos de inibição de *A. flavus* na presença dos derivados de quitosana na concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$, 7º dia de experimento. b) Índices de inibição do crescimento de *A. flavus* em concentrações crescentes dos derivados.



Os resultados mostram que a modificação hidrofóbica aumentou consideravelmente a atividade antifúngica da quitosana. Na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, o derivado de quitosana dodecilado (CH4DD) inibiu completamente (100%) o crescimento do *Aspergillus flavus*. A importância do efeito hidrofóbico na atividade

antimicrobiana dos derivados de quitosana observada neste trabalho está de acordo com aquelas recentemente relatadas por De Oliveira Pedro *et al.* (2013), Viegas de Souza *et al.* (2013), Rúnarsson *et al.* (2010) e Sajomsang *et al.* (2012). Segundo Viegas de Souza *et al.* (2013) e Sajomsang *et al.* (2012), as maiores atividades de quitosanas contendo grupos hidrofóbicos foram atribuídas ao aumento das interações hidrofóbicas entre o polímero e a membrana da célula fúngica. Entretanto, a inserção de grupos quaternários de amônio nestes derivados hidrofóbicos diminuiu a atividade observada na concentração de 1,0 g L⁻¹, apresentando índice de inibição de aproximadamente de 40% para *A. flavus*.

Uma vez que os grupos quaternários de amônio conferem solubilidade aos derivados em uma ampla faixa de pH, pode-se postular que conferem também maior hidrofiliabilidade às cadeias, diminuindo a interação destes com a membrana da célula fúngica. Deve-se ainda considerar que a inserção de grupos quaternários de amônio na cadeia polimérica pode dificultar o acesso do grupo dodecila ao interior da célula, diminuindo uma possível atividade intracelular do derivado.

Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam que a presença de grupos quaternários favorece a interação dos derivados com a parede celular. Segundo Guo *et al.* (2007), que estudou derivados quaternizados contendo os grupos fenil e 2-hidroxifenil contra o fungo *Botrytis cinérea* na concentração de 1000 ppm, os derivados apresentaram índices de inibição de 81,2% e 58,6%, respectivamente, enquanto que a quitosana desacetilada (GD = 97%) apresentou índice de inibição de 47%. Entretanto, em trabalho recente desenvolvido em nosso grupo, De Oliveira Pedro *et al.* (2013) mostrou que o aumento da eficiência devido a presença de grupos propiltrimetilamônio e pentiltrimetilamônio são limitados, de modo que o derivado contendo 40% de grupos propiltrimetilamônio apresentou índice de inibição de cerca de 16% para a concentração de 1,0 g L⁻¹, enquanto que os índices de inibição para as quitosanas comercial e desacetilada, na mesma concentração, foram 5 e 7%, respectivamente.

A atividade da quitosana tem sido explicada como sendo baseada na interação eletrostática entre os grupos amina carregados positivamente da estrutura da quitosana e a superfície da parede celular do microrganismo alvo carregada negativamente, o que pode ocasionar a ruptura da parede celular e, por conseguinte, a morte da célula (GUO *et al.*, 2007). Além disso, para a quitosana

desacetilada e derivados com baixos graus de substituição, a interação do polímero com a superfície celular pode levar à formação de uma camada impermeável em torno da célula, bloqueando, assim, o transporte dos solutos essenciais para a célula (EATON *et al.*, 2008).

Em relação à presença de grupos hidrofóbicos, Viegas de Souza *et al.* (2013) estudaram a capacidade antifúngica de derivados de quitosana modificados somente com grupos propiltrimetilamônio e derivados modificados com grupos propiltrimetilamônio e grupos dodecila contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Contra o fungo *A. flavus*, o maior índice de inibição obtido para o derivado quaternário ocorreu na concentração de 1,0 g L⁻¹ (cerca de 18%), enquanto que para o derivado quaternário contendo 10% de grupos dodecila, na concentração de 0,5 g L⁻¹ ocorreu inibição de 100% do crescimento do fungo (VIEGAS DE SOUZA *et al.*, 2013). Resultado semelhante foi obtido por Dos Santos Gabriel (2013) para derivados de quitosana contendo somente grupos dodecila. Na concentração de 1,0 g L⁻¹, derivados de quitosana contendo 3% de grupos dodecila apresentaram cerca de 43% de inibição contra o fungo *Aspergillus flavus* (DOS SANTOS GABRIEL, 2013).

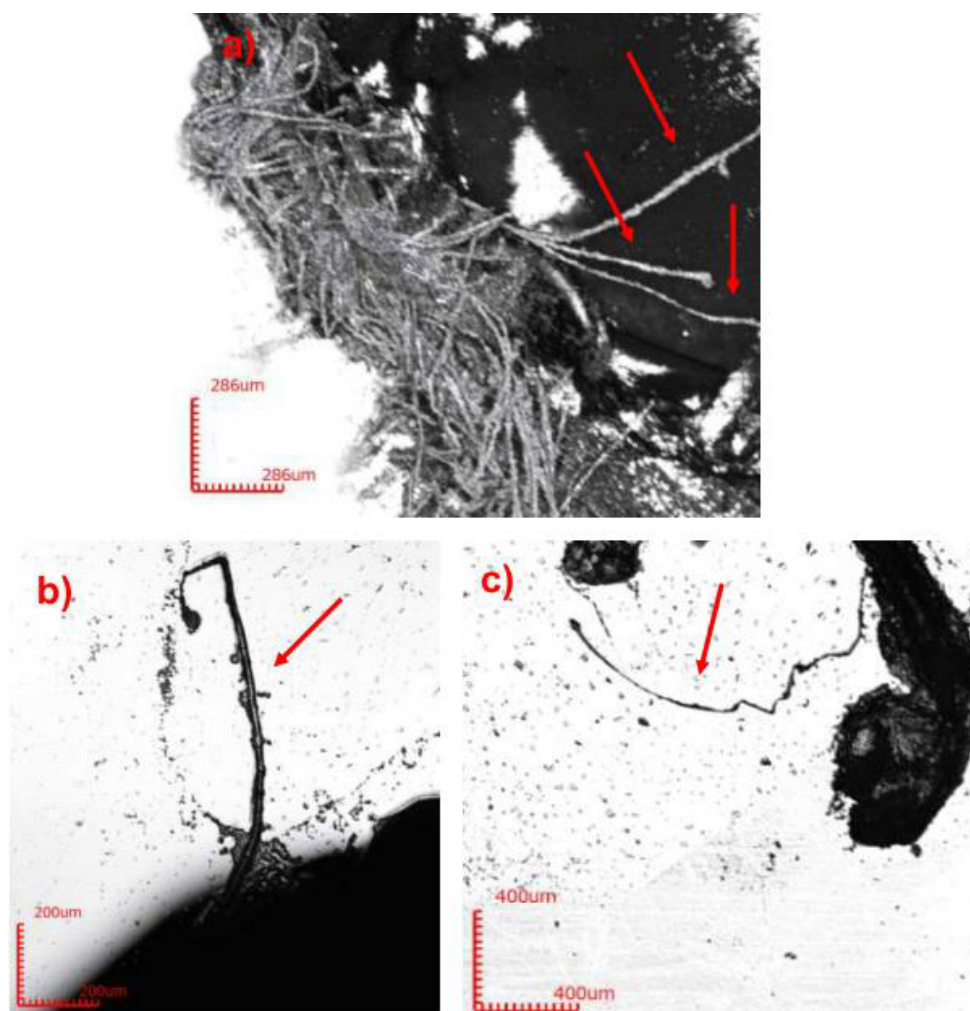
Embora o mecanismo de ação destes derivados não tenha sido completamente elucidado, a capacidade antifúngica aumentada dos derivados de quitosana contendo grupos hidrofóbicos pode ser atribuída à forte ligação das cadeias de dodecila às paredes celulares fúngicas, sendo estas interações hidrofóbicas mais intensas e as maiores responsáveis pela inibição do crescimento do micro-organismo. Portanto, a presença de grupos dodecila tem um importante papel na atividade antifúngica destes derivados e os índices de inibição dependem do equilíbrio hidrofílico/hidrofóbico e deve ser ajustado para se maximizar as atividades antifúngicas.

4.6 MICROSCOPIA CONFOCAL À LASER

A microscopia confocal a laser foi utilizada para avaliar possíveis danos causados pelos derivados de quitosana à célula do micro-organismo. As imagens obtidas para o fungo *A. flavus* na ausência de quitosana (figura 16-a) mostram que as hifas fúngicas apresentam-se intactas. Por outro lado, na presença de QD4DD,

nota-se que as hifas apresentam-se retorcidas e danificadas, tanto na concentração $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de polímero (figura 16-b), quanto na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (figura 16-c). Portanto, as imagens indicam que a presença dos grupos hidrofóbicos favorece a interação com a parede celular dos fungos, e podem afetar a morfologia das hifas, inibindo o crescimento dos mesmos (VIEGAS DE SOUZA *et al.*, 2013, JAGADISH *et al.*, 2012).

Figura 16 – Imagens microscópicas de lâminas contendo o fungo e quitosanas marcadas com rodamina: (a) *A. flavus* na ausência de quitosana (controle); (b) *A. flavus* na presença de QD4DD $0,1 \text{ g L}^{-1}$; (c) *A. flavus* na presença de QD4DD $1,0 \text{ g L}^{-1}$.



Estudos anteriores propõem que a adsorção de quitosana pode inibir o crescimento e desenvolvimento das hifas (GOY, BRITTO & ASSIS, 2009) e que o

mecanismo antifúngico envolve alterações na morfogênese da parede celular com moléculas de quitosana interferindo diretamente com o crescimento de fungos (EL GHAOUTH *et al.*, 1992). Ideias complementares foram descritas por Eweis, Elkholy & Elsabee (2006), que com base em análises microscópicas, relataram que para o caso de oligômeros de quitosana, pode ocorrer a difusão para o interior das hifas, interferindo na atividade de enzimas responsáveis pelo crescimento do fungo.

A figura 17 mostra uma imagem de microscopia obtida de uma lâmina contendo o fungo *A. flavus* na presença do derivado QD4DD marcado com a sonda fluorescente rodamina, concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Essa imagem mostra claramente a adesão na parede da hifa e alguns pontos luminosos que indicam que a quitosana pode atravessar a parede celular e desencadear um mecanismo de inibição intracelular.

Figura 17 – Microscopia confocal a laser do fungo *A. flavus* incubado na presença do derivado QD4DD, concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$.



Além da adesão à parede celular, o modo de ação para inibir o desenvolvimento do fungo pode variar com a massa molecular e também com o tipo micro-organismo alvo, de modo que vários mecanismos podem ser postulados.

Evidências para isso foram observadas em imagens de microscopia confocal a laser no estudo da interação de quitosana de diferentes massas moleculares com *Fulvia fulva* (LI *et al.*, 2010). Para os polímeros de alta massa molecular (1320 kDa), as microscopias mostraram que a quitosana interage somente com a superfície da hifa, não sendo observado fluorescência em seu interior. Entretanto, para quitosanas com massas moleculares menores que 500 kDa, as microscopias mostraram que o polímero é capaz de permear para o interior das hifas, postulando-se que o mecanismo de inibição pode envolver a inibição da transcrição do RNA (LI *et al.*, 2010; HADWIGER, FRISTENSKY & RIGGLEMAN, 1984).

Nesse sentido, nossos resultados, embora preliminares, apontam para um mecanismo de inibição que envolve principalmente o bloqueio ou disfunção no transporte através da parede celular.

4.7 ESTUDO COM MODELOS DE MEMBRANAS

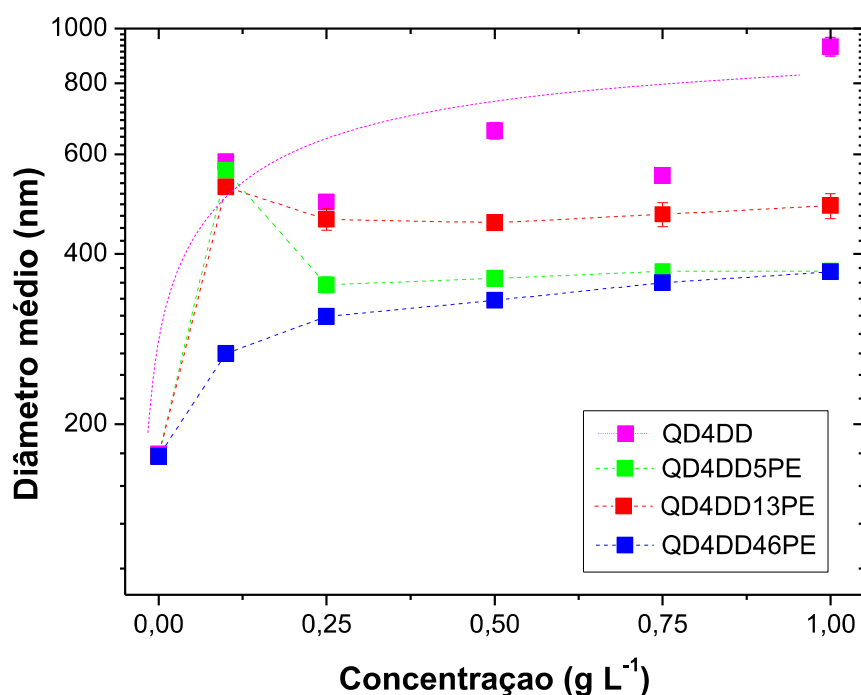
4.7.1 Determinação do diâmetro médio das vesículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O estudo utilizando espalhamento de luz dinâmico foi realizado tendo como objetivo investigar os possíveis efeitos provocados na estrutura das vesículas com a adição gradual dos derivados de quitosana sintetizados. Os experimentos foram realizados utilizando vesículas zwitteriônicas de fosfatidilcolina (PC) e vesículas com carga superficial negativa de fosfatidilcolina e de fosfatidilglicerol (PC:PG 80:20). A tabela 5 e a figura 18 apresentam os resultados obtidos para as medidas do diâmetro médio das vesículas de PC com a adição de quantidades crescentes dos derivados QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE

Tabela 5 – Medidas do diâmetro médio das vesículas de PC na presença dos derivados de quitosana (QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE) em concentrações de 0,1 a 1,0 g L⁻¹ (pH 5,5).

Concentração do polímero (g L ⁻¹)	Diâmetro médio das vesículas de PC (nm)			
	QD4DD	QD4DD5PE	QD4DD13PE	QD4DD46PE
0,00	177,27 ± 2,49	183,43 ± 1,69	183,43 ± 1,69	183,43 ± 1,69
0,10	581,70 ± 4,09	643,80 ± 20,04	598,17 ± 6,57	288,23 ± 6,15
0,25	494,17 ± 13,09	389,87 ± 13,64	519,87 ± 24,14	339,33 ± 4,63
0,50	660,10 ± 22,30	401,13 ± 4,58	512,20 ± 1,55	364,13 ± 6,53
0,75	549,63 ± 11,45	413,73 ± 9,80	531,03 ± 28,16	393,33 ± 6,91
1,00	928,90 ± 34,66	413,53 ± 12,57	551,33 ± 30,20	412,63 ± 7,70

Figura 18 – Efeito da adição dos derivados anfílicos de quitosana QD4DD, QD4DD5PE, QD4DD13PE e QD4DD46PE no diâmetro médio das vesículas de PC em diferentes concentrações (pH 5,5).



Os resultados mostraram que os diâmetros médios das vesículas aumentam com a adição dos derivados e tendem a atingir um patamar para concentrações acima de 0,5 g L⁻¹. Devido à natureza zwitteriônica do lipídeo, a

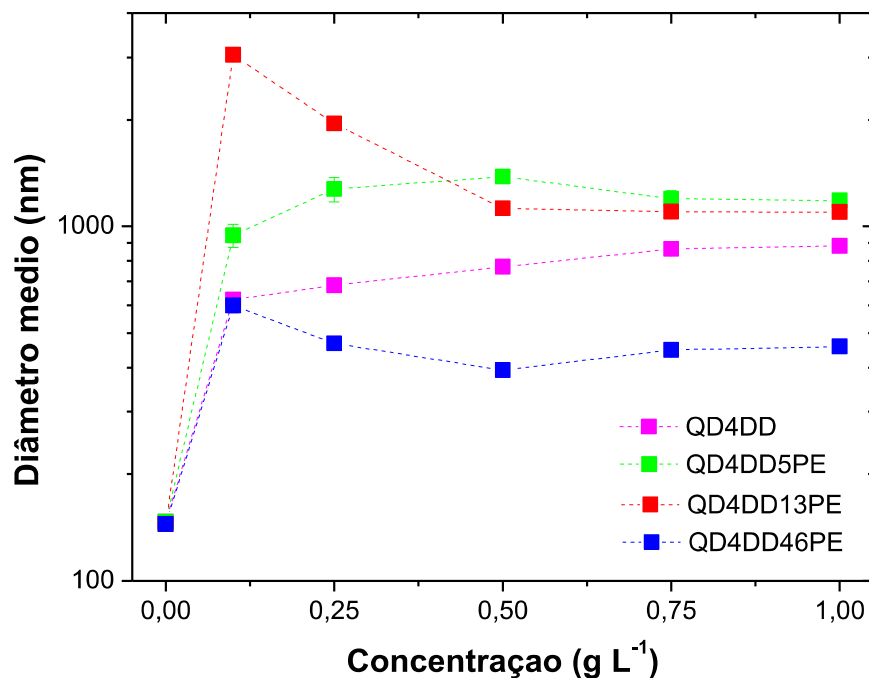
interação pode envolver tanto interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas. Nesse sentido, a intercalação de grupos dodecila na bicamada lipídica, bem como a adesão das cadeias na superfície, podem contribuir para o comportamento observado. Em geral, os maiores aumentos foram observados para QD4DD, o que pode ser devido à sua maior hidrofobicidade. Resultados similares foram recentemente observados por Tan *et al.* (2013), que investigaram as alterações dinâmicas e estruturais da membrana lipossomal resultantes da interação com quitosana. Os resultados mostraram que as cadeias adsorvem na superfície da membrana por meio da atração eletrostática, levando inicialmente a um aumento de tamanho com posterior estabilidade das vesículas. Além disso, as interações das cadeias podem ser reforçadas pela incorporação de suas porções hidrofóbicas (TAN *et al.*, 2013). Portanto pode-se postular que os aumentos observados se devem provavelmente à agregação das vesículas. A adsorção inicial diminui a hidratação da superfície das vesículas tornando-as mais hidrofóbicas, o que pode favorecer o processo de agregação.

Nos estudos envolvendo vesículas com carga superficial negativa, além do efeito hidrofóbico, a interação eletrostática torna-se mais proeminente e os diâmetros aumentam mais abruptamente.

Tabela 6 – Medidas do diâmetro médio das vesículas de PC:PG (80:20) na presença dos derivados de quitosana sintetizados em concentrações de 0,1 a 1,0 g L⁻¹ (pH 5,5).

Concentração do polímero (g L ⁻¹)	Diâmetro médio das vesículas de PC:PG (nm)			
	QD4DD	QD4DD5PE	QD4DD13PE	QD4DD46PE
0,00	146,93 ± 0,40	146,93 ± 0,40	144,70 ± 0,89	144,70 ± 0,89
0,10	621,63 ± 15,73	943,13 ± 71,08	3049,33 ± 121,39	598,67 ± 27,27
0,25	682,53 ± 8,44	1274,00 ± 100,18	1951,33 ± 21,13	468,03 ± 18,35
0,50	769,27 ± 15,31	1381,00 ± 36,29	1125,33 ± 33,17	393,03 ± 7,24
0,75	864,17 ± 20,45	1197,33 ± 63,81	1099,33 ± 35,50	448,67 ± 9,65
1,00	881,13 ± 29,52	1182,00 ± 33,42	1098,33 ± 39,46	458,20 ± 4,31

Figura 19 – Efeito da adição de diferentes concentrações dos derivados anfílicos de quitosana no diâmetro médio de vesículas com carga superficial negativa PC:PG (pH 5,5).



Portanto, o comportamento observado para as vesículas PC:PG é similar aquele observado para vesículas de PC, entretanto, para PC:PG, o aumento no diâmetro médio das vesículas ocorre mais abruptamente em 0,1 g L⁻¹. A diferença mais proeminente entre os dois tipos de vesículas é observada para os derivados QD4DD5PE e QD4DD46PE, que induziram aumentos expressivos no diâmetro médio das vesículas na concentração de 0,1 g L⁻¹ e superiores àqueles induzidos por QD4DD. Portanto, nota-se das tabelas 5 e 6, que para todos os polímeros em suas respectivas concentrações, os maiores diâmetros médios foram observados para as vesículas PC:PG, evidenciando a importância das interações eletrostáticas. Considerando-se a natureza anfílica dos derivados, é também provável que a interação com as vesículas sejam concorrentes com a auto-associação dos derivados, que podem estar associados na forma de agregados inter e/ou intramoleculares.

Com base nesses resultados pode-se afirmar que a força de interação derivados-vesículas depende diretamente do balanço hidrofóbico/hidrofílico e da

conformação das cadeias, que podem favorecer as interações hidrofóbicas e eletrostáticas culminando na adsorção do polímero na superfície da vesícula.

4.7.2 Medidas de potencial zeta

Os valores de potencial zeta (ξ) foram determinados com o intuito de complementar as observações feitas nos experimentos de DLS em relação à ocorrência de interações eletrostáticas entre os derivados de quitosana e as vesículas de PC e PC:PG. A tabela 7 e a figura 20 mostram os resultados obtidos para os valores de potencial zeta das vesículas de PC na presença dos polímeros

A figura 20 mostra que todos os derivados provocam um aumento considerável no potencial zeta das vesículas, passando de valores próximo de zero para valores superiores a +20 mV. O derivado QD4DD é o que apresenta maior valor de zeta na presença de vesículas de PC (em torno de +24 mV na concentração de 1,0 g L⁻¹). Este resultado corrobora com aquele obtido no experimento de DLS, o qual provoca o maior aumento no diâmetro das vesículas de PC.

Resultados semelhantes são observados para o experimento de potencial zeta realizado com vesículas aniônicas PC:PG. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 8 e na figura 21. Devido à carga superficial negativa, antes da adição dos derivados de quitosana, os potenciais zeta apresentam-se próximos de -21 mV. Na primeira adição de polímero, as cargas negativas favorecem a interação e são neutralizadas, passando para valores de aproximadamente +25 mV. A partir desta concentração (0,1 g L⁻¹ de polímero), o potencial zeta mostra pouca variação, mantendo-se sempre próximo a +20 mV. Os valores de potencial zeta muito próximos indicam que a interação é muito forte e independe das modificações estruturais nos derivados.

Tabela 7 – Medidas de potencial zeta das vesículas de PC na presença dos derivados de quitosana (pH 5,5).

Concentração do polímero (g L ⁻¹)	Potencial zeta (mV) – Vesículas PC			
	QD4DD	QD4DD5PE	QD4DD13PE	QD4DD46PE
0,00	-0,64 ± 0,09	0,20 ± 0,34	0,20 ± 0,34	0,20 ± 0,34
0,10	24,93 ± 0,90	22,80 ± 1,11	24,17 ± 1,74	26,40 ± 0,82
0,25	25,20 ± 1,21	24,27 ± 0,42	23,53 ± 0,85	26,23 ± 1,63
0,50	24,87 ± 0,67	21,87 ± 0,87	21,90 ± 1,01	25,60 ± 0,53
0,75	23,97 ± 1,45	20,77 ± 0,83	19,47 ± 0,40	25,00 ± 1,51
1,00	23,83 ± 0,25	19,53 ± 0,40	16,53 ± 0,98	23,23 ± 1,21

Figura 20 – Efeito da adição dos derivados anfifílicos de quitosana no potencial zeta das vesículas de PC (pH 5,5).

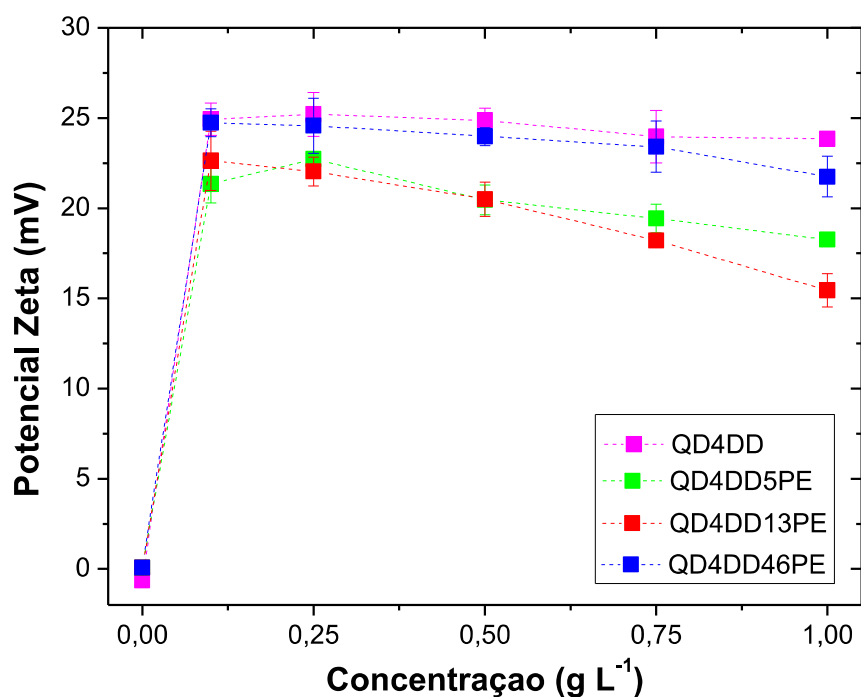
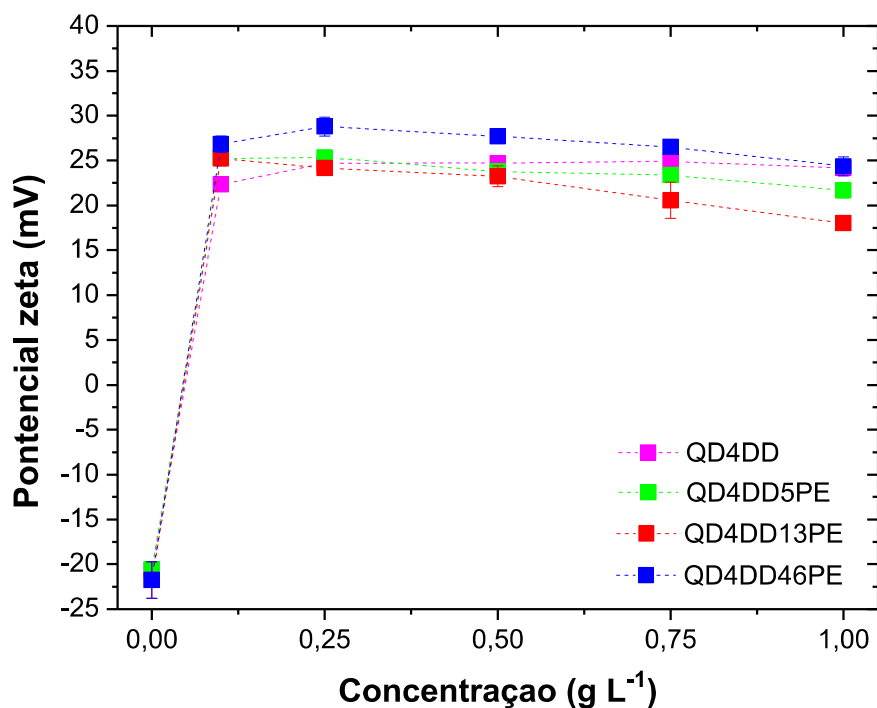


Tabela 8 – Medidas de potencial zeta das vesículas de PC:PG após a adição dos derivados de quitosana sintetizados (pH 5,5).

Concentração do polímero (g L ⁻¹)	Potencial zeta (mV) – Vesículas PC:PG			
	QD4DD	QD4DD5PE	QD4DD13PE	QD4DD46PE
0,00	-20,60 ± 0,70	-20,60 ± 0,70	-21,77 ± 2,02	-21,77 ± 2,02
0,10	22,33 ± 0,55	25,27 ± 0,81	25,20 ± 0,79	26,83 ± 0,91
0,25	24,70 ± 0,36	25,37 ± 0,32	24,13 ± 0,76	28,80 ± 1,05
0,50	24,73 ± 0,58	23,77 ± 0,74	23,23 ± 1,16	27,70 ± 0,75
0,75	24,90 ± 0,79	23,37 ± 0,49	20,57 ± 2,00	26,53 ± 0,15
1,00	24,13 ± 0,83	21,67 ± 0,81	18,03 ± 0,42	24,37 ± 1,06

Figura 21 – Efeito da adição de derivados anfílicos de quitosana no potencial zeta das vesículas aniônicas de PC:PG (pH 5,5).



4.7.2 Experimento de vazamento de vesículas por fluorimetria

O vazamento do marcador fluorescente carboxifluoresceína induzido pela interação polímero-vesícula foi monitorado pela emissão de fluorescência e as porcentagens de vazamento foram calculadas segundo a equação 2 da parte

experimental. Uma vez que os derivados QD4DD e QD4DD5PE não são completamente solúveis nas condições do experimento (pH 7,5), foram testados somente os derivados QD4DD13PE e QD4DD46PE. Os gráficos de porcentagem de vazamento *versus* concentração de polímero construídos após a realização dos experimentos são apresentados nas figuras 22 e 23.

Figura 22 – Porcentagem de vazamento de fluoresceína induzida pelo polímero QD4DD13PE (pH 7,5).

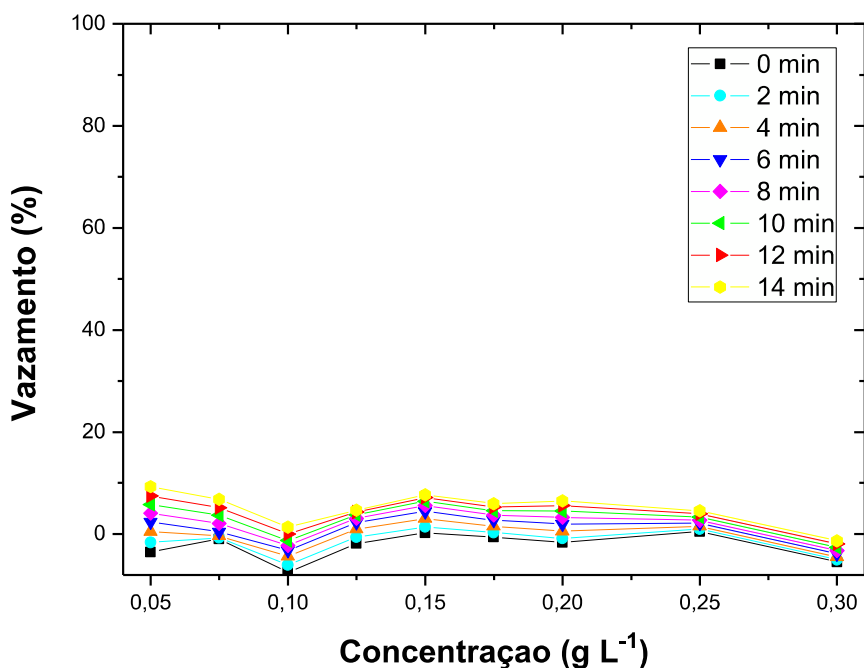
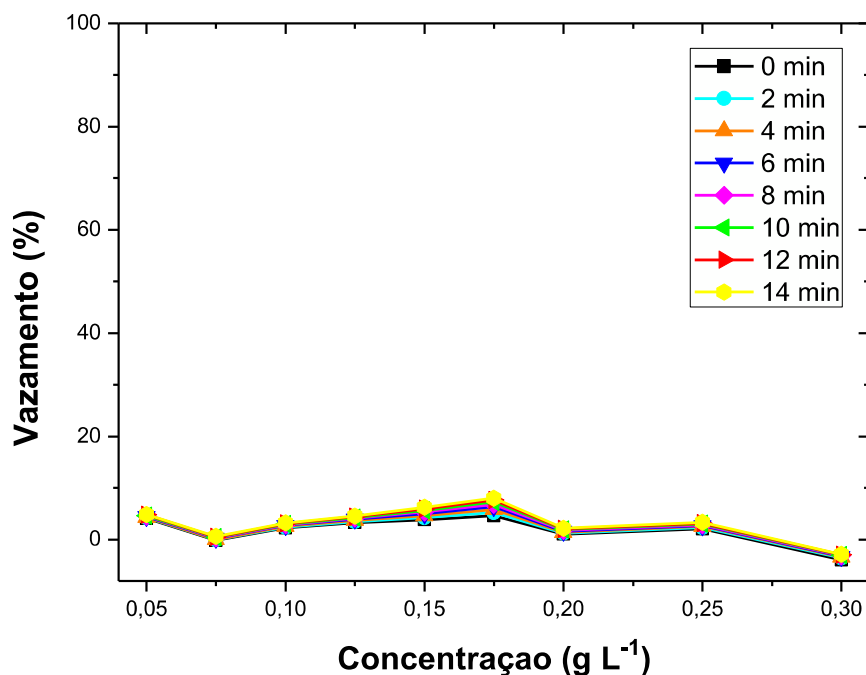


Figura 23 – Porcentagem de vazamento de fluoresceína induzida pelo polímero QD4DD46PE (pH 7,5).



De forma geral, os dois derivados testados não provocaram o vazamento do marcador fluorescente presente no interior das vesículas de PC, de modo que a porcentagem de vazamento mostrou-se sempre próxima de zero para todas as concentrações. Esse fato sugere que as mudanças ocorridas tanto nos experimentos de DLS quanto nos experimentos de potencial zeta se devem à interação do polímero com a superfície das vesículas e não propriamente à desestruturação das mesmas. A interação entre a quitosana e seus derivados e as vesículas de fosfolípidos tem sido amplamente estudada na literatura e vários mecanismos foram propostos. O primeiro mecanismo, proposto por Quemeneur, Rinaudo & Pépin-Donat (2008), demonstra que a interação entre a quitosana e os lipossomos resulta principalmente na adsorção do polímero na superfície da bicamada lipídica. Estes resultados propõem que a alquilação da quitosana não modifica o grau de cobertura dos lipossomos quando comparado ao polímero não modificado e que as porções hidrofóbicas adicionadas à quitosana não interagem com a membrana lipídica, não contribuindo para a solubilização da mesma (QUEMENEUR, RINAUDO & PÉPIN-DONAT, 2008).

O segundo mecanismo, proposto por Mertins & Dimova (2013), envolve a formação de poros na bicamada lipídica, levando à ruptura das vesículas. Essas observações foram realizadas em experimentos utilizando vesículas carregadas negativamente. Em princípio, esse mecanismo pode ser descartado para as vesículas zwitteriônicas, uma vez que a porcentagem de vazamento do marcador fluorescente foi desprezível. Entretanto, experimentos utilizando vesículas de PC:PG poderão fornecer informações sobre o efeito da densidade de cargas na interação entre a quitosana e as vesículas carregadas negativamente e a possível ruptura das mesmas. Ainda de acordo com o trabalho de Mertins & Dimova (2013), esta característica demonstra o potencial da quitosana em afetar a permeabilidade, promover a desestruturação, formação poros e ocasionar o rompimento de membranas carregadas negativamente.

Neste sentido, e considerando-se a carga superficial negativa das membranas celulares dos fungos estudados, pode-se postular que o mecanismo de ação da quitosana contra os fungos é favorecido pela interação hidrofóbica e podem envolver tanto a adsorção na parede celular, bem como a desestruturação da membrana celular do fungo. A importância da modificação hidrofóbica fica clara quando compara-se a atividade antimicrobiana da quitosana desacetilada (QD) e dos derivados de quitosana modificados com grupos dodecila, que apresentam eficiência muito superior (Figura 15).

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir:

- Os procedimentos de síntese utilizados para obtenção dos derivados anfifílicos de quitosana são viáveis e fornecem produtos com graus de substituição consideráveis. Entretanto, há degradação da cadeia polimérica durante o tempo de reação;
- Na síntese para a inserção de grupos pentiltrimetilamônio, a presença de grupos dodecila na cadeia polimérica dificulta a inserção do segundo substituinte de modo que a síntese apresenta baixos rendimentos;
- Os graus de desacetilação e substituição podem ser determinados com boa precisão utilizando-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H);
- Os ensaios microbiológicos mostraram que os derivados modificados com grupos dodecila e pentiltrimetilamônio são mais eficientes em inibir o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* quando comparado à quitosana desacetilada;
- Os resultados obtidos nos experimentos com vesículas fosfolipídicas correlacionam-se com aqueles obtidos nos ensaios microbiológicos, evidenciando que a presença de grupos dodecila na cadeia da quitosana aumenta a interação com as vesículas, resultando em um aumento no diâmetro e no potencial zeta das mesmas. As interações são mais fortes com as vesículas PC:PG e podem resultar na desestruturação da bicamada e formação de poros.

Portanto, em princípio, pode-se postular que o mecanismo de ação da quitosana contra os fungos é favorecido pela interação hidrofóbica entre os derivados de quitosana e os lipídeos de membrana e podem envolver tanto a adsorção na parede celular, bem como a desestruturação da membrana celular do fungo.

6 DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

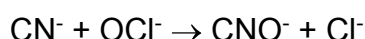
Todos os resíduos gerados durante o desenvolvimento do projeto foram devidamente tratados antes de serem descartados. Os resíduos cujo tratamento não pode ser realizado foram corretamente armazenados, identificados e encaminhados ao entreposto de resíduos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP. A seguir estão descritos os procedimentos dos tratamentos para os resíduos mais problemáticos obtidos:

- Todos os resíduos gerados durante os ensaios microbiológicos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos antes de serem descartados.

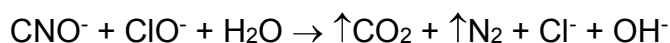
- As águas de lavagem da quitosana após o processo de desacetilação da quitosana comercial, de elevado pH, tiveram seu pH ajustado para aproximadamente 7,0 com a utilização de descartes de HCl antes de serem descartadas na rede pública de esgoto;

- As duas primeiras trocas de água da diálise dos derivados de quitosana modificados com grupos dodecila foram tratadas por conterem íons cianeto devido a utilização de cianoborohidreto de sódio como agente redutor. Estes resíduos foram tratados com excesso de hipoclorito de sódio (50% em mols) em pH básico permanecendo sob agitação constante por 12 horas. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para próximo de 8 utilizando-se solução de HCl não muito concentrada e, então, descartada na rede pública de esgoto. As reações de degradação do íon cianeto utilizando-se hipoclorito são apresentadas a seguir (PEDRO, 2010):

1) Oxidação do cianeto a cianato em faixas de pH acima de 11:



2) Oxidação do cianeto a gás carbônico e gás nitrogênio (N₂), com valores de pH próximos de 8.



REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100, 5-28, 2004.
- AMAIKE, S. & KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 107-133, 2011.
- ARCHILHA, N. L. *Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolípídeos*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Biofísica) – Instituto de Física, USP, São Paulo, 2008.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais, *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2, 27-34, 2007.
- BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. & TAKTAK, N. E. M. Antimicrobial and inhibitory enzyme activity of N-(benzyl) and quaternary N-(benzyl) chitosan derivatives on plant pathogens. *Carbohydrate Polymers*, 670-682, 2014.
- BU'LOCK, J. D. The biosynthesis of natural products, *New York: McGraw-Hill*, 1965.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação da quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, 169-173, 2001.
- CHANG, P. K. & EHRLICH, K. C. Review: What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 189-199, 2010.
- CHUNG, M.; CHUNG, Y. Polymerized ion pair amphiphile that shows remarkable enhancement in encapsulation efficiency and very slow release of fluorescent markers. *Colloids and Surfaces B*, 24, 111-121, 2002.
- COTA-ARRIOLA, O.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; ROSAS-BURGOS, E. C; BURGOS-HERNANDEZ, A.; LOPEZ-FRANCO, Y. L.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60, 937-944, 2011.
- CROMMELIN, D. J. A.; SCHREIER, H. Liposomes In: Kreuter, J. *Colloid Drug Delivery – Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, Ed. Mareei Dekker, Inc., New York, p. 73-190, 1994.
- DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 16, 2, 195-205, 2005.
- DE OLIVEIRA PEDRO, R.; TAKAKI, M.; GORAYEB, T. C. C.; DEL BIANCHI, V. L.; THOMEIO, J. C.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization

and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiological Research*, 168, 50-55, 2013.

- DESBRIÉRES J.; MARTINEZ C.; RINAUDO M. Hydrophobic derivatives of chitosan: characterization and rheological behavior. *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 21-28, 1996.
- DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI, E. S. G.; NAPOLEAO, I. T.; JHAM, G. Free fatty acid accumulation and quality loss of stored soybean seeds invaded by *Aspergillus ruber*. *Seed Science and Technology*, 29, 193-203, 2001.
- DOS SANTOS GABRIEL, J. *Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados Anfílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus*. 2013. Dissertação (Mestrado em Química – Área de concentração: Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2013.
- DUKE S. O.; BAERSON, S. R.; FRANCK E DAYAN; RIMANDO, A. M.; BRIAN E SCHEFFLER; TELLEZ, M. R.; DAVID E WEDGE; SCHRADER, K. K.; AKEY, D. H.; ARTHUR, F. H.; DE LUCCA, A. J.; GIBSON, D. M.; HARRISON-JR, H. F.; PETERSON, J. K.; GEALY, D. R.; TWORKOSKI, T.; WILSON, C. L.; MORRIS, J. B. United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service research on natural products for pest management. *Pest Management Science*, 59, 708–717, 2003.
- DYER, P. S.; O’GORMAN, C. M. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 165-192, 2012.
- EATON, P.; FERNANDES, J. C.; PEREIRA, E.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 108, 10, 1128-34, 2008.
- EHRlich, K. C.; YU, J.; COTTY, P. J. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 518–527, 2005.
- EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82, 398-402, 1992.
- EWEIS, M.; ELKHOLY, S. S.; ELSABEE, M. Z. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38, 1, 1-8, 2006.
- GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 1453-1456, 2001.

- GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; VALENZUELA-SOTO, E.; LIZARDI-MENDOZA, J.; GOYCOOLEA, F.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; MONROY-GARCIA, I. N.; AYALA-ZAVALA, J.F. Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 15-23, 2009.
- GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 241-247, 2009.
- GUO, Z. Y.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z. M.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. C. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71, 694-697, 2008.
- GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Carbohydrate Research*, 342, 1329-1332, 2007.
- HADWIGER, L. A.; FRISTENSKY, B.; RIGGLEMAN, R. C. Chitosan, a natural regulator in plant-fungal pathogen interaction, increases crop yields. In: J. P. ZIKAKIS (Ed.), *Chitin, chitosan and related enzymes*, 291-302. New York: Plenum, 1984.
- JAGADISH, R. S.; DIVYASHREE, K. N.; VISWANATH, P.; SRINIVAS, P.; RAJ, B. Preparation of N-vanillyl chitosan and 4-hydroxybenzyl chitosan and their physico-mechanical, optical, barrier, and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 87, 110-116, 2012.
- JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. A. *Chitin and chitinases*. Berlin: Birkhauser, p. 340, 1999.
- KAWASHIMA, L. M. *Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil*. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.
- KENAWY, E.; ABDEL-HAY, F. I.; EL-MAGD, A. A.; MAHMOUD, Y. Biologically active polymers: modification and anti-microbial activity of chitosan derivatives. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20, 95-111, 2005.
- KENT, C.; CARMAN, G. M. Interactions among pathways for phosphatidylcholine metabolism, CTP synthesis and secretion through the Golgi apparatus. *Trends in Biochemical Sciences*, 24, 4, 146-150, 1999.
- KILINC, A.; TEKE, M.; ONAL, S.; TELEFONCU, A. Immobilization of pancreatic lipase on chitin and chitosan. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 36, 153-163, 2006.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPES, J. A. Dictionary of Fungi, 10 ed. *United Kingdom: Cabi Europe*, 771, 2008.

- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63, 2010.
- KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27, 2000.
- KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104, 6017-6084, 2004.
- LARANJEIRA, M. C. M. & DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, 32, 3, 672-678, 2009.
- LEE, D. S. & JE, J. Y. Gallic acid-grafted-chitosan inhibits foodborne pathogens by a membrane damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6574-6579, 2013.
- LEWIS, L.; ONSONGO, M.; NJAPAU, H.; SCHURZ-ROGERS, H.; LUBER, G.; KIESZAK, S.; NYAMONGO, J.; BACKER, L.; DAHIYE, A. M.; MISORE, A.; DECOCK, K.; RUBIN, C.; Kenya Aflatoxicosis Investigation Group. Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in *Eastern and Central Kenya*. *Environmental Health Perspectives*, 113, 12, 1763-1767, 2005.
- LI, M.; CHEN, X.; LIU, J.; ZHANG, W.; TANG, X. Molecular weight-dependent antifungal activity and action mode of chitosan against *Fulvia fulva* (Cooke) Ciffrí. *Journal of Applied Polymer Science*, 119, 3127-3135, 2011.
- LILLEHOJ, E. B. Aflatoxin: an ecologically elicited genetic/activation signal. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. *Mycotoxins and Animal Foods*, Boca Raton: CRC Press, p. 2-30, 1991.
- LIU, H., DU, Y.M., WANG, X.H., SUN, L.P., Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 147-155, 2004.
- MA, O.; LAVERTU, M.; SUN, J.; NGUYEN, S.; BUSCHMANN, M. D.; WINNIK, F. M.; HOEMANN, C. D. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 616-624, 2008.
- MAGHSOUDLOU, A.; MAGHSOUDLOU, Y.; KHOMEIRI, M.; GHORBANI, M. Evaluation of Anti-Fungal Activity of Chitosan and Its Effect on the Moisture Absorption and Organoleptic Characteristics of Pistachio Nuts. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 2, 4, 65-69, 2012.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause - Alimentos, nutrição & dietoterapia*, Editora Roca Ltda, 9ª edição, p. 1179, 1998.

- MAIA, J. T. L. S.; SABBAG, S. P. & SAKATA, R. A. P. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. *Enciclopédia Biosfera*, 7, 13, 1477-1498, 2011.
- MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; EZQUERRA-BRAUERA, J. M.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX F.; CASTILLO-ORTEGA, M. M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M. S.; PLASCENVIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 305-315, 2010.
- MEENA, K. R. & KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, vol. 20 5, Article ID 473050, -9, 20 5. (doi: 0. 55/20 5/473050)
- MERTINS, O. & DIMOVA, R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: Membrane stiffening and pore formation. *Langmuir*, 29, 14552-14559, 2013.
- MICOTOXINAS. *Food Ingredients Brasil*, 7, 32-40, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acessado em 01/02/2015.
- MOHAMED, N. A.; SABAA, M. W.; EL-GHANDOUR, A. H.; ABDEL-AZIZ, M. M.; ABDEL-GAWAD, O. F. Quaternized N-substituted carboxymethyl chitosan derivatives as antimicrobial agentes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 156-164, 2013.
- MOURA, M. J. Aplicações do quitosana em liberação controlada de fármacos: algumas considerações. *Enciclopédia Biosfera*, 8, 14, 1489, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger – Principles of Biochemistry*. 4th Edition, Worth Publishers, New York, 2004.
- ONGENA, M. & JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 6, 3, 5- 25, 2008.
- PARK, N. G.; YAMATO, Y.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. *Biopolymers*, 36, 793-801, 1995.
- PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902-1914, 2010.
- PEDRO, J. P. B. *Medidas de produção mais limpa e otimização de tratamento de efluentes líquidos em indústrias galvânicas da região metropolitana de Florianópolis*. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- PENTAK, D.; SUŁKOWSKI, W. W.; WOLINSKA, A.; MASLANKA, S.; BOJKO, B.; MACIAZEK, M.; RÓWNICKA, J.; SUŁKOWSKA, A. Application of spin markers

for study of liposome prepared by the modified reverse-phase evaporation method. *Spectroscopy*, 22, 33–41, 2008.

PHOENIX, D. A., DENNISON, S. R., HARRIS, F., Models for the membrane interactions of Antimicrobial peptides, in *Antimicrobial Peptides*, Wiley Wiley-VCH, Weinheim, pag. 145, 2012.

PINNADUWAGE, P.; BRUCE, B. D. *In vitro* interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids in sequence-specific and lipid class-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 51, 32907–32915, 1996.

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24, 11, 1681-1691, 2003.

PRAKASH, B.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K.; KHARWAR, R. N. Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B₁ contamination of spices. *Food Research International*, 44, 385-390, 2011.

QIN, C.; DU, Y.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; XIAO, L.; SHI, X. Adsorption of chromium (VI) on a novel quaternized chitosan resin. *Journal of Applied Polymer Science*, 90, 505–510, 2003.

QUEMENEUR, F.; RINAUDO, M. & PÉPIN-DONAT, B. Influence of Polyelectrolyte Chemical Structure on their Interaction with Lipid Membrane of Zwitterionic Liposomes. *Biomacromolecules*, 9, 2237-2243, 2008.

RAAFAT, D.; VON-BARGEN, K.; HAAS, A.; SAHL, H. G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 12, 3764-3773, 2008.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E.; ROGGE, T. M.; STEVENS, C. V.; STEURBAUT, W.; HOFTE, M.; SMAGGHE, G. Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan. *Pest Management Science*, 62, 890–897, 2006.

RAO, M. S.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1995-2001, 2008.

REDDY, K. R. N.; RAGHAVENDER, C. R.; SALLEH, B.; REDDY, C. S.; REDDY, B. N. Potential of aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 161-165, 2011.

- RUBERT, J.; SOLER, C.; MANES, J. Application of an HPLC e MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*, 133, 176-183, 2012.
- RÚNARSSON, Ö. V.; HOLAPPA, J.; MALAINER, C.; STEINSSON, H.; HJÁLMARSDÓTTIR, M.; NEVALAINEN, T.; MÁSSON, M. Antibacterial activity of N-quaternary chitosan derivatives: Synthesis, characterization and structure activity relationship (SAR) investigations. *European Polymer Journal*, 46, 6, 1251–1267, 2010.
- SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; SAESOO, S.; OVATLARNPORN C. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 263–269, 2012.
- SAJOMSANG, W.; GONILA, P.; TANTAYANONB, S. Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44, 419–427, 2009.
- SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 242-249, 2003.
- SEO, S.; KING, J. M.; PRINYAWIWATKUL, W.; JANES, M. Antibacterial activity of ozone-depolymerized crawfish chitosan. *Journal of Food Science*, 73, 400-404, 2008.
- SHUKLA, R., KUMAR, A., SINGH, P., & DUBEY, N. K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B₁ production. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 165-170, 2009.
- SIGMA ALDRICH – L- α -Phosphatidylcholine. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p4279pis.pdf>. Acesso em 27/01/2015.
- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, 29, 776-785, 2006.
- TAKAKI, M.; DE OLIVEIRA PEDRO, R.; VIEGAS DE SOUZA, R. H. F.; DIAS, A. M.; GABRIEL, J. S.; TIERA, M. J.; DE OLIVEIRA TIERA, V. A. Synthesis, characterization and study of amphiphilic quaternary derivatives of chitosan: in vitro study against *Aspergillus flavus*. *Advances in Chitin Science* – 1 ed., 14, 205-210, 2014.
- TAN, H.; MA, R.; LIN, C.; LIU, Z.; TANG, T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 1854-1869, 2013.

- THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY LIPID LIBRARY - Phosphatidyl .
Disponível: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pg/index.htm>>. Acesso em 27/01/2015.
- TIAN, J.; HUANG, B.; LUO, X.; ZENG, H.; BAN, X.; HE, J.; WANG, Y. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, 130, 520-527, 2012.
- VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. M.; GUERRA-SÁNCHEZ, G.; MARIACA-GASPAR, G. I. Chitosan as an alternative to control phytopathogenic fungi on fruits and vegetables in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 37, 6606-6611, 2012.
- VIEGAS DE SOUZA, R. H. F.; TAKAKI, M.; DE OLIVEIRA PEDRO, R.; GABRIEL, J. S., TIERA, M. J.; TIERA, V. A. O. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Molecules* (Basel. Online), 18, 4437-4450, 2013
- WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxication of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiology Letters*, 314, 164–169, 2011.
- WYDRO, P.; KRAJEWSKA, B.; HĄC-WYDRO, K. chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan – lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8, 8, 2611-2617, 2007.
- XU, T.; XIN, M.; LI, M.; HUANG, H.; ZHOU, S. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 81, 931-936, 2010.
- YANG, T. C. CHOU, C. C.; LI, C. F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 237-245, 2005.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55, 1, 27-55, 2003.
- ZANIN, M. H. A. *Preparação e caracterização de lipossomas com a superfície modificada com gangliosídios para uso em imunoterapia*. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química – Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2001.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395, 2002.
- ZHENG, L. Y., ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 4, 527-530, 2003.