

Juliana dos Santos Gabriel

**Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados
Anfifílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e
*Aspergillus parasiticus***

**São José do Rio Preto
2013**

Juliana dos Santos Gabriel

**Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados
Anfifílicos de Dietilaminoetil-Quitossana contra *Aspergillus flavus* e
*Aspergillus parasiticus***

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.

Orientador: Prof^ª Dr^a Vera Aparecida de Oliveira Tiera

**São José do Rio Preto
2013**

Gabriel, Juliana dos Santos.

Síntese, caracterização e atividade antifúngica de derivados Anfifílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* / Juliana dos Santos Gabriel. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2013.
102 f. : 38 il. ; 30 cm.

Orientador: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Quitosana. 2. Polímeros anfifílicos. 3. Biofungicidas. I. Tiera, Vera Aparecida de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 582.28

Juliana dos Santos Gabriel

**Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados
Anfifílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e
*Aspergillus parasiticus***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Química 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
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto-SP
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira
Professor Doutor
USP - São Carlos-SP

Dr. Luis Octávio Regasini
Doutor
UNESP – Araraquara-SP

São José do Rio Preto, 25 de janeiro de 2013.

Dedico este trabalho

A todos aqueles que sempre me apoiaram e acreditaram em meu trabalho,
contribuindo direta ou indiretamente para mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus pela força e pela companhia que me auxilia em todos os momentos da minha vida. Agradeço pelos obstáculos já ultrapassados, que me fizeram crescer tanto pessoal como profissionalmente e pela saudável vontade do que está por vir que me faz acreditar e buscar as realizações dos meus sonhos.

Aos meus pais pelo amor, pela compreensão, pela paciência e ensinamentos. Eles estiveram e estão comigo em todos os momentos, fazendo do amor um suporte para me manter em pé mesmo em tempos difíceis.

Aos meus irmãos por todo carinho, companheirismo e por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos. Com eles entendi que a alegria é o melhor combustível para prosseguir em longas jornadas.

Ao Airton Juliano Damaceno pelo carinho, companheirismo e paciência que tornaram as lutas diárias muito mais fáceis de serem vencidas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Vera Tiera, pela dedicação, paciência, amizade e disponibilidade desde o estágio básico.

Ao Prof. Dr. Marcio Tiera pela colaboração e amizade, deixando os dias de trabalho muito mais agradáveis.

A todos meus amigos, principalmente àqueles do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, pela força, motivação, paciência e colaboração.

A FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes."

Martin Luther King

RESUMO

No presente trabalho foi realizada a síntese e caracterização de derivados de quitosana que tiveram suas atividades antifúngicas testadas contra os fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. As quitosanas utilizadas nas sínteses foram obtidas da desacetilação heterogênea de quitosana comercial e da quitosana comercial de média massa molecular. Os graus médios de desacetilação ($\overline{GD}$) da quitosana desacetilada (CH) e da quitosana de média massa molecular desacetilada (CHm) foram determinados pelas técnicas de Potenciometria e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H). Parte da quitosana desacetilada CH foi degradada para obtenção de polímeros de baixa massa molecular (CHD). As massas moleculares médias das quitosanas CHm, CH e CHD foram determinadas por viscosimetria e os valores obtidos foram 42,93 kDa, 15,22 kDa e 610,79 Da, respectivamente. Os derivados hidrofílicos foram obtidos pela reação das quitosanas CHm, CH e CHD com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE). Os graus de substituição (GS) de grupos DEAE de CHm, CH e CHD foram determinados utilizando-se RMN-H e os valores obtidos foram 14, 30 e 43%, respectivamente. Na sequência, as quitosanas CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE foram alquiladas com dodecil aldeído seguido pela redução com cianoboroidreto de sódio, obtendo-se derivados com diferentes graus de substituição. Os graus de substituição por grupos dodecila (GDD) para a quitosana contendo 14% de grupos DEAE foram 2,5, 10 e 14%. Para a quitosana com 30% de DEAE os graus de substituição por dodecila foram 2,7, 10 e 19%. Para o derivado contendo 43% de DEAE os graus de substituição por dodecila foram 5, 28 e 39%. Além da Espectroscopia de RMN-H o sucesso da obtenção dos derivados anfifílicos também foi indicado por meio da Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV). O comportamento associativo dos derivados anfifílicos foi estudado utilizando Espectroscopia de Fluorescência. Os resultados mostraram que em baixas concentrações os derivados anfifílicos se auto-associam para formar domínios

hidrofóbicos. A agregação ocorre a partir de uma concentração de agregação crítica (CAC) que depende da massa molecular e do grau de substituição dos grupos hidrofóbicos presentes na estrutura polimérica. A atividade antifúngica dos derivados das séries CHm, CH e CHD contra *A. flavus* e a atividade antifúngica dos derivados da série CHm contra o fungo *A. parasiticus* foram avaliadas em diferentes concentrações. Os resultados microbiológicos demonstraram a eficiência dos derivados de quitosana como biofungicidas sendo observado ainda o aumento da atividade antifúngica dos polímeros com a diminuição da massa molecular e aumento da concentração do polímero. A análise das células fúngicas por meio da Microscopia Confocal de Fluorescência à Laser mostrou a existência de interações entre a quitosana e as hifas dos fungos, não sendo possível concluir se o polímero interage também com os constituintes intracelulares dos micro-organismos estudados.

Palavras-chave: quitosana, derivados anfifílicos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*.

ABSTRACT

*In this study, it was done the synthesis and characterization of chitosan derivatives, that had their antifungal activity tested against **Aspergillus flavus** and **A. parasiticus**. The chitosan used for the syntheses was obtained from heterogeneous deacetylation of the commercial chitosan and commercial chitosan of average molecular mass. The average degrees of deacetylation ($\overline{GD}$) of chitosan (CH) and deacetylated chitosan of medium molecular weight (CHm) were determined by Potentiometry and techniques Spectroscopy Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR). Part of deacetylated chitosan CH was degraded to obtain low molecular weight polymers (CHD). The average molecular weights of chitosans CHm, CH and CHD were determined by viscometry, and the values obtained were 42.93 kDa, 15.22 kDa and 610.79 Da, respectively. Hydrophilic derivatives were obtained by reaction of chitosan CHm, CH, CHD with chloride 2-chloro-N,N-diethylaminoethyl (DEAE). The degrees of substitution (DS) by DEAE groups of CHm, CH and CHD were determined by H-NMR and the values obtained were 14, 30 and 43%, respectively. After that the chitosans CHm14DEAE, CH30DEAE and CHD43DEAE were alkylated with dodecyl aldehyde followed by reduction with sodium cyanoborohydride to yield derivatives with different degrees of substitution. The degrees of substitution by dodecyl groups (GDD) for the chitosan containing 14% of DEAE groups were 2.5, 10 and 14%. For chitosan with 30% of DEAE the degrees of substitution by dodecyl groups were 2.7, 10 and 19%. For the derivative containing 43% of DEAE the degrees of substitution by dodecyl groups were 5, 28 and 39%. Besides H-NMR spectroscopy success of obtaining amphiphilic derivatives has also been indicated by means of Absorption Spectroscopy in the Infrared (IR). The amphiphilic associative behavior of the derivatives was studied by Fluorescence Spectroscopy. The results showed that at low concentrations amphiphilic derivatives self-associate to form hydrophobic domains. The aggregation occurs from a critical aggregation concentration (CAC) which depends on the molecular*

weight and degree of substitution of hydrophobic groups present on the polymer structure. The antifungal activity of derivatives CHm, CH and CHD serials against the fungus *A. flavus* and antifungal activity of derivatives CHm serial against the fungus *A. parasiticus* was evaluated at different concentrations. The microbiological results demonstrated the effectiveness of chitosan derivatives as biofungicides still being observed increased antifungal activity of the polymers with decreasing molecular weight and increasing concentration of the polymer. Analysis of fungal cells by Confocal Fluorescence Microscopy showed the existence of interactions between chitosan and the cells of fungi, it was not possible to conclude whether the polymer also interacts with the intracellular constituents of the microorganisms studied.

Keywords: chitosan, amphiphilic derivatives, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parariticus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura da quitosana ($x \geq y$) e quitina ($x < y$).	25
Figura 2. Estrutura química das aflatoxinas.....	29
Figura 3. Esquema ilustrativo da rota de síntese utilizado na obtenção dos derivados anfífilos de quitosana de diferentes massas moleculares.....	35
Figura 4. Esquema representativo do viscosímetro utilizado na determinação da massa molar média viscosimétrica dos polímeros.	38
Figura 5. Esquema ilustrativo da formação de agregados de quitosana possibilitado pela presença de grupos hidrofóbicos na cadeia do polímero.	39
Figura 6. Estrutura molecular do pireno.	40
Figura 7. Esquema ilustrativo da interação do pireno com a porção hidrofóbica do derivado de quitosana na formação de agregado.	40
Figura 8. Espectro de emissão do pireno em solução tampão de ácido acético/acetato de sódio	41
Figura 9. Esquema da quitosana ligada covalentemente a rodamina.....	46
Figura 10. Esquema do mecanismo de reação da desacetilação da quitosana em meio básico.....	47
Figura 11. Gráficos da titulação potenciométrica das quitosanas desacetiladas CHm (a) e CH (b).....	49
Figura 12. Espectros de RMN-H das quitosanas CHm (a) e CH (b) em D ₂ O/DCI a 70 °C.	51
Figura 13. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas comercial (CC) e desacetilada (CH).....	53
Figura 14. Curva da $\eta_{sp}/\text{concentração}$ <i>versus</i> concentração para a quitosana CHm.	54
Figura 15. Curva da $\eta_{sp}/\text{concentração}$ <i>versus</i> concentração para a quitosana CH	55
Figura 16. Curva da $\eta_{sp}/\text{concentração}$ <i>versus</i> concentração para a quitosana CHD.	55

Figura 17. Esquema geral para a síntese de derivados anfifílicos de quitosana. .	57
Figura 18. Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE	58
Figura 19. Esquema do mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos derivados anfifílicos de quitosana.	60
Figura 20. Espectros de RMN-H dos derivados de quitosana CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE.....	61
Figura 21. Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas CH e CHm14DEAE.	62
Figura 22. Espectros de RMN-H das quitosanas modificadas CH-DD, CHm14DEAE2,5DD, CH14DEAE10DD, CH14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD e CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD.	65
Figura 23. Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas CH e CH-DD.....	66
Figura 24. Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas CH, CHm14DEAE, CH-DD e CHm14DEAE14DD.	67
Figura 25. Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas CH, CHm14DEAE, CH-DD e CH30DEAE19DD	67
Figura 26. Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas CH, CHm14DEAE, CH-DD e do derivado CHD43DEAE39DD	68
Figura 27. Esquema representativo da estrutura química dos derivados anfifílicos catiônicos de quitosana obtidos.....	69
Figura 28. Gráfico da razão I/III do espectro de fluorescência de pireno em função da concentração de CH30DEAE10DD	70
Figura 29. Gráficos da razão I/III do espectro de fluorescência de pireno em função das concentrações de CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD.	72
Figura 30. Índice de inibição em porcentagem para o fungo <i>A. flavus</i> para as quitosanas CC, CH, CHD e CHm em concentrações crescentes.	75

Figura 31. Índice de inibição para o fungo <i>A. flavus</i> para as quitosanas CH, CH30DEAE, CHD, CHD43DEAE, CHm e CHm14DEAE em concentrações crescentes.	76
Figura 32. Índice de inibição para o fungo <i>A. flavus</i> para as diferentes quitosanas anfifílicas e concentrações	76
Figura 33. Imagens do ensaio microbiológico com o polímero CHD43DEAE28DD contra o fungo <i>A. flavus</i>	84
Figura 34. Índice de inibição para o fungo <i>A. parasiticus</i> para série de quitosanas de média massa molecular	85
Figura 35. Imagens do ensaio microbiológico com o polímero CHm14DEAE2,5DD contra o fungo <i>A. parasiticus</i>	86
Figura 36. Índice de inibição em porcentagem para o fungo <i>A. flavus</i> para o derivado de quitosanas CH-DD em concentrações crescentes.	88
Figura 37. Índice de inibição em porcentagem para o fungo <i>A. parasiticus</i> para o derivado de quitosanas CH-DD em concentrações crescentes.	89
Figura 38. Imagens das lâminas contendo as células dos fungos <i>A. flavus</i> na e <i>A. parasiticus</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.....	32
Tabela 2. Valores de massa, volumes de hidróxido de sódio e graus médios de desacetilação das quitosanas determinados por potenciometria e RMN-H.	52
Tabela 3. Valores de concentração, tempo médio de escoamento e viscosidade específica para as quitosanas CHm, CH e CHD.	54
Tabela 4. Valores de $\bar{M}_v$ e $[\eta]$ para as quitosanas CHm, CH e CHD.	56
Tabela 5. Valores das razões molares DEAE/NH ₂ e GS para as quitosanas CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE.	61
Tabela 6. Valores das razões molares dodecil/NH ₂ e do GDD de dodecila para os derivados de quitosana.	68
Tabela 7. Concentração de Agregação Crítica dos derivados de quitosana por fluorescência.	73
Tabela 8. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 600,79 Da.	78
Tabela 9. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 15,22 kDa.	79
Tabela 10. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 42,93 kDa.	80
Tabela 11. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 42,93 kDa contra o fungo <i>A. parasiticus</i>	87

Tabela 12. Índices de Inibição dos fungos <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> em presença do polímero CH-DD.....	88
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA - Batata Dextrose Ágar

CAC - Concentração de Agregação Crítica

CC - Quitosana comercial

CH - Quitosana desacetilada

CH-DD - Quitosana desacetilada contendo 3% de grupos dodecila

CHm - Quitosana desacetilada de média massa molecular

CHm14DEAE - Quitosana desacetilada de média massa molecular contendo 14% de grupos DEAE

CHm14DEAE2,5DD - Quitosana desacetilada de média massa molecular contendo 14% de grupos DEAE e 2,5% de grupos dodecila

CHm14DEAE10DD - Quitosana desacetilada de média massa molecular contendo 14% de grupos DEAE e 10% de grupos dodecila

CHm14DEAE14DD - Quitosana desacetilada de média massa molecular contendo 14% de grupos DEAE e 14% de grupos dodecila

CH30DEAE - Quitosana desacetilada e não degradada contendo 30% de grupos DEAE

CH30DEAE2,7DD - Quitosana desacetilada e não degradada contendo 30% de grupos DEAE e 2,7% de grupos dodecila

CH30DEAE10DD - Quitosana desacetilada e não degradada contendo 30% de grupos DEAE e 10% de grupos dodecila

CH30DEAE19DD - Quitosana desacetilada e não degradada contendo 30% de grupos DEAE e 19% de grupos dodecila

CHD - Quitosana desacetilada e degradada

CHD43DEAE - Quitosana desacetilada e degradada contendo 43% de grupos DEAE

CHD43DEAE5DD - Quitosana desacetilada e degradada contendo 43% de grupos DEAE e 5% de grupos dodecila

CHD43DEAE28DD - Quitosana desacetilada e degradada contendo 43% de grupos DEAE e 28% de grupos dodecila

CHD43DEAE39DD - Quitosana desacetilada e degradada contendo 43% de grupos DEAE e 39% de grupos dodecila

DEAE - cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina

IV - Espectroscopia no Infravermelho

$\overline{GD}$ - Grau Médio de Desacetilação

GDD - Grau de Substituição de grupos dodecila

GS - Grau de Substituição de grupos DEAE

RMN-H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Quitosana	24
1.2. O gênero <i>Aspergillus</i>	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivos gerais.....	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1. Reagentes	32
3.2. Sínteses.....	32
3.2.1. Reação de desacetilação da quitosana.....	32
3.2.2. Reação de degradação da quitosana.....	33
3.2.3. Síntese da quitosana substituída com cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietilaminoetila (DEAE).....	34
3.2.4. Síntese dos derivados de quitosana dodecilados.....	34
3.3. Caracterização dos derivados de quitosana.....	36
3.3.1. Titulação potenciométrica.....	36
3.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H).....	36
3.3.3. Espectroscopia no infravermelho.....	37
3.3.4. Determinação da massa molar média ($\bar{M}_v$) por viscosidade.....	37
3.4. Estudo das propriedades anfifílicas.....	39
3.4.1. Espectrofotometria de fluorescência molecular	39
3.5. Ensaio microbiológicos	42

3.5.1. <i>Aspergillus flavus</i>	42
3.5.2. <i>Aspergillus parasiticus</i>	42
3.5.3. Preparo da suspensão de conídios	43
3.5.4. Preparação das amostras	43
3.5.4.1. Preparo das soluções estoque dos polímeros	43
3.5.4.2. Preparo das misturas polímeros-BDA	43
3.5.5. Controle do crescimento dos micro-organismos	44
3.6. Tratamento estatístico	44
3.7. Microscopia confocal de fluorescência à laser	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Caracterizações da quitosana desacetilada	47
4.1.1. Potenciometria	48
4.1.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)	50
4.1.3. Espectroscopia no infravermelho	52
4.2. Determinação da massa molar viscosimétrica média	53
4.3. Preparação e caracterização de derivados de quitosana	56
4.3.1. Sínteses dos derivados	56
4.3.2. Caracterização dos derivados de quitosana	60
4.3.2.1. Caracterização dos derivados hidrofílicos de quitosana	60
4.3.2.2. Determinação do grau de substituição (GDD) por grupos dodecila <i>N</i> -substituídos	62
4.4. Estudo da auto-associação das quitosanas anfifílicas em solução aquosa	69
4.4.1. Espectrofotometria de fluorescência	69
4.5. Eficiência dos agentes antifúngicos contra o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	74
4.5.1. Efeito da concentração do agente antifúngico na inibição do crescimento do fungo <i>A. flavus</i>	74

4.5.2. Efeito da massa molecular na atividade antifúngica da quitosana e seus derivados contra o fungo <i>A. flavus</i>	81
4.6. Eficiência dos agentes antifúngicos contra o fungo <i>Aspergillus parasiticus</i>	84
4.6.1. Efeito da concentração do agente antifúngico na inibição do crescimento do fungo <i>A. parasiticus</i>	84
4.7. Estudo do efeito da presença de grupos dodecila na quitosana	87
4.8. Microscopia confocal de fluorescência à laser.....	89
5. CONCLUSÃO	91
6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO	92
7. REFERÊNCIAS	93
8. APÊNDICE	100

1. INTRODUÇÃO

Quitosana é um polímero policatiônico natural, não tóxico, biocompatível e de baixo custo que pode ser obtido quimicamente por meio da desacetilação da quitina ou por meio de processos microbiológicos, nos quais micro-organismos que contenham quitina e quitosana em suas estruturas celulares são cultivados em larga escala como fonte alternativa para a obtenção desses polímeros (AL-HETAR et al., 2011). A quitina é um abundante polímero presente em fontes naturais e renováveis como exoesqueletos de crustáceos (caranguejos, camarões e lagostas), na parede celular de alguns fungos e em outros organismos vivos (CAMPANA-FILHO e SIGNINI, 2001, MOURA et al., 2006 e AZEVEDO et al., 2007). Atualmente, a indústria pesqueira é responsável pelo descarte de grandes volumes de carapaças de crustáceos causando impacto ambiental negativo nos locais onde são gerados e/ou estocados o que faz necessária a reutilização desse material (AZEVEDO et al., 2007).

A possibilidade de produção de diversos derivados de quitosana por meio de reações químicas, em que são inseridos diferentes grupos funcionais à cadeia polimérica, confere à quitosana diferentes propriedades e, consequentemente, diferentes aplicações. As principais áreas de aplicação da quitosana são: agricultura (no desenvolvimento de agroquímicos), tratamento de água (como agente floculante para clarificação da água, para a remoção de íons metálicos, como polímero ecológico e para a redução de odores), indústria de cosméticos (como agente esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar e creme dental), indústria farmacêutica, indústria biomédica (para a liberação controlada de fármacos, encapsulamento de materiais, reconstituição óssea, implantes dentários, lentes de contato, entre outros) e indústria alimentícia (como fibras dietéticas, agente redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida, bactericida e recobrimento de frutas) (AZEVEDO et al., 2007).

Em particular, a atividade da quitosana e de seus derivados como agente antimicrobiano contra diferentes grupos de micro-organismos tem sido alvo de diversas pesquisas (JUNG et al., 1999, KUMAR, 2000, GUO et al., 2008;

ZHANG et al., 2009 e BENHABILES et al., 2012). A atividade antifúngica da quitosana é uma interessante alternativa à utilização de agroquímicos para o controle de pragas (COTA-ARRIOLA et al., 2011). Estudos demonstraram a atividade antimicrobiana da quitosana contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Colletotricum gloeosporioides*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* (COTA-ARRIOLA et al., 2011 e KUMAR, 2000) lesionando a membrana celular microbiana e alterando a morfologia de fungos. Segundo Cota-Arriola e colaboradores (2011), tem sido demonstrada a inibição da produção de aflatoxinas, substâncias metabólicas tóxicas ao homem e aos animais, de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* pela quitosana.

Segundo Benhabiles et al. (2012), a ação antimicrobiana da quitosana é extremamente dependente de suas características físicas, de sua massa molecular e de seu grau de desacetilação. O elevado grau de desacetilação da quitosana confere a ela maior atividade antifúngica (BENHABILES et al., 2012). Alguns estudos ainda 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 et al., 2006). Dentro deste contexto, o presente trabalho apresenta o estudo da atividade antifúngica da quitosana e de seus derivados anfifílicos catiônicos de diferentes massas molares viscosimétricas contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*.

1.1. Quitosana

A quitina, segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, que foi isolado pela primeira vez em 1881 por Braconnot (CAMPANA-FILHO, 2007), é um biomaterial de coloração branca, duro e de cadeia rígida, conferindo ao polímero resistência biomecânica. Sua fase cristalina é ordenada com cadeias organizadas em folhas paralelas, ocorrendo nas formas α , β e γ . Essas três diferentes formas ocorrem devido a disposição relativa das extremidades redutora e não-redutora e são essas variações as responsáveis pelas diferentes propriedades

dos domínios cristalinos. Essas estruturas polimórficas estão relacionadas a diferentes funções nos organismos. A forma mais comum e estável dentre as três variações é a α quitina. Ela possui cadeias poliméricas antiparalelas, o que favorece a formação de ligações de hidrogênio e resulta em um empacotamento denso do polímero. Esse fato permite que a α quitina seja encontrada em regiões que exigem maior resistência, como por exemplo, cutículas de artrópodes (CAMPANA-FILHO, 2007).

A quitina ocorre naturalmente com um reduzido grau de desacetilação, sendo insolúvel na maioria dos solventes e limitando sua aplicação industrial. O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) é o parâmetro que define a quantidade de grupos amino livres no polissacarídeo em relação aos grupos da cadeia (DAMIAN et al., 2005). Quando o grau médio de desacetilação da quitina atinge 50% ou mais, o biopolímero torna-se solúvel em solução aquosa ácida e passa a ser denominado de quitosana (SILVA et al., 2006 e AZEVEDO et al., 2007).

Os copolímeros quitosana e quitina são constituídos por proporções variadas de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no polímero quitosana, enquanto que a quitina é composta predominantemente por grupos acetoamido (Figura 1) (SILVA et al., 2006 e AZEVEDO et al., 2007). Esses dois polissacarídeos apresentam uma cadeia polimérica quimicamente similar à da celulose, exceto pela substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamido ou grupos amino.

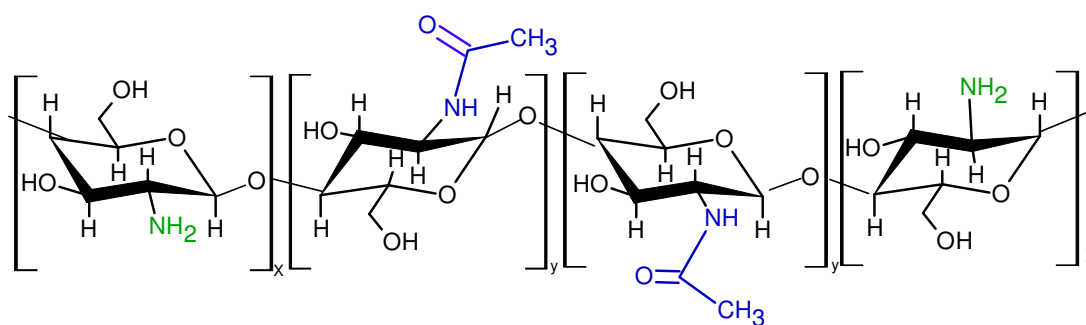


Figura 1. Esquema da estrutura da quitosana ($x \geq y$) e quitina ($x < y$).

Além da diferença estrutural entre os polímeros de quitosana e quitina outra diferença existente é a solubilidade da quitosana em ácidos orgânicos diluídos como o ácido acético, cítrico, lático, fórmico, além de sua solubilidade em ácidos inorgânicos. A propriedade de solubilização da quitosana está diretamente relacionada ao número de grupos amino presentes na estrutura, que podem ser protonados ($-\text{NH}_3^+$) aumentando essa propriedade em meio aquoso. Esse comportamento é decorrente, principalmente, da repulsão eletrostática e do aumento da solvatação das cadeias (MATHUR e NARANG, 1990).

De acordo com o grau médio de desacetilação, diversas quitosanas podem ser obtidas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade.

Propriedades, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, atoxicidade, bioadesividade, propriedades de absorção, capacidade antimicrobiana, capacidade de formar membranas e poder hemostático têm contribuído para a ampla divulgação e investigação da quitosana como biomaterial (MOURA, 2012). Além disso, a presença de grupos funcionais (aminas e hidroxilas) pode promover a derivatização química das moléculas ou a sua ligação a grupos específicos. Assim, o biopolímero pode ser quimicamente modificado alterando suas propriedades físico-químicas e aplicabilidade.

Dentre as diferentes aplicações da quitosana destaca-se a sua capacidade de inibir o crescimento de alguns fungos, sendo eficaz na inibição da germinação de esporos e do seu crescimento radial. Segundo Goy et al. (2009), muitos estudos utilizando quitosana como agente antifúngico têm sido realizados, na maioria deles o biopolímero é aplicado contra leveduras e fungos associados a alimentos e deterioração de plantas. Para esses, a quitosana é responsável pela ativação de vários processos biológicos no tecido vegetal onde quitinases são induzidas sobre o parasita (GOY et al., 2009).

O mecanismo de ação da quitosana contra fungos envolve a interação do biopolissacarídeo com a parede celular do micro-organismo interferindo diretamente em seu crescimento (GOY et al., 2009). Além disso, estudos relatam

que oligômeros de quitosana se difundem dentro das hifas fúngicas interferindo na atividade das enzimas responsáveis pelo crescimento do fungo (GOY et al., 2009). Ainda segundo Goy et al. (2009), a intensidade de ação de degradação da parede celular dos fungos é dependente do pH do meio, do grau de desacetilação da quitosana e da concentração desse polímero.

A possibilidade de modificação da estrutura química da quitosana permite o aumento da solubilidade do polímero em meio aquoso e pode potencializar a interação entre o micro-organismo e o polímero. Silva et al. (2006), em seu estudo sobre derivados hidrossolúveis de quitosana para aplicações farmacêuticas, destacou que muitos derivados vêm sendo sintetizados ao longo dos anos, sendo obtidos, por exemplo, sais quaternários de quitosana e *N*-carboximetila quitosana que são solúveis em toda faixa de pH, além de outros derivados como *N*-carboxibutilquitosana e 5-metilpirrolidinona quitosana solúveis em água. Kong et al. (2010), em sua revisão sobre as propriedades antimicrobianas da quitosana e seu modo de ação, afirma que a síntese de derivados de quitosana hidrossolúveis se tornou o objetivo central do estudo da atividade antimicrobiana da quitosana que inclui reações de alquilação, quaternização e reações com metais. Recentemente, em nosso laboratório, estudos com derivados quaternários de quitosana mostraram que a substituição com grupos pentiltrimetilamônio resultou em maiores índices de inibição contra o fungo *A. flavus* do que aqueles obtidos com propiltrimetilamônio, o que foi atribuído ao aumento da hidrofobicidade (PEDRO, 2013). Esses resultados nos instigaram a estudar o efeito da hidrofobicidade dos polímeros na atividade antifúngica contra *A. flavus* e *A. parasiticus*.

1.2. O gênero *Aspergillus*

O *Aspergillus flavus*, pertencente ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família Trichomaceae (KIRK et al., 2008), possui como característica o desenvolvimento de colônias esverdeadas,

quando na fase inicial e acinzentadas com a idade (PITT e HOCKINF, 1997, apud REIS, 2009). O *Aspergillus parasiticus* está agrupado na seção Flavi, assim como o *A. flavus*, além de outras variações toxicogênicas como *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii*, e *A. bombycis* (KLICH e PITT 1988; CHANG et al., 2007).

O gênero *Aspergillus*, grupo de um número muito grande de fungos assexuados, são os principais contaminantes de produtos armazenados, alimentos e rações e podem ser encontrados em uma grande variedade de habitats.

Dentre todos *Aspergillus*, o mais comumente associado à contaminação de milho, castanhas, amendoim, trigo, nozes, algodão, entre outros, é a espécie *A. flavus* devido à produção de conídios (estruturas de reprodução assexuada) que permitem a sobrevivência do fungo mesmo em condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento e de sua capacidade de se desenvolver a temperatura de 37 °C. Outra espécie bastante envolvida na contaminação de grãos é a *A. parasiticus* (CHANG e ENRLICH, 2010).

A contaminação dos produtos por esses organismos pode ocorrer no campo, nos períodos de pré e/ou pós-colheita, no transporte, processamento e armazenamento do produto e pode resultar na produção de micotoxinas pelos fungos. Micotoxinas são substâncias metabólicas secundárias, produzidas por alguns fungos, que são tóxicas para humanos e animais. O crescimento do micro-organismo não é dependente da produção desses metabólitos podendo ser esses relacionados à função de limitar uma possível competição existente no meio de crescimento do fungo. Assim, o desenvolvimento do fungo não implica na presença de micotoxinas no substrato da mesma forma que a ausência de sinais aparentes de contaminação não garanta a ausência de micotoxinas no produto, visto que essas substâncias podem permanecer no substrato mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (KAWASHIMA, 2004).

As micotoxinas produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* são denominadas aflatoxinas e podem ser B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, dentre outras. Elas formam um grupo de micotoxinas estruturalmente semelhantes (Figura 2) e são tóxicas ao homem e aos animais por apresentarem, dentre outros, toxicidade

aguda para o fígado, hepatocarcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão, efeito anticoagulante, anemia e diminuição da fertilidade (KAWASHIMA, 2004 e COPETTI et al., 2011). A contaminação humana pode se dar por meio do consumo de alimentos contaminados por micotoxinas ou por meio da ingestão de alimentos (carne, leite ou ovos) provenientes de animais que tenham sido alimentados com ração contaminada (MICOTOXINAS, 2009). Os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* são os principais responsáveis pela produção das aflatoxinas, que passaram a ser amplamente estudadas na década de 60 após a morte de mais de 100 mil perus, na Inglaterra, que consumiram ração contaminada oriunda da África e Brasil. (KAWASHIMA, 2004).

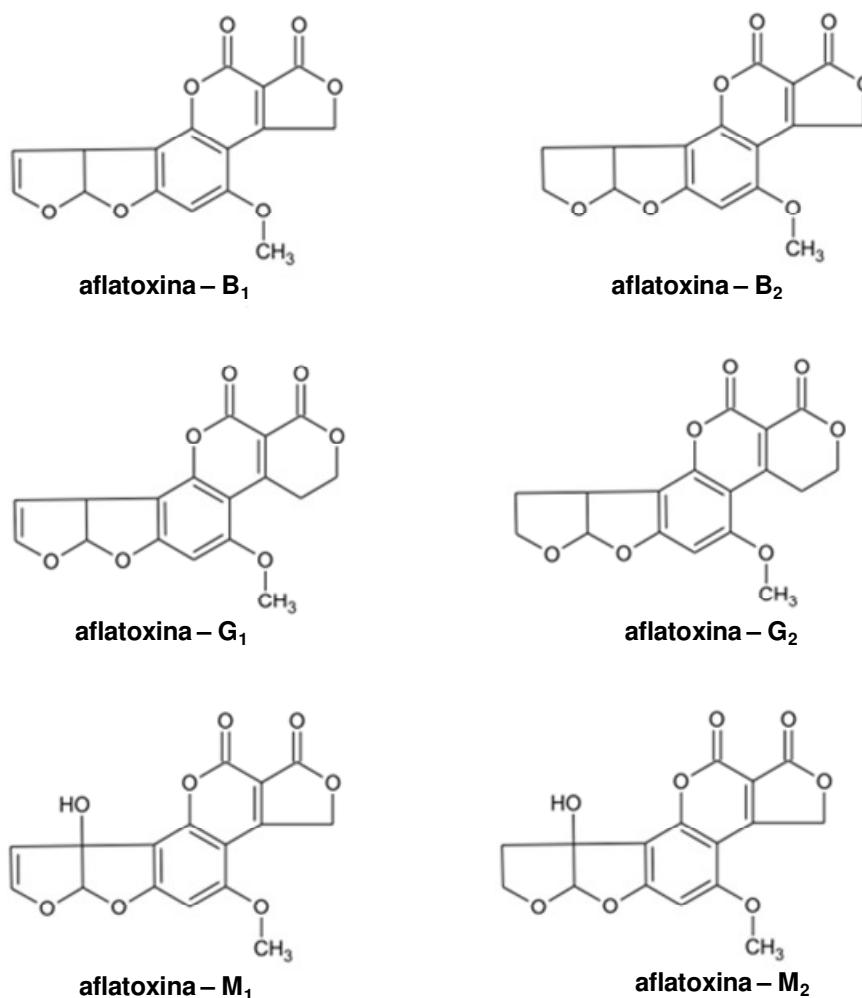


Figura 2. Estrutura química das aflatoxinas.

A aflatoxina B₁, frequentemente encontrada em alimentos, é produzida por todas as espécies produtoras de aflatoxinas e é considerada a mais tóxica do grupo das micotoxinas apresentando maior poder carcinogênico. A toxicidade das seis aflatoxinas segue a seguinte ordem: B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > M₂ = G₂ (MICOTOXINAS, 2009). Essas micotoxinas podem ser observadas sob luz ultravioleta (UV), fluorecendo nas colorações: B₁ e B₂ – azul, G₁ – verde, G₂ – verde-azulada, M₁ – azul-violeta e M₂ – violeta (MICOTOXINAS, 2009).

Segundo Cota-Arriola e colaboradores (2011), a produção de aflatoxina de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus* é inibida pela quitosana devido sua capacidade de complexação de metais essenciais ao metabolismo desses fungos e por meio da ativação de mecanismos de defesa em grãos pela indução da produção de compostos fenólicos.

Sabe-se que o uso indiscriminado de agrotóxicos, produtos químicos usados na agricultura, pecuária e mesmo em ambiente doméstico para o controle de pragas como insetos, fungos, ácaros, bactérias, vermes, dentre outros, causa danos tanto à saúde humana quanto a ecossistemas (CAVALCANTI, 2010). Segundo a Embrapa (2012), anualmente são consumidos mais de 300 mil toneladas de agrotóxicos no Brasil. Os efeitos do acúmulo dessas substâncias nos compartimentos água e solo e nos alimentos e organismos vivos podem resultar em contaminação de alimentos, poluição de rios, erosão de solos e desertificação, intoxicação do homem e extinção de animais. Visto a importância do controle do desenvolvimento dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* e a problemática envolvida no uso de antifúngicos tradicionais, o presente trabalho propõe a obtenção de diferentes derivados de quitosana para aplicação como agente antifúngico, minimizando os impactos negativos causados pela utilização dos antifúngicos tradicionais ao meio ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivos sintetizar, caracterizar e estudar o comportamento de derivados de dietilaminoetil-quitosana de diferentes massas molares em solução, avaliar suas atividades antifúngicas e estudar o mecanismo de ação desses derivados contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

2.2. Objetivos específicos

- i) Sintetizar e caracterizar polissacarídeos de diferentes massas molares viscosimétricas médias contendo proporções variadas de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos;
- ii) Estudar o comportamento dos derivados anfífilos de quitosana em solução aquosa, com ênfase na auto-associação;
- iii) Estudar a atividade antifúngica dos derivados de quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*;
- iv) Estudar o mecanismo de ação da quitosana sobre os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados na elaboração do trabalho estão listados na Tabela 1. A água utilizada nos experimentos foi desionizada em um sistema de purificação de água da Gahaka modelo DG.

Tabela 1. Reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Nome do reagente	Fabricante
acetona	Synth
ácido acético glacial	Synth
ácido clorídrico	Chemco
cianoboroidreto de Sódio	Fluka
cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina	Aldrich Chemical Co
cloreto de deutério	Aldrich Chemical Co
clorofórmio	Dinâmica
dodecil aldeído	Aldrich Chemical Co
etanol	Synth
hidróxido de sódio	Carlo Erba
nitrito de sódio	Synth
óxido de deutério	Aldrich Chemical Co
quitosana comercial	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda
quitosana de média massa molecular	Aldrich Chemical Co
Tween® 80	Synth

3.2. Sínteses

3.2.1. Reação de desacetilação da quitosana

O processo de desacetilação foi realizado com duas amostras de quitosanas comerciais de diferentes massas moleculares, a quitosana de média massa molecular (Aldrich Chemical Co) e a quitosana de baixa massa molecular (Polymar Ind. Com. Exp. Ltda).

Para o processo de desacetilação de cada amostra de quitosana comercial, 8,0 g do polissacarídeo foram dispersos em 400,0 mL de água desionizada, sob agitação magnética. Em seguida, a quitosana foi solubilizada pela adição de 7,5 mL de ácido acético glacial ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$). Verteram-se 200,0 mL de hidróxido de sódio (50% em massa) à solução sob agitação, em atmosfera de nitrogênio e sob aquecimento à aproximadamente 100°C . Após 1 hora e 30 minutos a reação foi interrompida e a suspensão foi transferida para um béquer contendo 4,0 litros de água desionizada a 70°C e sob agitação. O precipitado obtido foi decantado, lavado com água desionizada até pH neutro e isolado por filtração à vácuo. O processo de desacetilação foi repetido e após a filtração à vácuo a quitosana foi lavada com acetona e seca em estufa a 40°C por 72 horas. Triturou-se o polímero, utilizando um pistilo e almofariz, até a obtenção de pó (TIERA et al., 2006). As amostras de quitosana desacetiladas de média e de baixa massa molecular foram denominadas CHm e CH, respectivamente.

3.2.2. Reação de degradação da quitosana

A reação de degradação da quitosana foi realizada segundo o procedimento descrito por Tommeraas et al. (2001), por oxidação com nitrito de sódio em meio ácido. A massa de 5,2 g da quitosana CH foi dispersa em 294,0 mL de água desionizada sob agitação. Em seguida adicionaram-se 6,0 mL de solução de ácido acético 2% (v/v). Após a completa solubilização, a solução foi purgada com gás nitrogênio por 1 hora sob agitação constante e resfriada a 4°C . Em seguida, 16,0 mL de uma solução contendo 198,9 mg de nitrito de sódio foram adicionados. A agitação foi interrompida e a reação foi mantida a 4°C por 24 horas.

A quitosana degradada (CHD) foi separada da solução por precipitação com hidróxido de sódio concentrado seguido de centrifugação. Posteriormente a quitosana CHD foi lavada com água desionizada, metanol, centrifugada e seca em estufa a 50°C .

3.2.3. Síntese da quitosana substituída com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE)

As quitosanas desacetiladas de diferentes massas moleculares foram reagidas com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE) para a obtenção de derivados hidrofílicos de quitosana. O procedimento abaixo descreve as sínteses dos derivados contendo 30 e 43% de grupos DEAE. A massa de 2,7 g de quitosana foi dispersada em 112,5 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, 1,44 g de DEAE foram adicionados à solução de quitosana e o pH foi ajustado para 8,0 com adição de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹. A reação foi realizada sob agitação, a 65 °C, durante 2 horas, sendo o pH ajustado para 8,0 a cada 30 minutos. O produto foi purificado por diálise contra hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹, por 24 horas, e contra água desionizada por 3 dias utilizando-se membrana de diálise MWCO 3 kDa. Finalmente o produto foi recuperado por liofilização. O grau de substituição por grupos DEAE (GS) foi determinado por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H).

3.2.4. Síntese dos derivados de quitosana dodecilados

A alquilação consistiu em duas etapas, primeiramente a reação dos grupos amino da quitosana com dodecil aldeído para formação da base de Schiff, seguida da redução utilizando-se cianoboroidreto de sódio, como descrito por Desbrieres et al. (1996). O procedimento abaixo descreve a síntese do derivado contendo 28% de grupos dodecila. A massa de 0,8 g de quitosana foi solubilizada em 91,7 mL de ácido acético 2% (v/v) e 63,1 mL de etanol. O pH da solução foi ajustado para 5,1 e em seguida adicionou-se 0,1 mL de dodecil aldeído, sob agitação vigorosa. Após 1 hora sob agitação constante, adicionou-se cianoboroidreto de sódio na razão 3:1 (NaCNBH₃:NH₂ em mols). A mistura foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. A purificação dos derivados alquilados CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD,

CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CH43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD foi realizada por meio de diálise contra água desionizada por 3 dias, trocando-se a água de diálise 3 vezes ao dia. Em seguida fez-se a remoção do possível aldeído não reagido, por extração em sistema Soxhlet durante 48 horas a 60 °C, utilizando-se 250,0 mL de clorofórmio como solvente.

Para fins comparativos também foi sintetizado um derivado de quitosana contendo apenas grupamentos dodecila, ou seja, partindo-se da quitosana desacetilada CH foi obtido um derivado que não possui os grupos hidrofílicos DEAE, derivado esse nomeado de CH-DD. Os graus de substituição por grupos dodecila (GDD) foram determinados por RMN-H.

A Figura 3 apresenta um esquema ilustrativo que indica as reações e os polímeros inicial e final de cada processo realizado.

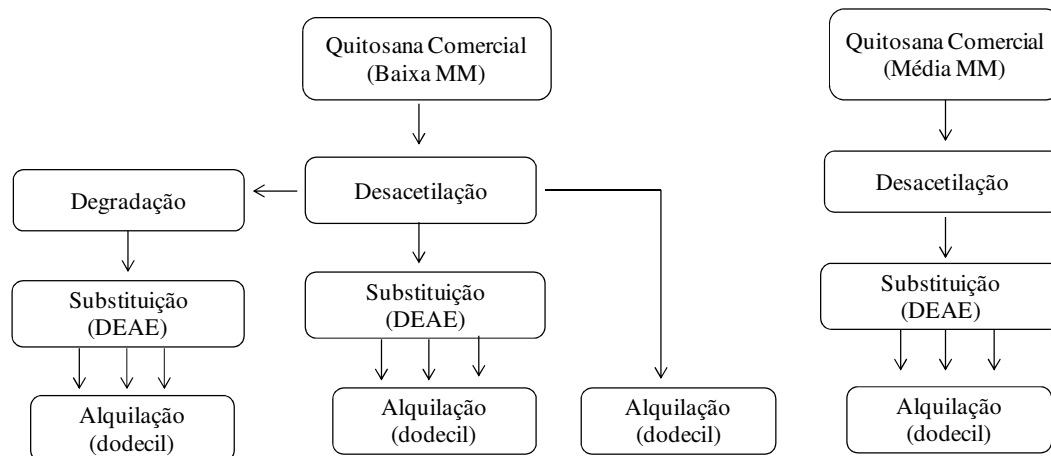


Figura 3. Esquema ilustrativo da rota de síntese utilizado na obtenção dos derivados anfífilos de quitosana de diferentes massas moleculares, na qual cada seta indica uma reação.

3.3. Caracterização dos derivados de quitosana

3.3.1. Titulação potenciométrica

A determinação do grau médio de desacetilação da quitosana por potenciometria foi realizada segundo o método de Tolaimate et al. (2000). O procedimento a seguir descreve a titulação potenciométrica da quitosana desacetilada CH. A massa de 40,0 mg da amostra, previamente seca na estufa a 50 °C até que atingisse massa constante, foi dissolvida em 10,0 mL de ácido clorídrico 0,093 mol L⁻¹. Em seguida, a solução resultante foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,099 mol L⁻¹. O pH foi monitorado durante a titulação utilizando-se um pHmetro Analion modelo PM 608 com eletrodo de vidro Ag/AgCl Digimed. Os resultados foram apresentados na forma de um gráfico de pH em função do volume de hidróxido de sódio. O gráfico da derivada primeira em função do volume da base ($\Delta\text{pH}/\Delta V$) foi utilizado para obter o volume de base necessário para desprotonar os grupos amino e assim calcular o $\overline{GD}$ (TOLAIMATE et al, 2000).

3.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)

As amostras para as análises de RMN-H foram preparadas pela dissolução de aproximadamente 20,0 mg dos polímeros em 1,0 mL de óxido de deutério com adição de 10,0 µL de cloreto de deutério para solubilização do polímero. A solução foi mantida sob agitação magnética até a completa solubilização. Os espectros de RMN-H foram obtidos no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, da marca Bruker de 500 MHz à temperatura de 70 °C, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

3.3.3. Espectroscopia no infravermelho

Neste trabalho, amostras sólidas dos polímeros estudados foram caracterizadas por IV, com diamante como elemento interno de reflexão, no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do Departamento de Química e Ciências Ambientais desta instituição. Aproximadamente 1,5 mg dos polímeros foram secos em estufa, a 60 °C, até que não houvesse variação de massa (para a total eliminação da umidade). Os espectros no infravermelho foram obtidos no Espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100.

3.3.4. Determinação da massa molar média ($\bar{M}_v$) por viscosidade

A propriedade mais importante de soluções poliméricas diluídas é a viscosidade intrínseca $[\eta]$, sendo frequentemente usada no controle da qualidade e caracterização molecular (AKCELRUD, 2007). Essa propriedade está relacionada ao tamanho da macromolécula e, portanto, à sua massa molar.

A viscosidade intrínseca pode ser definida por meio da utilização da equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 1)

$$[\eta] = K_m \bar{M}_v^a \quad (1)$$

em que K_m e a são constantes para determinada temperatura, tipo de polímero e solvente e encontram-se tabeladas para uma variedade de sistemas e $\bar{M}_v$ é a massa molar viscosimétrica média.

A medida da viscosidade foi feita utilizando-se viscosímetro capilar calibrado Cannon-Ubbelohde 9722M-50 (Cannon Instr. Co.) de diluição em série (Figura 4), em banho de água a temperatura de 25 °C. Inicialmente mediu-se o tempo de escoamento, entre os meniscos A e B, da solução tamponante ácido acético/acetato (0,3 mol L⁻¹/0,2 mol L⁻¹ e pH 4,5) e posteriormente mediu-se o

tempo de escoamento das soluções de quitosana no mesmo tampão, em concentrações decrescentes.

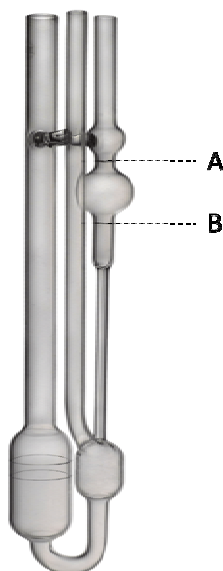


Figura 4. Esquema representativo do viscosímetro utilizado na determinação da massa molar média viscosimétrica dos polímeros (Adaptada de BCL® Indústria Argentina, 2012).

Por meio da equação 2,

$$\eta_{sp} = \frac{\bar{t} - \bar{t}_0}{\bar{t}_0} \quad (2)$$

na qual, $\bar{t}$ é o tempo médio de escoamento da solução e $\bar{t}_0$ é o tempo médio de escoamento do solvente puro, a viscosidade específica do polímero (η_{sp}) pode ser calculada. As viscosidades intrínsecas dos polímeros foram calculadas por meio da extrapolação para a concentração zero da curva do gráfico de η_{sp} /concentração *versus* concentração possibilitando a determinação da $\bar{M}_v$. Os valores da $\bar{M}_v$ da quitosana desacetilada de média massa molecular (CHm), quitosana desacetilada (CH) e da quitosana desacetilada degradada (CHD) foram obtidos pela equação 1, utilizando as constantes $K_m = 0,079$ e $a = 0,796$, constantes para quitosanas com grau de desacetilação próximos de 99% (KIM e CHUN, 1999).

3.4. Estudo das propriedades anfifílicas

3.4.1. Espectrofotometria de fluorescência molecular

A fluorescência molecular é um processo de fotoluminescência no qual as moléculas são excitadas pela absorção de um feixe de radiação eletromagnética, há então o relaxamento da espécie excitada para o estado fundamental, liberando seu excesso de energia como fótons.

Não são todas as moléculas que fluorescem. A fluorescência é favorecida em moléculas rígidas, pois a rigidez diminui a velocidade da relaxação não-radiativa da molécula excitada de modo que a relaxação por fluorescência tenha tempo suficiente para ocorrer. Substâncias que contenham anéis aromáticos apresentam emissão fluorescente mais intensa, entretanto compostos carbonílicos alicíclicos e alifáticos, bem como estruturas de ligações duplas altamente conjugadas também fluorescem (SKOOG et al., 2002).

A presença de grupos hidrofóbicos ligados à cadeia da quitosana permite a formação de agregados (Figura 5), que podem modificar algumas propriedades da solução como a viscosidade, tensão superficial e solubilidade. O comportamento dos agregados pode assemelhar-se ao de surfactantes e exibir uma concentração de agregação crítica (CAC) que é dependente do grau de substituição do ligante. A agregação de polímeros anfifílicos é dependente da estrutura e flexibilidade da cadeia polimérica, tamanho e/ou estrutura do grupo hidrofóbico e das interações intra e/ou intermoleculares (VIEIRA et al., 2003).

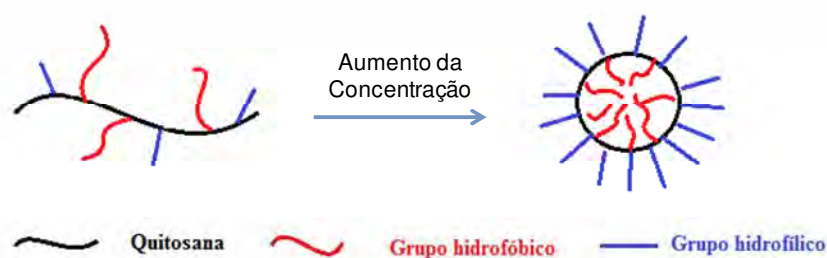


Figura 5. Esquema ilustrativo da formação de agregados de quitosana possibilitado pela presença de grupos hidrofóbicos na cadeia do polímero.

O estudo da auto-associação pode ser realizado fazendo-se uso de sondas fluorescentes, pois essas são capazes de fornecer informações do meio em que se encontram.

O pireno, um hidrocarboneto policíclico aromático (Figura 6), é um exemplo de sonda já bastante estudada que tem seu espectro de fluorescência influenciado pelo solvente. Por ser uma sonda hidrofóbica, o pireno interage com a porção hidrofóbica do derivado de quitosana, alocando-se dentro do agregado formado com o aumento da concentração, como ilustra a Figura 7.

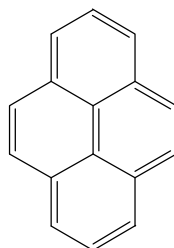


Figura 6. Estrutura molecular do pireno.

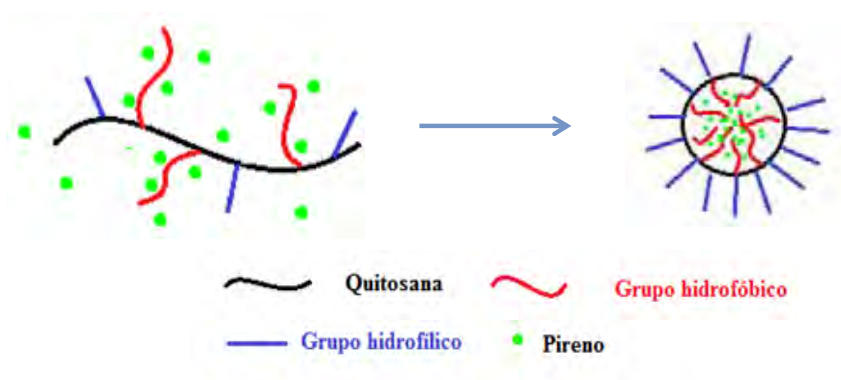


Figura 7. Esquema ilustrativo da interação do pireno com a porção hidrofóbica do derivado de quitosana na formação de agregado.

O espectro de emissão do pireno, Figura 8, apresenta cinco bandas vibrônicas principais bem resolvidas entre 370 e 400 nm, chamadas *I*, *II*, *III*, *IV* e *V*.

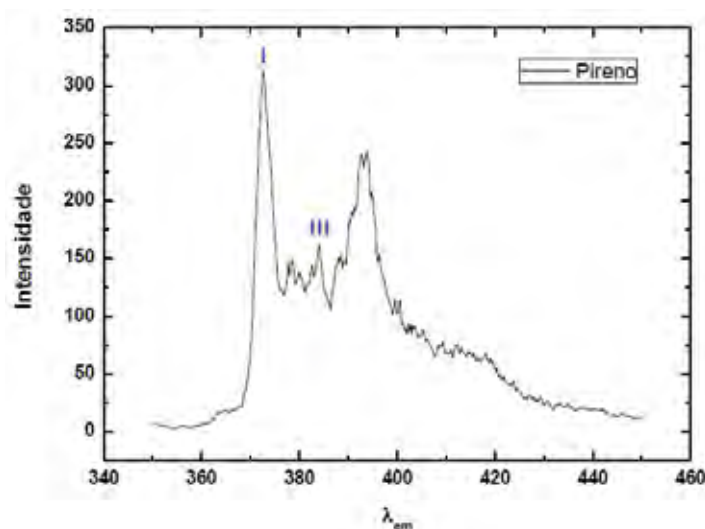


Figura 8. Espectro de emissão do pireno $1,04 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão de ácido acético ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$) / acetato de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em que os picos I e III são indicados (NASÁRIO, 2010).

A razão das intensidades de emissão entre os picos I e III (I/III), sendo que I e III correspondem respectivamente as intensidade dos picos 1 (372 nm) e 3 (384 nm) dos picos vibrônicos do espectro de fluorescência, pode ser usada como medida quantitativa da polaridade do solvente embora ela seja de difícil determinação com exatidão (SILVA, 2002). Nesta etapa o pireno foi utilizado como sonda para a avaliação das propriedades anfifílicas e capacidade de auto-associação dos derivados de quitosana.

Os estudos da auto-associação dos derivados anfifílicos de quitosana em meio aquoso foram realizados a 25°C no Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi do Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Química e Ciências Ambientais desta instituição, em solução tamponante ácido acético/acetato de sódio pH 5,1. A solução tamponante (concentração de 20 mmol L^{-1} e força iônica de 50 mmol L^{-1}) foi preparada pela dissolução de $110,0 \mu\text{L}$ de ácido acético glacial em aproximadamente $90,0 \text{ mL}$ de água desionizada. Para o ajuste da força iônica foram adicionados $0,2 \text{ g}$ de cloreto de sódio, o pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 2 mol L^{-1} e o volume completado para $100,0 \text{ mL}$. Com o auxílio de micro-seringa de $10,0 \mu\text{L}$ e sob agitação, as soluções estoques dos derivados de quitosana foram adicionadas à cubeta de quartzo, contendo solução

de pireno $7,5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ em solução tamponante. A razão I/III do espectro de fluorescência do pireno foi usada como medida da polaridade do meio. As análises de fluorescências foram realizadas em duplicata para amostras diferentes, o pireno foi excitado em 310 nm e o espectro de fluorescência registrado no intervalo de 350 a 400 nm.

3.5. Ensaaios microbiológicos

3.5.1. *Aspergillus flavus*

A cepa do fungo foi isolada, a partir de amendoim contaminado, pela Prof^a Teresa Cristina Castilho Gorayeb durante seu mestrado, no laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos nesta instituição. Depois de isolada, a cepa foi encaminhada ao Departamento de Análises Clínicas, Micologia Clínica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da UNESP/ Araraquara – SP, onde foi identificada positivamente.

Na identificação foi utilizado o método de exame direto da colônia com corante lactofenol azul algodão e também pela morfologia macroscópica (GORAYEB, 2007). A cepa do *A. flavus* CBMAI 0551 se encontra armazenada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI, em Campinas – SP.

3.5.2. *Aspergillus parasiticus*

A cepa do *Aspergillus parasiticus* CBMAI 0190 foi adquirida junto a Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/UNICAMP, em Campinas – SP.

3.5.3. Preparo da suspensão de conídios

Com o auxílio de uma alça metálica transferiu-se uma quantidade de conídios para um tubo tipo Eppendorf® contendo aproximadamente 1,5 mL de Tween® 80 a 0,1% e estéril. A suspensão foi agitada manualmente para a dispersão dos conídios. Posteriormente, 5,0 µL dessa solução foram transferidos, com auxílio de uma micro-pipeta com ponteira estéril, para o centro de cada placa de Petri, de 9,0 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) solidificado com as soluções de quitosana e para o BDA controle. Então as placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C.

3.5.4. Preparação das amostras

3.5.4.1. Preparo das soluções estoque dos polímeros

Soluções estoque de quitosana e seus derivados foram preparados pela solubilização de 0,18 g de polímero em 90 mL de ácido acético 1% (v/v), obtendo-se uma solução final de concentração de 2,0 g L⁻¹. Para os ensaios microbiológicos, alíquotas dessa solução estoque foram diluídas seriadamente, para concentrações previamente estabelecidas, em ácido acético 1% (v/v) de modo que o volume final das soluções diluídas fosse 50,0 mL e o pH foi ajustado para 4,9 com adição de solução concentrada de hidróxido de sódio.

3.5.4.2. Preparo das misturas polímeros-BDA

As soluções de BDA foram preparadas em erlenmeyers adicionando-se aproximadamente 3,9 g do meio de cultura em 50 mL de água desionizada. Os erlenmeyers foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos e as soluções de quitosana, preparadas de acordo com o item 3.5.4.1, permaneceram sob luz UV

durante aproximadamente 30 minutos. Em seguida as soluções de quitosana foram vertidas nos erlenmeyers contendo BDA para obtenção de concentrações finais de 1,0, 0,5, 0,1, 0,05 g L⁻¹ de quitosana. O BDA controle foi preparado seguindo a descrição acima substituindo a solução de quitosana por 50,0 mL de solução de ácido acético 1% (v/v) com pH ajustado para 4,9.

3.5.5. Controle do crescimento dos micro-organismos

A inibição do crescimento do fungo pelos diferentes polímeros foi determinada na placa de Petri contendo o meio de cultura BDA. Com o auxílio de um paquímetro milimetrado mediu-se o crescimento radial da colônia nos terceiro, quinto e sétimo dias de incubação. Os resultados obtidos no sétimo dia de incubação foram utilizados para fins comparativos. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para a mesma amostra, para cada concentração estudada, e assim, as medidas foram feitas também em quadruplicata.

Para análise da eficiência da quitosana na de inibição do crescimento fúngico calculou-se o índice de inibição de acordo com o proposto por Guo et al. (2008) (equação 3).

$$\text{Índice de inibição (\%)}: \left(\frac{1 - D_a}{D_b} \right) \times 100 \quad (3)$$

Na qual, D_a é o diâmetro da colônia das placas contendo quitosana e D_b é o diâmetro das placas contendo BDA controle.

3.6. Tratamento estatístico

Para a avaliação estatística da atividade antifúngica das quitosanas foram utilizadas estatísticas descritivas como cálculo de média, desvio padrão, mediana e valores de mínimo e máximo para os índices de inibição. As medianas foram comparadas por meio do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn devido

ao pequeno número de unidades experimentais. Para valores p inferiores a 0,05, as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas. Os cálculos estatísticos foram realizados com a utilização dos programas MINITAB® 16.0 e Prism® 5.04.

Um teste não paramétrico utilizado para testar se as amostras pequenas são oriundas de uma mesma distribuição é o teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis. Esse teste é utilizado para comparação de duas amostras independentes e sua estatística de teste é dada pela equação 4.

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{(R_j)^2}{n_j} - 3(N+1) \quad (4)$$

Na qual, N corresponde ao número total de observações, k corresponde ao número de amostras, n_j corresponde ao número de observações na j -ésima amostra e R_j corresponde a soma dos postos da j -ésima amostra.

A ocorrência de resultados significativos para o teste de Kruskal-Wallis indica que pelo menos uma das amostras é diferente das demais, entretanto esse teste não informa quais são as amostras diferentes. Então, para verificar qual das amostras apresenta diferença significativa para as outras é utilizado o pós-teste de Dunn.

3.7. Microscopia confocal de fluorescência à laser

Com a finalidade de se determinar o mecanismo de ação da quitosana como agente antifúngico contra *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, foram realizadas, no Laboratório de Microscopia e Microanálises do Departamento de Biologia deste instituto, as análises microscópicas de lâminas contendo células dos fungos incubados em presença de quitosana ligada a rodamina (Figura 9), fluoróforo previamente preparado (PICOLA, 2009). Nesse estudo utilizou-se o microscópio confocal de fluorescência à laser Zeiss LSM 710, com aumento de 63x e abertura de pinhole de 90 nm. Os lasers foram utilizados nos comprimentos de onda de excitação de 543 e 633 nm.

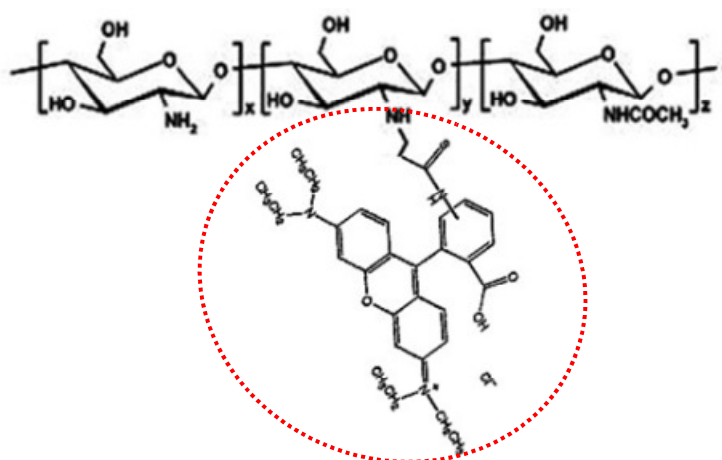


Figura 9. Esquema da quitosana ligada covalentemente ao fluoróforo rodamina, no qual a rodamina está indicada dentro do círculo vermelho (Adaptada de PICOLA, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterizações da quitosana desacetilada

A reação de desacetilação da quitosana é uma reação de amida em solução básica, a qual possibilita a obtenção de quitosana com mais grupamentos amino livres e ocorre por meio da adição nucleofílica de OH^- para o grupo carbonila na amida, seguida pela desprotonação do grupo $-\text{OH}$ e eliminação do ácido carboxílico (Figura 10).

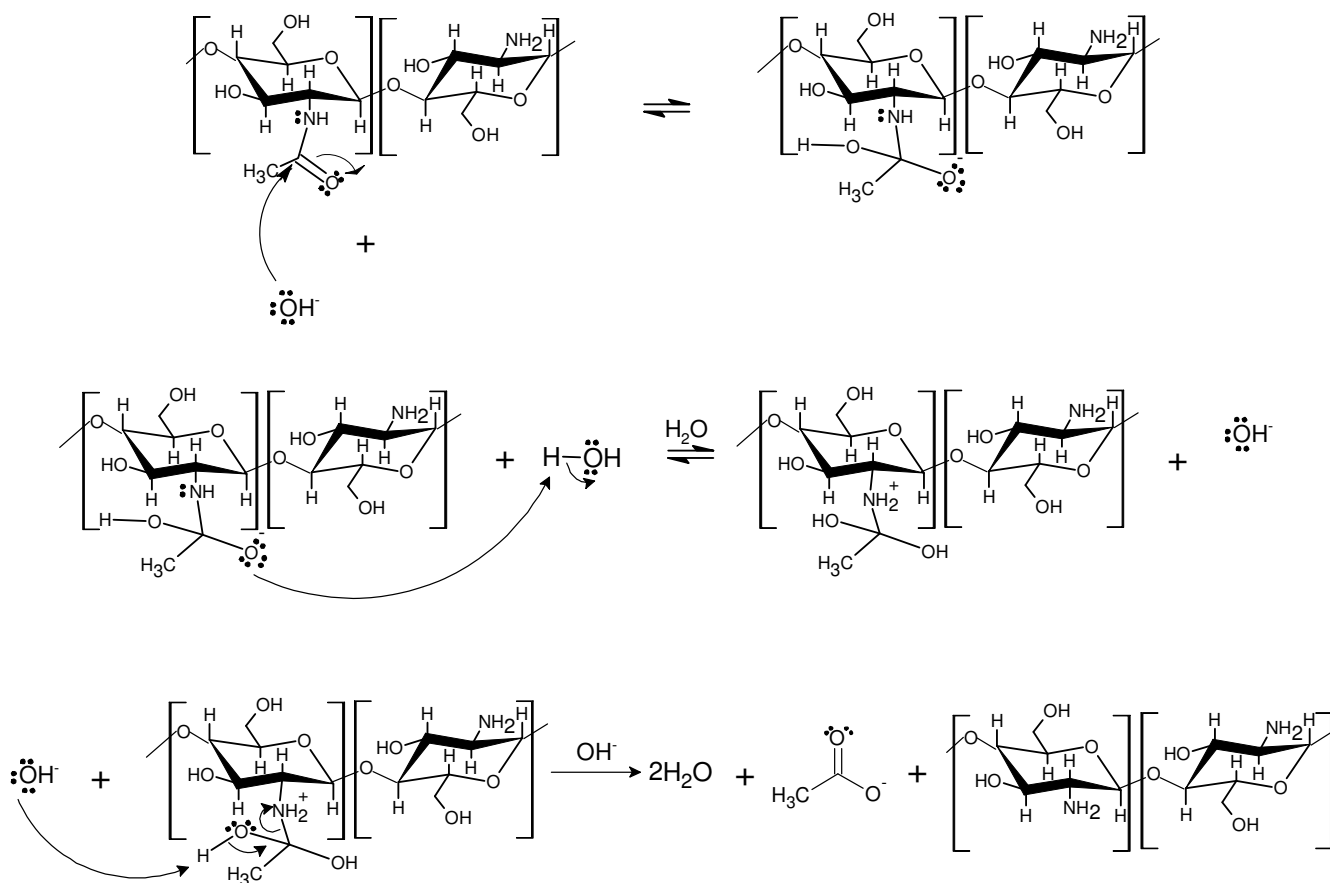


Figura 10. Esquema do mecanismo de reação da desacetilação da quitosana em meio básico.

Os gráficos da titulação potenciométrica e os espectros de RMN-H das quitosanas desacetiladas CHm e CH são apresentados respectivamente nas Figuras 11 e 12.

4.1.1. Potenciometria

Na titulação potenciométrica a adição de hidróxido de sódio aumenta o pH lentamente indicando o consumo de prótons devido ao excesso de ácido clorídrico. As mudanças resultantes do consumo dos prótons em solução são facilmente observadas na Figura 11. O primeiro pico presente no gráfico da primeira derivada refere-se ao consumo dos prótons provenientes do ácido e ao início da desprotonação dos grupos amino da quitosana. O segundo pico está relacionado com o término da desprotonação desses grupos.

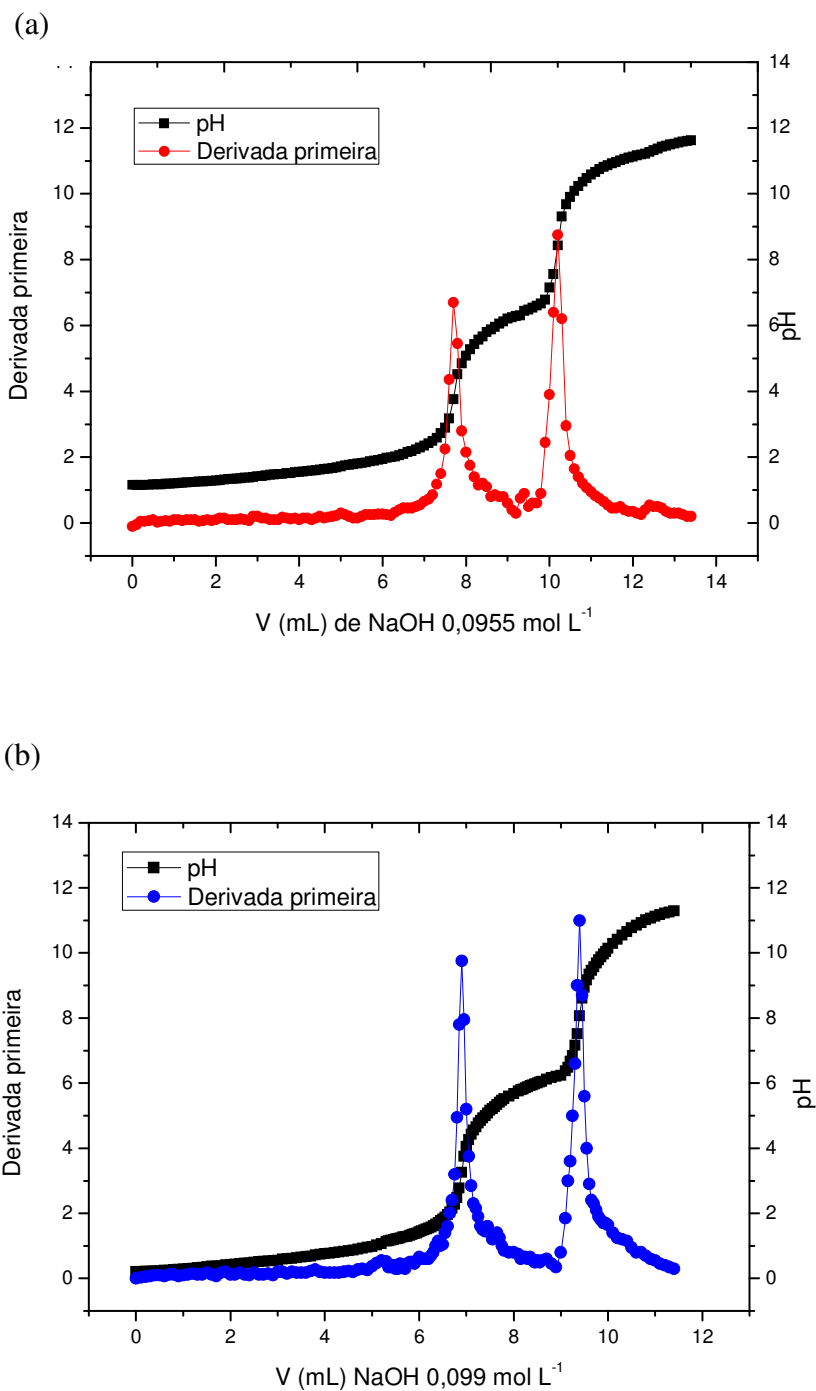


Figura 11. Gráficos da titulação potenciométrica das quitosanas desacetiladas CHm (a) e CH (b).

O volume de base necessário para a desprotonação dos grupos amino presentes na cadeia polimérica da quitosana permite calcular o grau médio de desacetilação das quitosanas (CHm e CH) por meio da equação 5.

$$\overline{GD} = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH}}{(V_{NaOH} \times M_{NaOH}) + \frac{m_T - (V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times 161,22)}{203,24}} \quad (5)$$

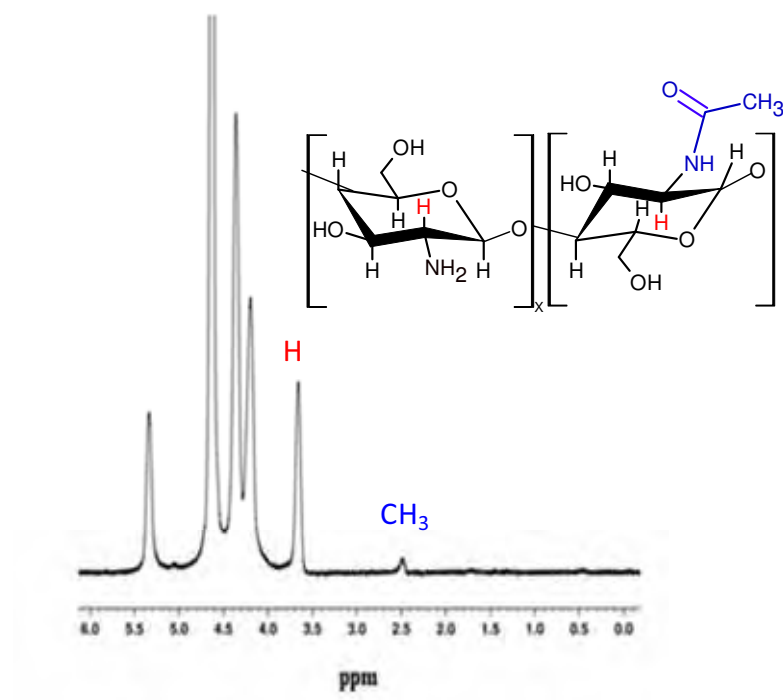
Na qual, m_T representa a massa de quitosana utilizada na titulação; 161,22 e 203,24 correspondem respectivamente as massas moleculares da unidades desacetilada e acetilada de quitosana; V_{NaOH} corresponde ao volume consumido de base na titulação; M_{NaOH} é a concentração da base em mol L^{-1} .

4.1.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)

A Figura 12 apresenta os espectros de RMN-H das quitosanas desacetiladas (CHm e CH). O sinal dos hidrogênios anoméricos dos monômeros desacetilados aparecem em 5,4 ppm. A região de 4,2 a 4,5 ppm apresenta sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 da unidade polimérica e o sinal localizado em 3,7 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel. Os hidrogênios pertencentes aos grupos acetamido apresentaram sinal na região de 2,5 ppm. Com a integração dos picos presentes em 3,7 ppm e 2,5 ppm e a utilização da equação 6 foi possível determinar os graus médios de desacetilação das quitosanas CHm e CH.

$$\overline{GD} = 1 - \frac{A_{H3}}{3A_{H1}} \quad (6)$$

a)



b)

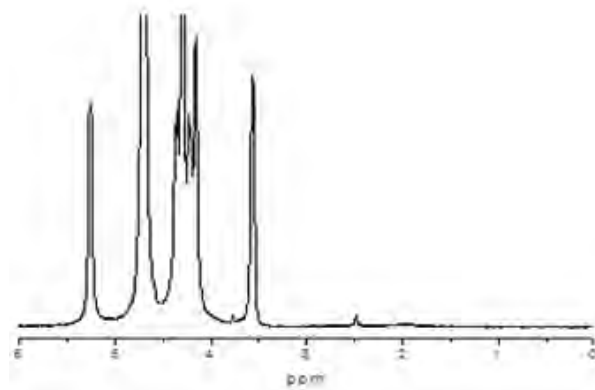


Figura 12. Espectros de RMN-H das quitosanas CHm (a) e CH (b) em D₂O/DCI a 70 °C.

Os dados da titulação são apresentados na Tabela 2 juntamente com os graus médios de desacetilação determinados por RMN-H (Figura 12). As duas técnicas se mostraram eficientes para a determinação do $\overline{GD}$ apresentando uma diferença entre os valores obtidos por potenciometria e por RMN-H. O processo de desacetilação da quitosana se mostrou satisfatório visto que foram obtidas quitosanas com $\overline{GD}$ superior a 95%.

Tabela 2. Valores de massa, volumes de hidróxido de sódio ($0,0955 \text{ mol L}^{-1}$ para a CHm e $0,099 \text{ mol L}^{-1}$ para a CH) e graus médios de desacetilação das quitosanas determinados por potenciometria e RMN-H.

Polímeros	Técnica	Massa (mg)	V _{NaOH} (mL)	$\overline{GD}$ %
CHm	Potenciometria	40,8	2,45	94,44
	RMN-H	20,0	---	98,00
CH	Potenciometria	40,3	2,5	99,61
	RMN-H	20,0	---	99,99

4.1.3. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros de IV apresentados na Figura 13 são das quitosanas comercial (CC) e desacetilada (CH). As bandas apresentadas na região de 3400 cm^{-1} são bandas características resultantes das vibrações de estiramento axial dos grupamentos hidroxilas presentes nos polímeros que se encontram sobrepostas ao estiramento das ligações de N-H.

De acordo com Dos Santos (2003), a banda intensa presente na região de 1660 cm^{-1} da banda de vibração do grupo carbonila dos substituintes acetamido pode ser utilizada na diferenciação entre a CC, que apresenta maior quantidade de grupos acetamido, e a CH, essa com menor quantidade de grupos acetamido. Desse modo a CC apresenta esse pico bem visível diferentemente da CH em que esse pico aparece com menor amplitude.

Uma segunda região utilizada para diferenciar a CC de CH (DOS SANTOS et al., 2003) é a região compreendida entre 1450 e 1300 cm^{-1} . A presença de banda na região entre 1308 a 1385 cm^{-1} , correspondente a deformação axial da ligação C-N do grupo amida, e banda próxima a 1425 cm^{-1} , indicando a deformação axial da ligação C-N do grupo amino, são características que demonstraram a eficiência no processo de desacetilação.

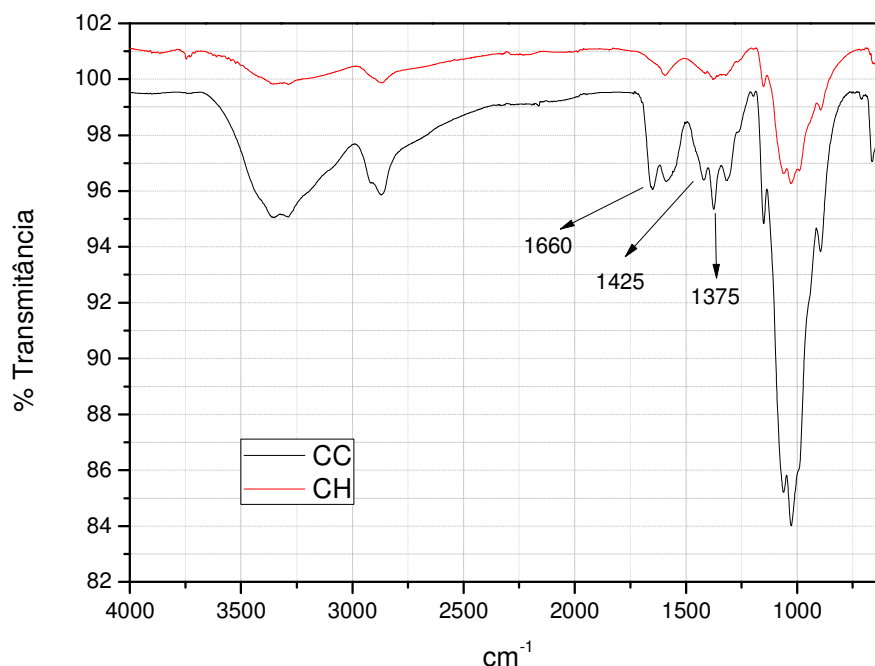


Figura 13. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas comercial (CC) e desacetilada (CH).

4.2. Determinação da massa molar viscosimétrica média

As massas molares médias da quitosana desacetilada de média massa molecular (CHm), quitosana desacetilada (CH) e da quitosana desacetilada degradada (CHD) foram determinadas por viscosimetria. Os valores de massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) das quitosanas CHm, CH e CHD foram obtidos pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 1). Com a determinação do tempo médio de escoamento do solvente puro (solução tamponante) e do tempo médio de escoamento das soluções de quitosana, que para CHm $\bar{t}_0 = 222,5$ s, para CH $\bar{t}_0 = 556,98$ s e para CHD $\bar{t}_0 = 219,37$ s, a viscosidade específica pode ser calculada (equação 2). A Tabela 3 apresenta o tempo médio de escoamento e a viscosidade específica das quitosanas. As viscosidades intrínsecas dos polímeros, obtidas por meio da extrapolação para a concentração zero da curva do gráfico de

η_{sp} /concentração *versus* concentração, são apresentadas na Tabela 4. As Figuras 14, 15 e 16 apresentam os gráficos de η_{sp} /concentração *versus* concentração, que possibilitaram a obtenção das viscosidades intrínsecas.

Tabela 3. Valores de concentração, tempo médio de escoamento e viscosidade específica para as quitosanas CHm, CH e CHD.

CHm			CH			CHD		
C (g mL ⁻¹)	$\bar{t}$ (s)	η_{sp}	C (g mL ⁻¹)	$\bar{t}$ (s)	η_{sp}	C (g mL ⁻¹)	$\bar{t}$ (s)	η_{sp}
3,58x10⁻³	688,53	2,09	6,18x10⁻³	1568,47	1,816	1,23x10⁻²	282,13	0,286
3,26x10⁻³	629,73	1,83	5,15x10⁻³	1328,22	1,385	9,46x10⁻³	263,9	0,203
2,98x10⁻³	582,21	1,62	4,41x10⁻³	1196,98	1,149	7,69x10⁻³	252,88	0,153
2,75x10⁻³	547,56	1,46	3,86x10⁻³	1083,74	0,946	6,47x10⁻³	245,75	0,120
2,39x10⁻³	498,53	1,24	3,43x10⁻³	1013,02	0,819	5,35x10⁻³	239,66	0,0925

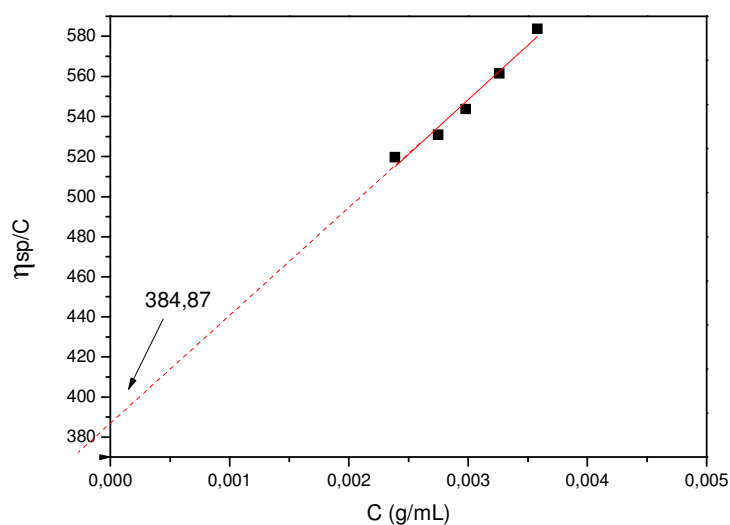


Figura 14. Curva da η_{sp} /concentração *versus* concentração para a quitosana CHm, por meio da extrapolação da curva para concentração próxima a zero obtém-se a viscosidade intrínseca.

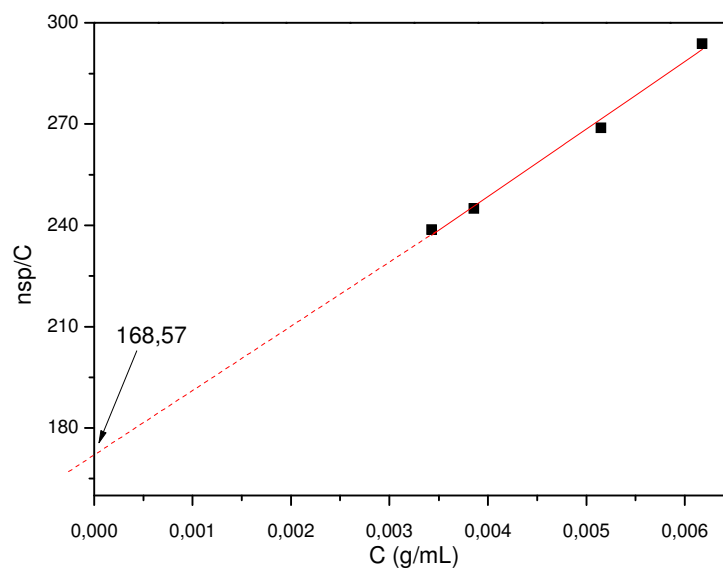


Figura 15. Curva da $\eta_{sp}/$ concentração *versus* concentração para a quitosana CH, por meio da extrapolação da curva para concentração próxima a zero obtém-se a viscosidade intrínseca.

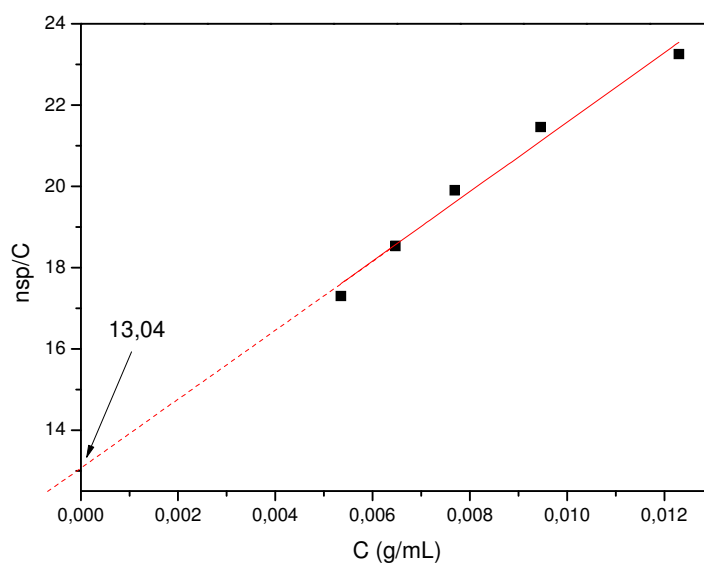


Figura 16. Curva da $\eta_{sp}/$ concentração *versus* concentração para a quitosana CHD, por meio da extrapolação da curva para concentração próxima a zero obtém-se a viscosidade intrínseca.

A Tabela 4 apresenta as massas molares viscosimétricas médias e as viscosidades intrínsecas das CHm, CH e CHD. Nota-se que a $\bar{M}_v$ obtida para o polímero CHm foi de 42,93 kDa, para a CH foi de 15,22 kDa e 610,79 Da para o polímero CHD. Diante dos dados obtidos é possível afirmar que a reação de degradação da quitosana utilizando-se nitrito de sódio em meio ácido ocorreu de forma eficiente e três derivados de diferentes massas moleculares viscosimétricas médias foram obtidos.

Tabela 4. Valores de $\bar{M}_v$ e $[\eta]$ para as quitosanas CHm, CH e CHD.

Quitosanas	$\bar{M}_v$ (Da)	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)
CHm	42,93x10 ³	384,87
CH	15,22x10 ³	168,57
CHD	610,79	13,04

4.3. Preparação e caracterização de derivados de quitosana

4.3.1. Sínteses dos derivados

As sínteses dos derivados de quitosanas modificadas com o substituinte cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE) e alquiladas com dodecil aldeído foram descritas nos itens 3.2.3 e 3.2.4, respectivamente, da Metodologia. O esquema geral das sínteses é apresentado na Figura 17.

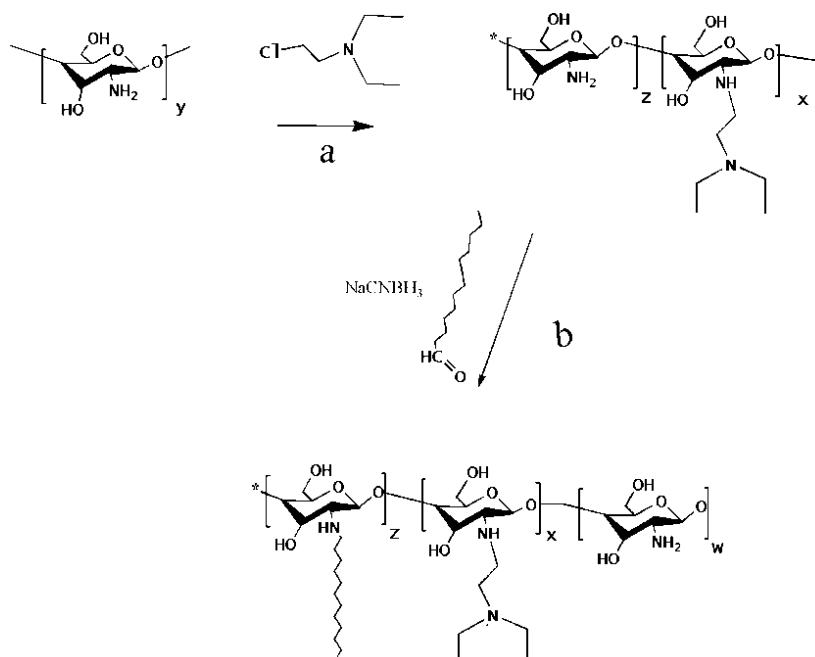


Figura 17. Esquema geral para a síntese de derivados anfifílicos de quitosana, onde a) representa a reação de substituição com DEAE e b) representa a reação de alquilação com dodecil aldeído.

A primeira etapa da síntese consiste em uma reação de substituição com DEAE. Essa reação, denominada reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), ocorre por meio do ataque do nucleófilo ao carbono ligado ao átomo de cloro para a formação do estado de transição, seguida do rompimento da ligação C—Cl e formação da ligação N—C da quitosana com o grupo DEAE (Figura 18).

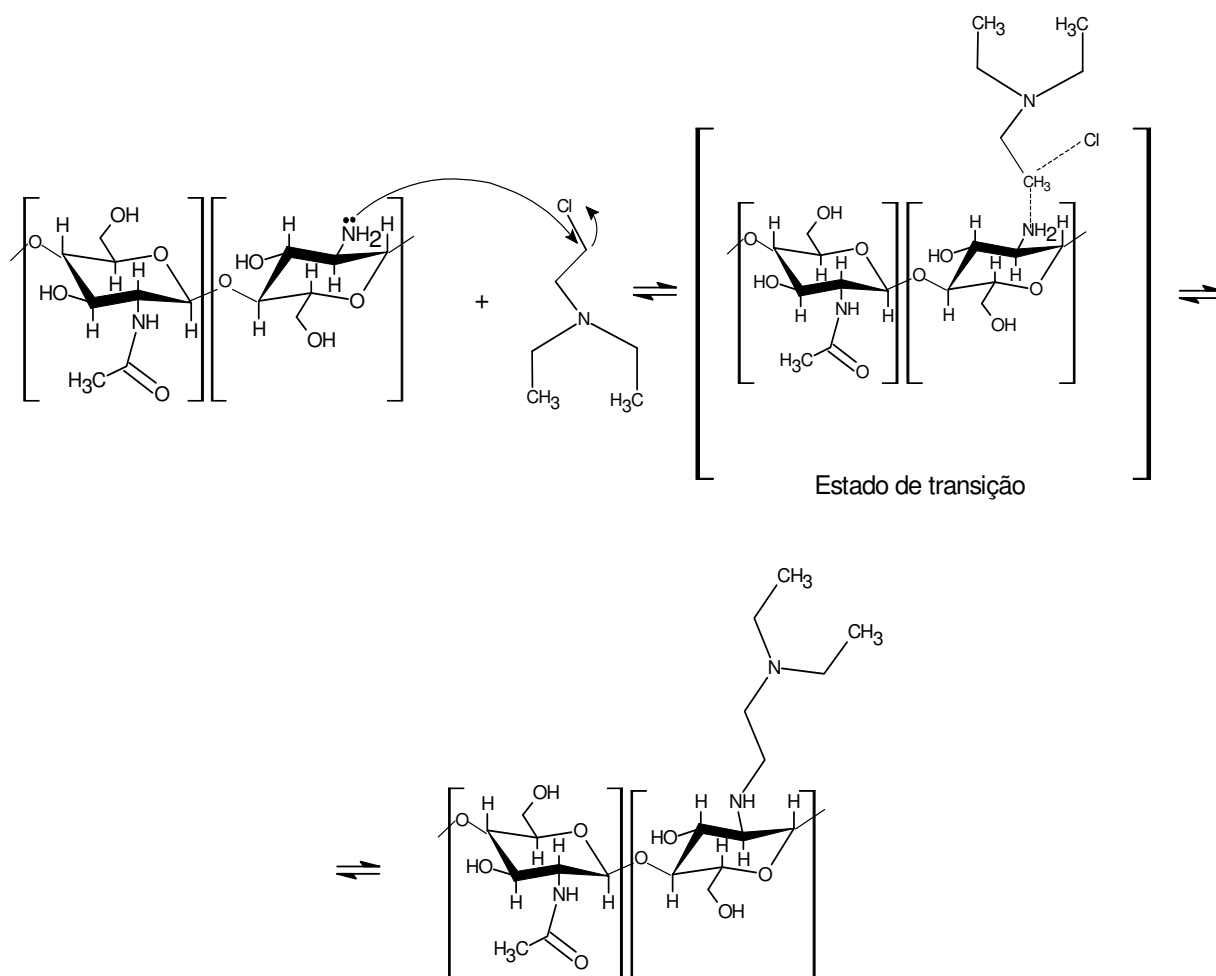
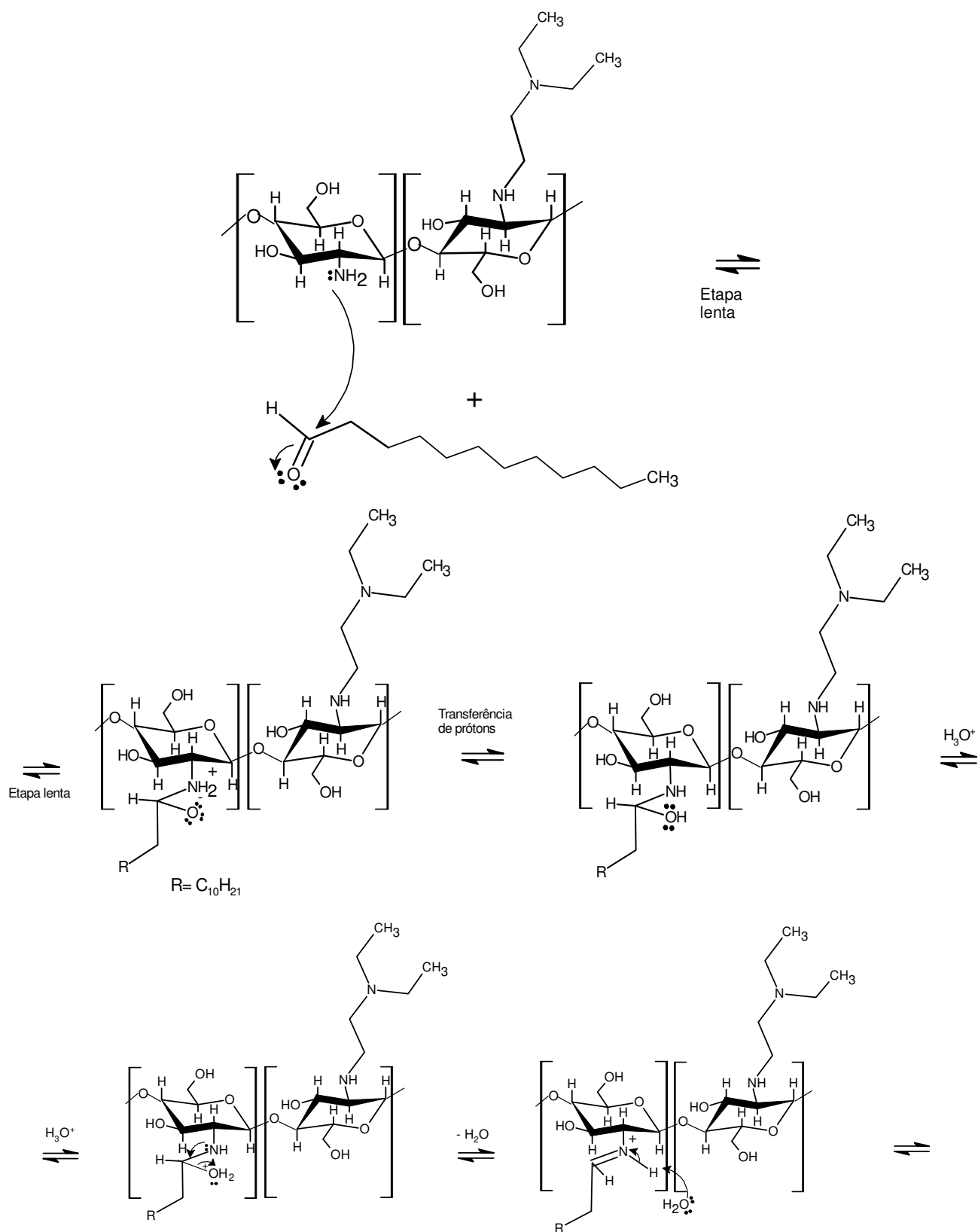


Figura 18. Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.

O processo de alquilação, segunda etapa, consiste em uma reação de adição nucleofílica a qual envolve dois passos: primeiramente há uma etapa lenta, na qual ocorre a formação da imina (base de Schiff) entre o nitrogênio presente na cadeia da quitosana e o carbono da carboxila do aldeído (DESBRIERES et al., 1996) . O segundo passo ocorre rapidamente com a redução da dupla ligação da base de Schiff e a formação de uma ligação covalente simples, obtendo-se o derivado alquilado (Figura 19).



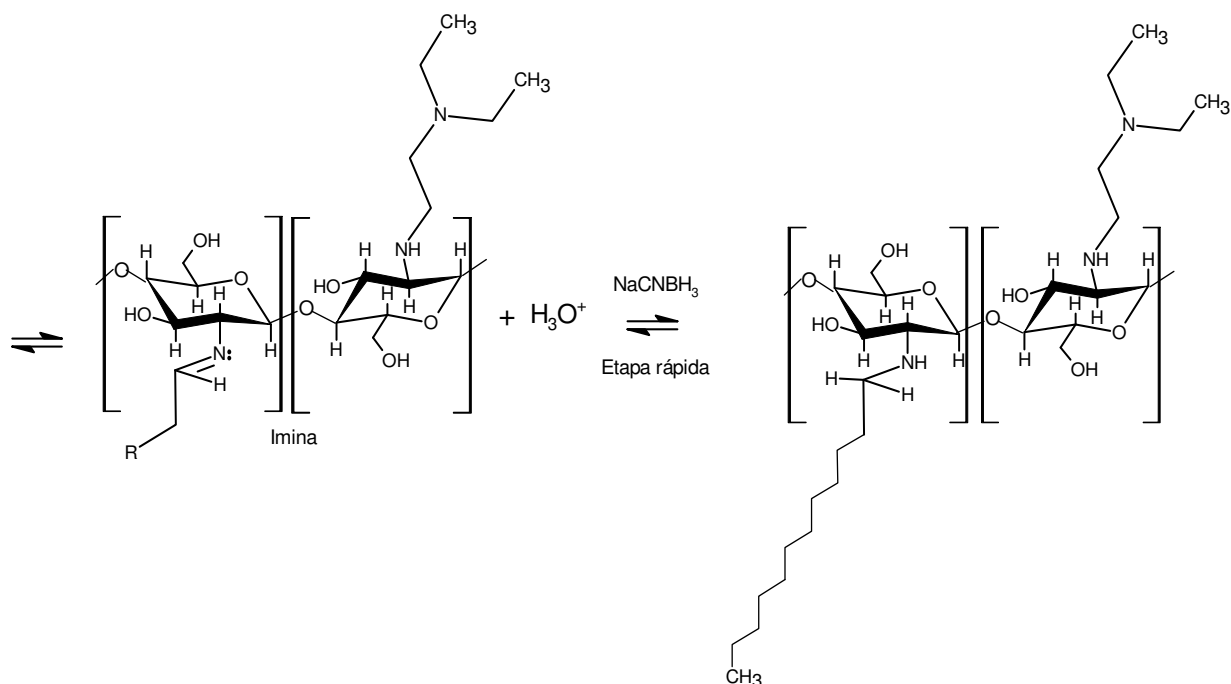


Figura 19. Esquema do mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos derivados anfifílicos de quitosana.

4.3.2. Caracterização dos derivados de quitosana

4.3.2.1. Caracterização dos derivados hidrofílicos de quitosana

O grau de substituição (GS) foi obtido pela utilização da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H). A Figura 20 mostra os espectros de RMN-H dos derivados de quitosana substituídos com proporções crescentes de DEAE (CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE). O GS foi determinado utilizando-se a equação 7 (KIM e CHUN, 1999).

$$GS = \frac{\left(\frac{A_{CH_3}}{6}\right)}{A_{H_1}} \quad (7)$$

Na qual, A_{CH_3} refere-se à área dos hidrogênios dos grupamentos metila presentes na cadeia do DEAE e A_{H_1} refere-se à área correspondente aos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica da quitosana.

Na Figura 20 são indicados também os hidrogênios H e os hidrogênios do grupo CH_3 utilizados para o cálculo de GS. A Tabela 5 contém os valores das razões molares DEAE/ NH_2 e de GS para os derivados.

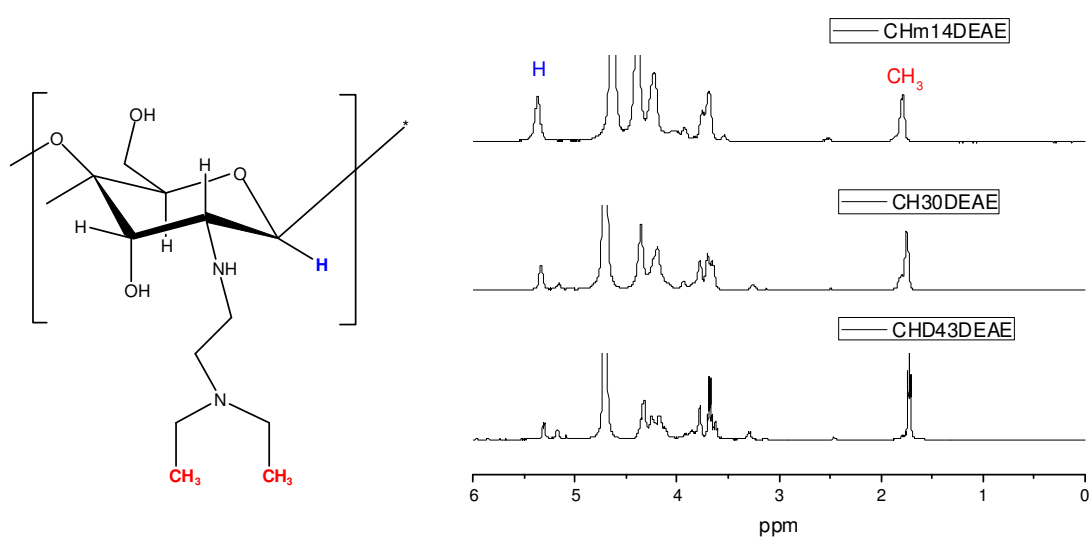


Figura 20. Espectros de RMN-H dos derivados de quitosana CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE em D_2O/DCI a 70 °C e esquema representativo do monômero dos derivados de quitosana contendo os hidrogênios que produzem os sinais utilizados dos espectros de RMN-H.

Tabela 5. Valores das razões molares DEAE/ NH_2 e GS para as quitosanas CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE.

Quitosana	Razão molar DEAE/ NH_2	GS%
CHm14DEAE	0,5	14%
CH30DEAE	0,5	30%
CHD43DEAE	0,5	43%

Os espectros de IV da quitosana desacetilada (CH) e do polímero modificado apenas com grupos DEAE (CHm14DEAE) são apresentados na Figura 21. A partir da comparação dos espectros é possível observar a presença de bandas no espectro do derivado CHm14DEAE que estão ausentes no espectro da CH. Para o derivado CHm14DEAE é observada a presença das bandas características oriundas das deformações axiais da ligação C-H por volta de 2950 cm^{-1} além das bandas características presentes no intervalo de $1310\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$ que correspondem às deformações axiais das ligações C-N presentes na estrutura molecular do DEAE (YOO et al., 2005).

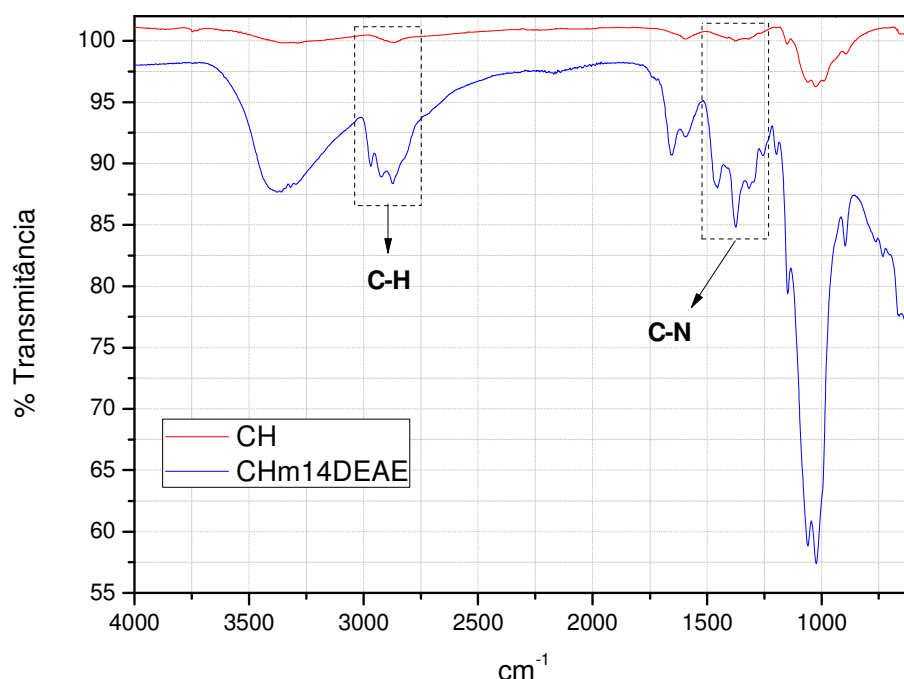


Figura 21. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas desacetilada (CH) e substituída com grupos DEAE (CHm14DEAE).

4.3.2.2. Determinação do grau de substituição (GDD) por grupos dodecila *N*-substituídos

Os graus de substituição (GDD) foram obtidos pela utilização da técnica de RMN-H. A partir das áreas dos picos referentes aos hidrogênios do grupo CH_3

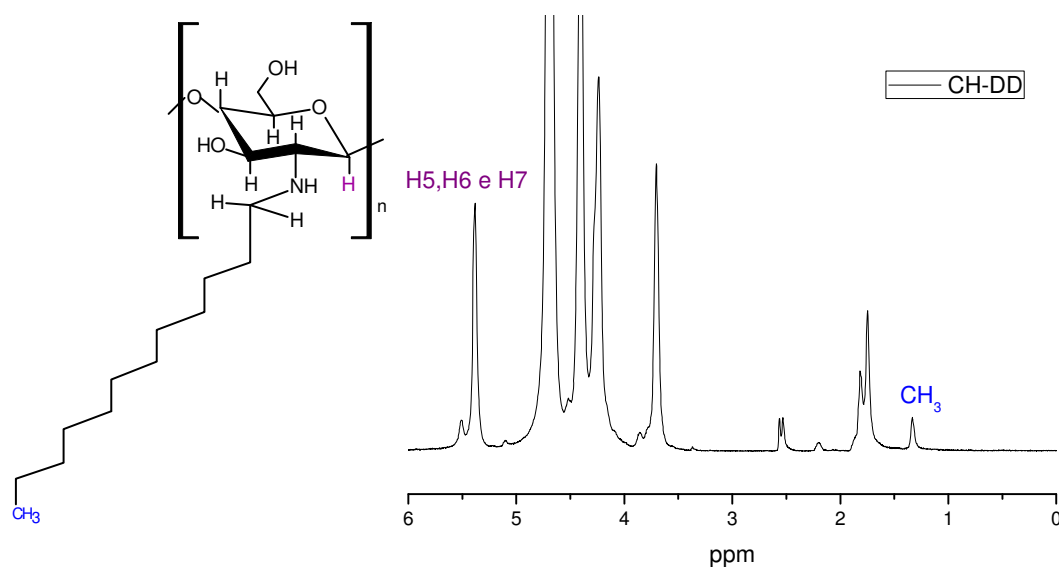
do substituinte dodecila que apresentam sinal em 1,3 ppm (CH_3DD), e os hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados (H_5 , $\delta = 4,6$ ppm), desacetilado (H_6 , $\delta = 4,9$ ppm) e substituído (H_7 , $\delta = 5,5$ ppm) do espectro de RMN-H, é possível o cálculo do GDD utilizando a equação 8 (DESBRIERES et al., 1996).

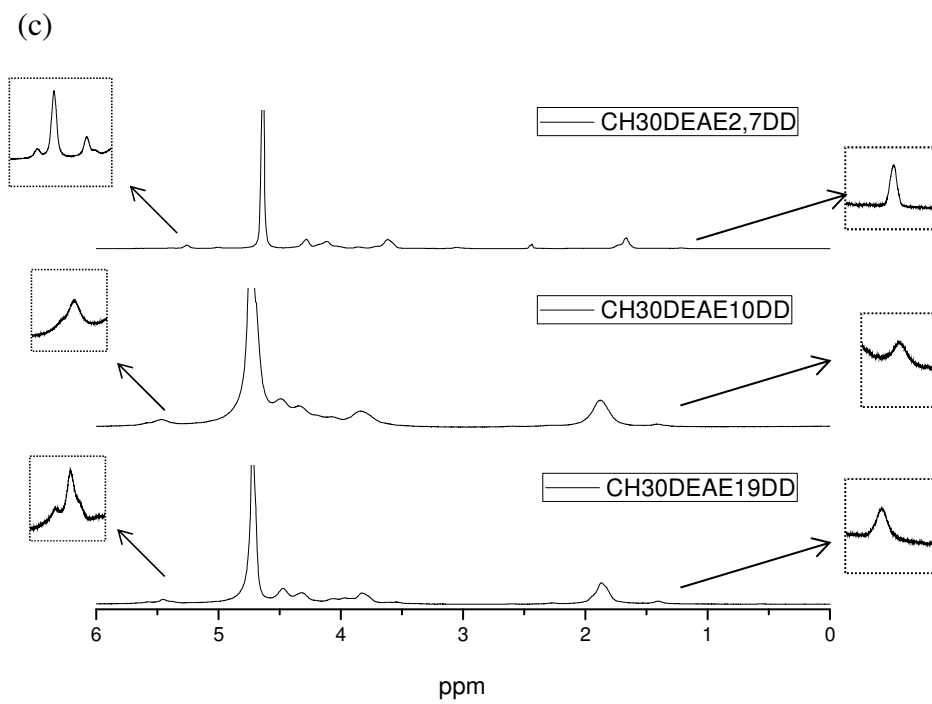
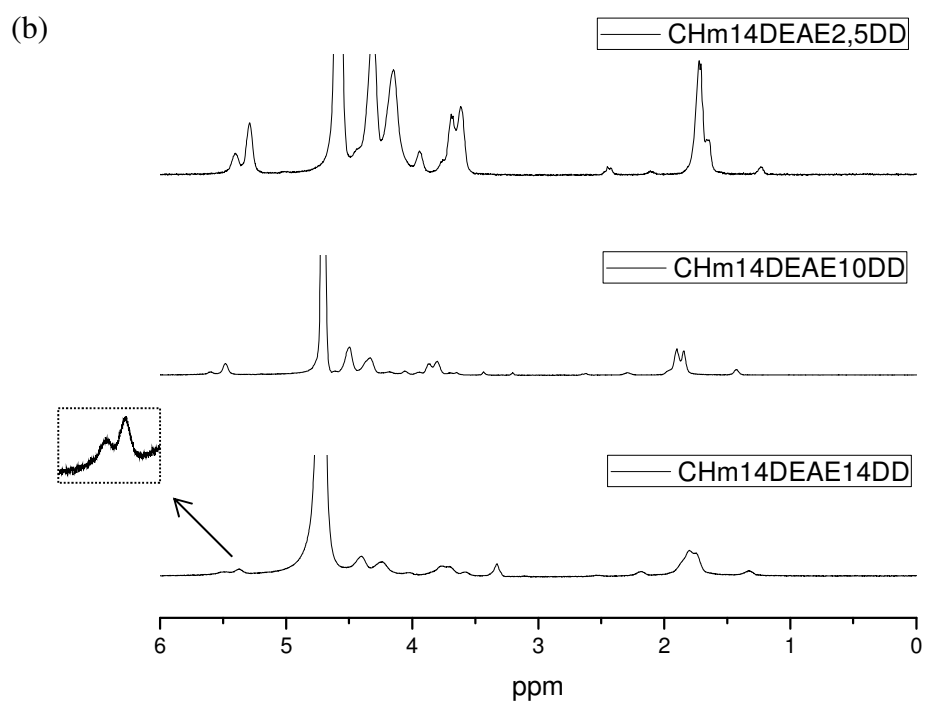
$$GDD = \frac{A_{\text{CH}_3\text{DD}}}{3 \times (A_{\text{H}_5} + A_{\text{H}_6} + A_{\text{H}_7})} \quad (8)$$

Na qual, $A_{\text{CH}_3\text{DD}}$ é a área dos picos referentes aos hidrogênios do grupo CH_3 do substituinte dodecila e A_{H_5} , A_{H_6} e A_{H_7} referem-se respectivamente aos hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados, desacetilados e substituídos do espectro de RMN-H.

Os derivados de quitosana contendo grupos dodecila foram denominados CH-DD, CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD e os respectivos espectros de RMN-H são apresentados nas Figura 22 (a), (b), (c) e (d). A Tabela 6 apresenta os valores das razões molares dodecila/ NH_2 e de GDD.

(a)





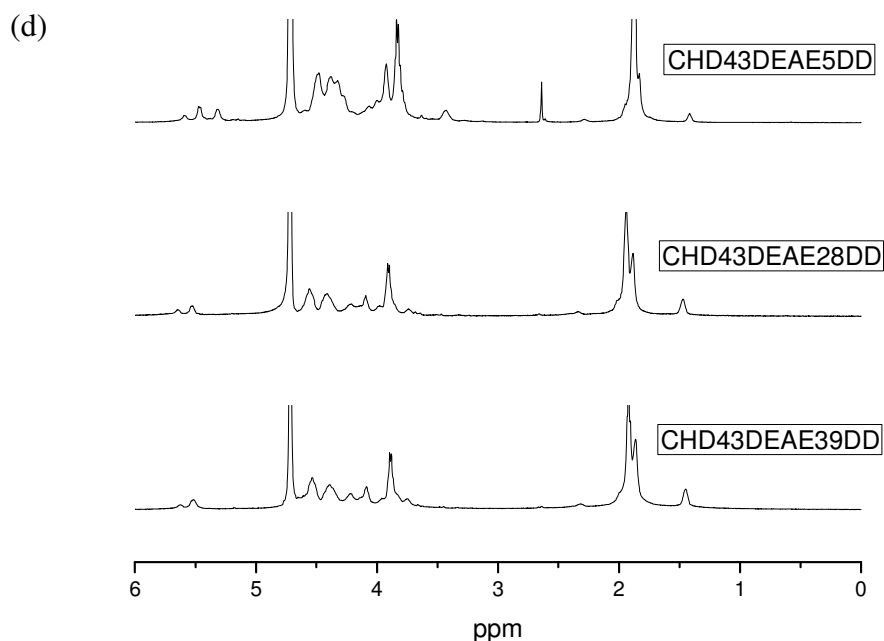


Figura 22. Espectros de RMN-H das quitosanas modificadas CH-DD (a), CHm14DEAE2,5DD, CH14DEAE10DD, CH14DEAE14DD (b), CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD (c) e CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD (d) em D_2O/DCI a $70\text{ }^{\circ}C$.

Na Figura 22 é possível observar que as sínteses de alquilação ocorreram com sucesso, pois há presença de bandas que estão ausentes nos espectros das quitosanas desacetiladas, apresentados na Figura 12.

A eficiência da reação mostrou-se dependente da massa molecular do polímero, visto que as mesmas condições reacionais foram utilizadas e os derivados de menor $\bar{M}_v$ foram os mais substituídos. Uma possível explicação está relacionada ao tamanho da cadeia, quanto menor a cadeia, mais os grupos amino estarão desimpedidos estericamente para a derivação.

Os espectros de IV da quitosana desacetilada (CH) e do polímero modificado apenas grupos dodecila (CH-DD) são apresentados na Figura 23. A partir da comparação dos espectros foi possível observar a presença de bandas no espectro do derivado CH-DD que apresentam menor amplitude no espectro da CH. Para o espectro do polímero dodecilado CH-DD pode-se observar a presença

de bandas características próximo a 2950 cm^{-1} resultado das deformações axiais da ligação C-H dos grupos CH_3 , assimétrico e simétrico, e do grupo CH_2 em 2850 cm^{-1} (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

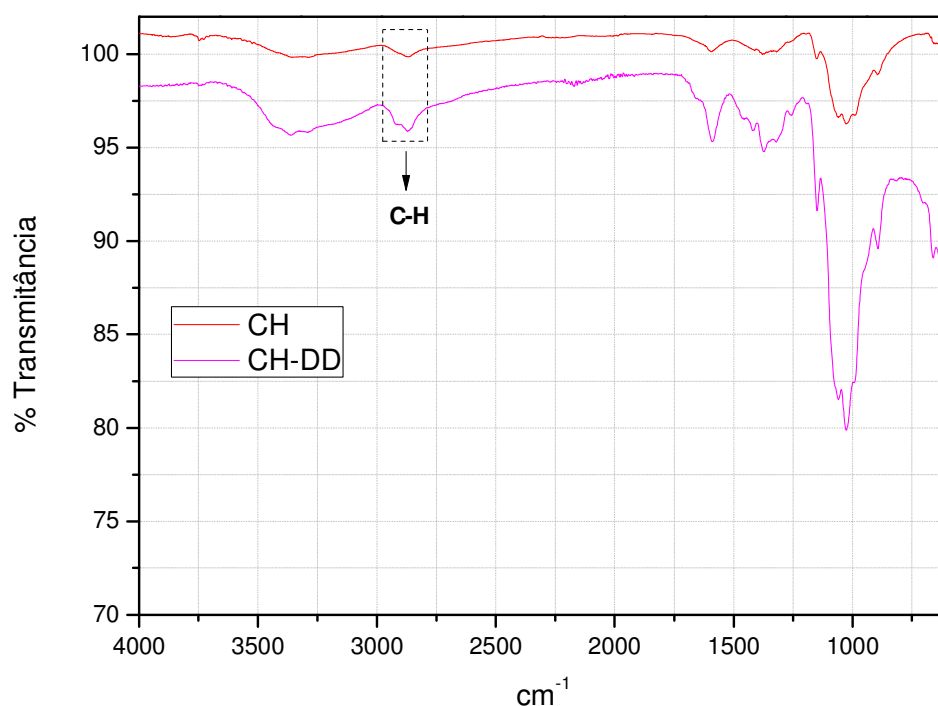


Figura 23. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas desacetilada (CH) e substituída com grupos dodecila (CH-DD).

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam os espectros de absorção na região do infravermelho para os derivados CHm14DEAE14DD , CH30DEAE19DD e CHD43DEAE39DD , respectivamente, nos quais encontram-se destacadas as regiões correspondentes às substituições com dodecila e DEAE. Com a análise dos espectros de RMN-H e de IV confirmou-se o sucesso de síntese dos derivados anfifílicos.

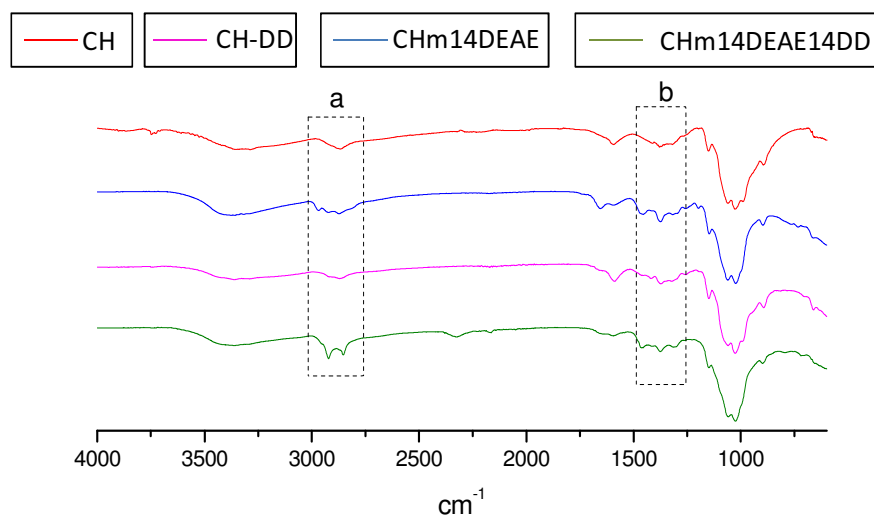


Figura 24. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas desacetilada (CH), substituída com grupos DEAE (CHm14DEAE), substituída com grupos dodecila (CH-DD) e do derivado CHm14DEAE14DD, nos quais são destacadas as regiões que correspondem à presença de dodecila (a) e DEAE (b) no polímero CHm14DEAE14DD.

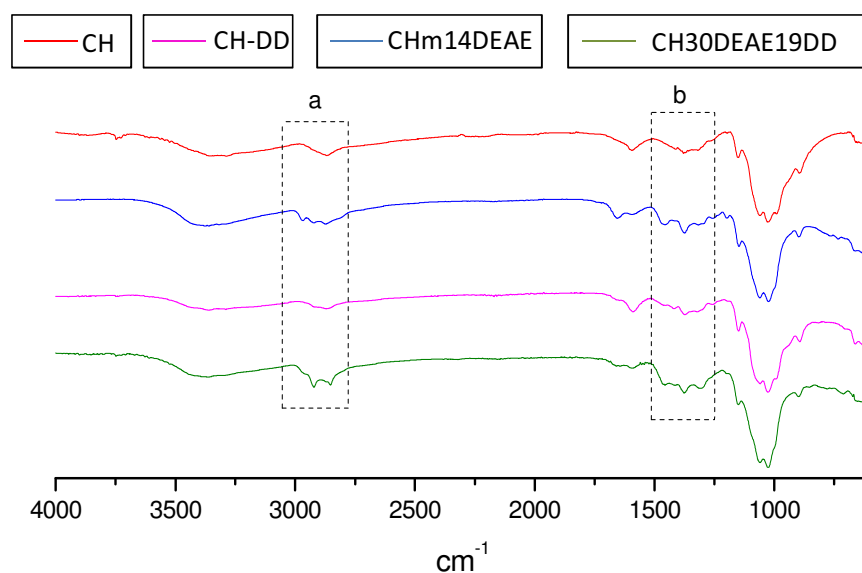


Figura 25. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas desacetilada (CH), substituída com grupos DEAE (CHm14DEAE), substituída com grupos dodecila (CH-DD) e do derivado CH30DEAE19DD, nos quais são destacadas as regiões que correspondem à presença de dodecila (a) e DEAE (b) no polímero CH30DEAE19DD.

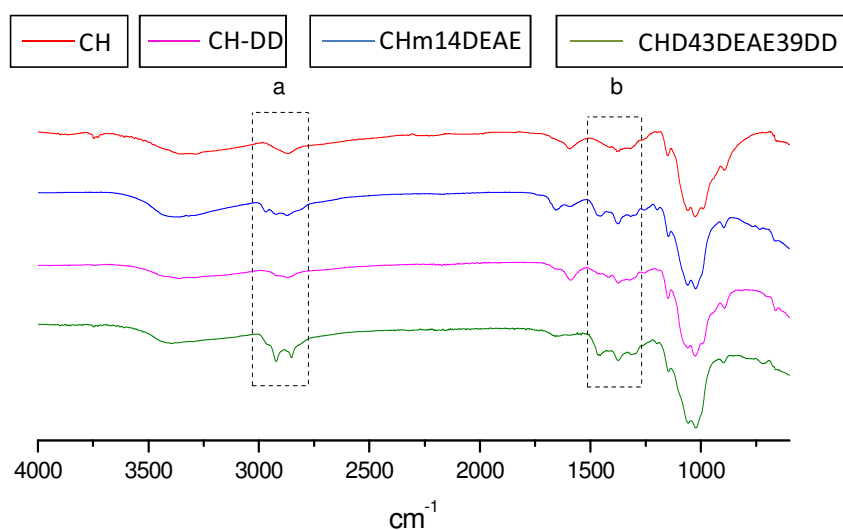


Figura 26. Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas desacetilada (CH), substituída com grupos DEAE (CHm14DEAE), substituída com grupos dodecila (CH-DD) e do derivado CHD43DEAE39DD, nos quais são destacadas as regiões que correspondem à presença de dodecila (a) e DEAE (b) no polímero CHD43DEAE39DD.

A Tabela 6 lista os derivados anfifílicos obtidos com seus respectivos graus de substituição por grupos dodecila e a Figura 27 apresenta o esquema da estrutura química dos derivados de quitosana obtidos.

Tabela 6. Valores das razões molares dodecil/ NH_2 e do GDD de dodecila para os derivados de quitosana.

Quitosana	Razão molar dodecil/ NH_2	GDD%
CH-DD	0,03	3
CHm14DEAE2,5DD	0,05	2,5
CHm14DEAE10DD	0,15	10
CHm14DEAE14DD	0,36	14
CH30DEAE2,7DD	0,05	2,7
CH30DEAE10DD	0,14	10
CH30DEAE19DD	0,37	19
CHD43DEAE5DD	0,06	5
CHD43DEAE28DD	0,37	28
CHD43DEAE39DD	0,45	39

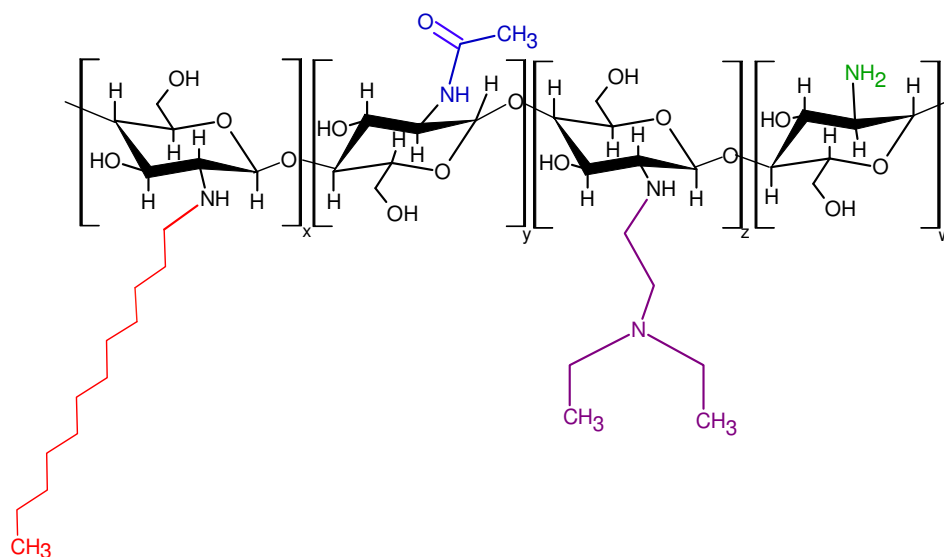


Figura 27. Esquema representativo da estrutura química dos derivados anfifílicos catiônicos de quitosana obtidos.

4.4. Estudo da auto-associação das quitosanas anfifílicas em solução aquosa

4.4.1. Espectrofotometria de fluorescência

A auto-associação dos derivados de quitosana foi estudada em solução aquosa em pH 5,1 utilizando-se solução tamponante. Os valores da concentração de agregação crítica (CAC) foram determinados por espectroscopia de fluorescência, utilizando pireno como sonda hidrofóbica. A CAC foi definida como o intercepto das tangentes da curva antes e depois do ponto de inflexão (Vieira et al., 2003), como mostra a Figura 28.

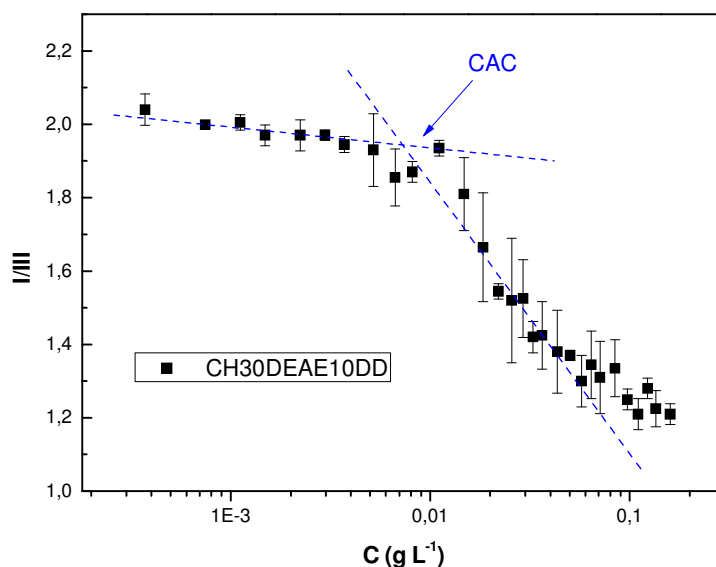
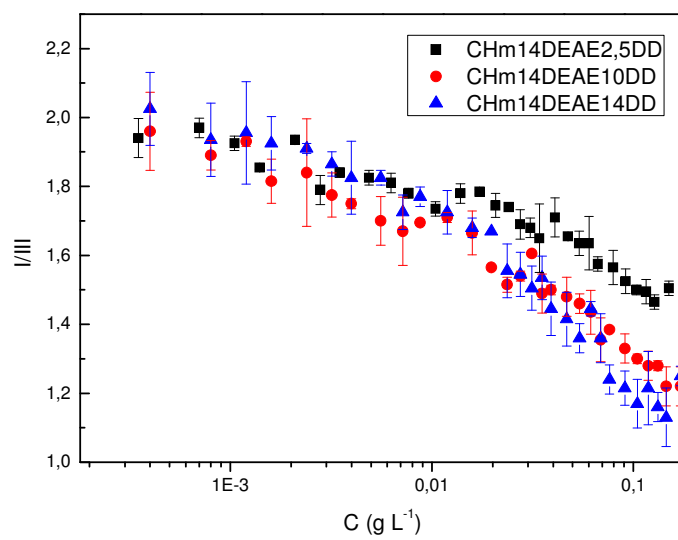


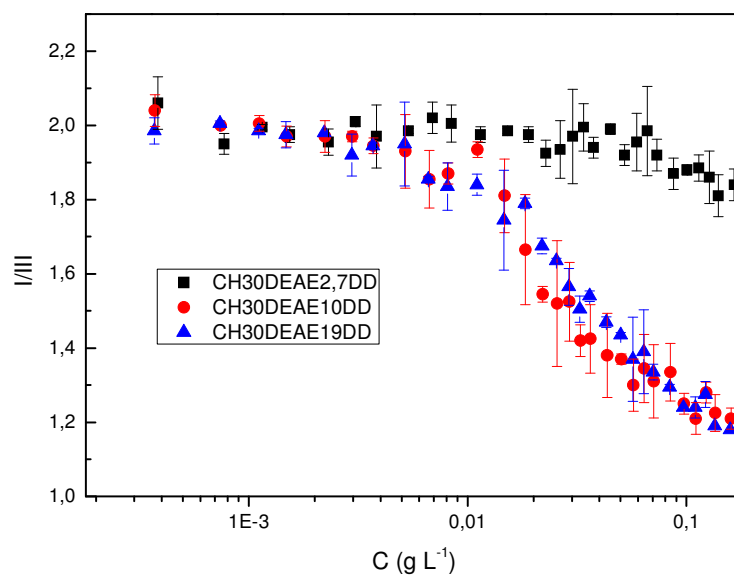
Figura 28. Gráfico da razão I/III do espectro de fluorescência do pireno em função da concentração de CH30DEAE10DD (g L^{-1}), pH 5,1 e comprimento de onda de excitação de 310 nm.

A razão I/III do espectro de emissão da sonda refletiu a formação de microambientes e indicou a concentração sobre a qual a auto-associação foi iniciada. As curvas da Figura 29 apresentaram as variações da razão I/III do espectro de emissão do pireno na presença de concentrações crescentes dos derivados de quitosana CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD.

a) CHm14DEAE



b) CH30DEAE



c) CHD43DEAE

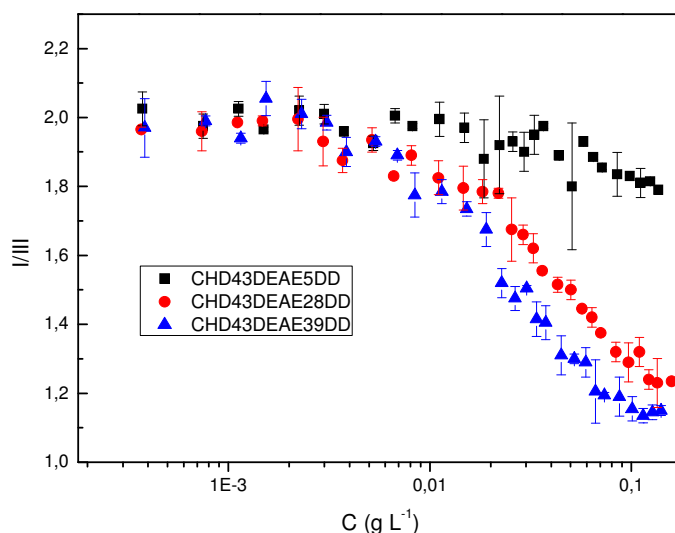


Figura 29. Gráficos da razão I/III do espectro de fluorescência do pireno em função das concentrações de CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD (g L^{-1}) em pH 5,1.

Os derivados menos substituídos, CHm14DEAE2,5DD, CH30DEAE2,7DD e CHD43DEAE5DD, não exibiram uma ruptura clara nas curvas (I/III vs concentração) e os valores da relação I/III permaneceu em torno de 1,7 - 2,0, o que indicou que nas concentrações inferiores a $0,2 \text{ g L}^{-1}$, o caráter hidrofílico dos grupos DEAE supera o efeito hidrofóbico dos grupos dodecila.

Os outros derivados apresentaram gráficos com curvas sigmoidais ocorrendo uma nítida diminuição das razões I/III a uma certa concentração do polímero, o que indicou a formação de agregados devido a interações intermoleculares das cadeias de polímero. A CAC diminuiu com o aumento do grau de substituição por grupos dodecila, levando a formação de agregados que têm polaridades inferiores.

Para os derivados que apresentam menor teor de grupos hidrofóbicos além do valor mais elevado para a CAC, são formados agregados mais hidratados. A Tabela 7 apresenta os valores das CAC dos derivados de quitosana em pH 5,1.

Por meio da comparação dos valores de CAC das três séries de quitosanas (CHm, CH e CHD), observou-se um comportamento semelhante, isto é, diminuições dos valores da CAC com o aumento do grau de substituição por grupos de dodecila. Os derivados de quitosana de menor massa molecular (CHD - 610,79 Da) apresentaram valores mais baixos de CAC do que aqueles de maiores massas. No entanto, a CAC de todos os polímeros permaneceu em torno de 10^{-2} g L⁻¹. Este comportamento pode ser explicado considerando que o efeito hidrofóbico dos grupos dodecila supera o efeito hidrofílico fornecido por grupos DEAE.

Tabela 7. Concentração de Agregação Crítica dos derivados de quitosana por fluorescência.

Polímeros		CAC (g L ⁻¹) pH 5,1
CHm	CHm14DEAE2,5DD	---
	CHm14DEAE10DD	$3,9 \times 10^{-2}$
	CHm14DEAE14DD	$1,4 \times 10^{-2}$
CH	CH30DEAE2,7DD	---
	CH30DEAE10DD	$1,2 \times 10^{-2}$
	CH30DEAE19DD	$1,1 \times 10^{-2}$
CHD	CHD43DEAE5DD	---
	CHD43DEAE28DD	$1,1 \times 10^{-2}$
	CHD43DEAE39DD	$3,1 \times 10^{-3}$

CHm: $\bar{M}_v = 42,93$ kDa CH : $\bar{M}_v = 15,22$ kDa CHD: $\bar{M}_v = 610,79$ Da

4.5. Eficiência dos agentes antifúngicos contra o fungo *Aspergillus flavus*

Nesta etapa do trabalho foram realizados ensaios microbiológicos para o estudo da inibição do crescimento do fungo *A. flavus* em presença da quitosana comercial e seus derivados de diferentes massas moleculares. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis.

4.5.1. Efeito da concentração do agente antifúngico na inibição do crescimento do fungo *A. flavus*

Segundo Rappussi-da-Silva (2006), o estudo realizado sobre a ação da quitosana contra o crescimento de *Guignardia citricarpa* em laranja, após colheita, mostrou que a concentração da quitosana não influencia diretamente a inibição do crescimento do fungo. Em oposição, Rabea et al (2003), que estudou o efeito da quitosana sobre o fungo *F. oxysporum* no tratamento de sementes, constatou que as maiores inibições ocorreram nas concentrações de 0,5 e 1,0 g L⁻¹.

Com a finalidade de observar o efeito da variação da concentração dos polímeros na inibição do crescimento do fungo, neste trabalho foram testadas três concentrações crescentes para quitosana comercial (CC) e para as quitosanas substituídas CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE. Para as quitosanas desacetilada (CH de $\bar{M}_v = 15,22$ kDa), desacetilada degradada (CHD de $\bar{M}_v = 610,79$ Da), desacetilada de média massa molecular (CHm de $\bar{M}_v = 42,93$ kDa) e substituídas (CHm14DEAE2,7DD, CHm14DEAE10DD, CHm14DEAE14DD, CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD) foram testadas quatro concentrações crescentes.

A partir dos resultados obtidos (Figura 30 e 31), observou-se que a concentração da quitosana não interferiu significativamente na inibição do crescimento do fungo, no que diz respeito às quitosanas CC, CHm, CH, CHD,

CHm14DEAE, CH30DEAE e CHD43DEAE. Já os demais derivados (Figura 32), com algumas exceções, apresentaram inibição crescente com o aumento da concentração do polímero. Esse aumento expressivo do índice de inibição do fungo com o aumento da concentração do derivado de quitosana pode estar relacionado à presença crescente de grupos hidrofóbicos nas soluções, permitindo maior interação com a parede celular do fungo. Assim, a concentração dos polímeros anfifílicos se mostrou um fator importante na inibição do *A. flavus*.

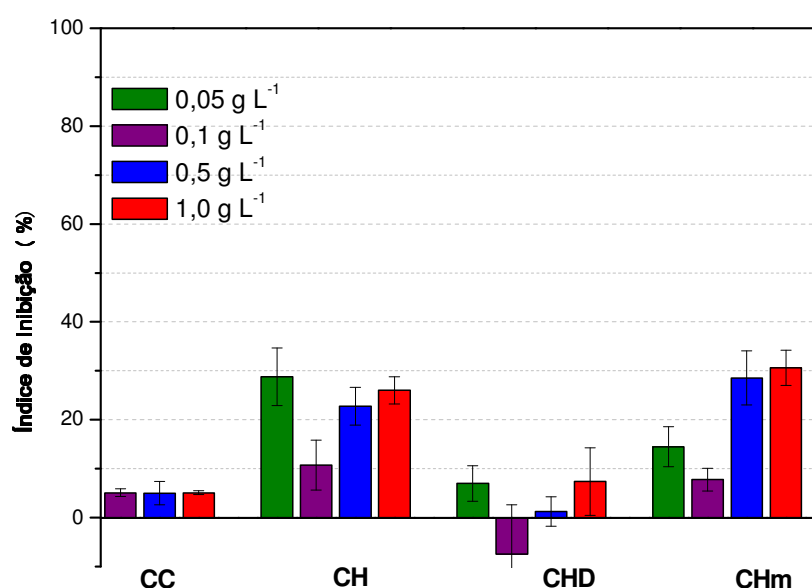


Figura 30. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. flavus* para as quitosanas CC, CH ($\bar{M}_v = 15,22 \text{ kDa}$), CHD ($\bar{M}_v = 610,79 \text{ Da}$) e CHm ($\bar{M}_v = 42,93 \text{ kDa}$) em concentrações crescentes.

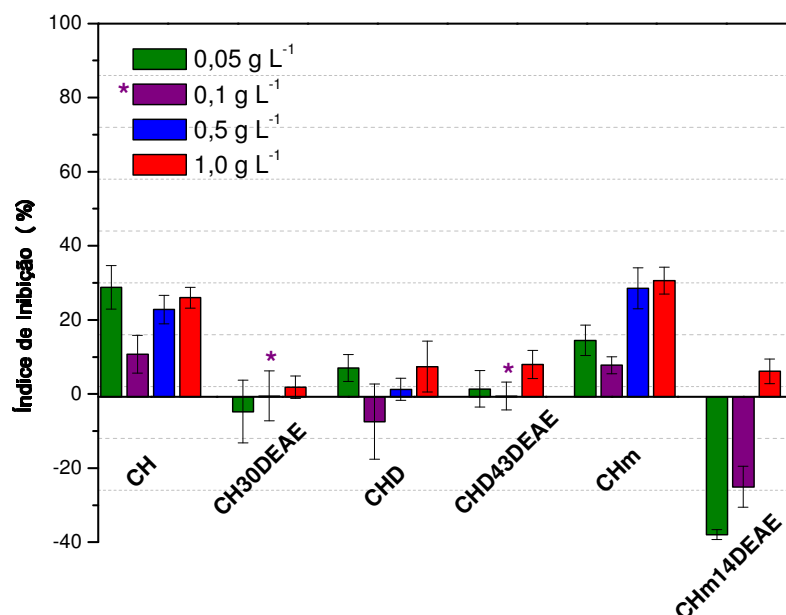


Figura 31. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. flavus* para as quitosanas, CH ($\bar{M}_v = 15,22 \text{ kDa}$), CH30DEAE, CHD ($\bar{M}_v = 610,79 \text{ Da}$), CHD43DEAE, CHm ($\bar{M}_v = 42,93 \text{ kDa}$) e CHm14DEAE em concentrações crescentes. O asterisco faz referência à concentração em que o índice de inibição foi determinado.

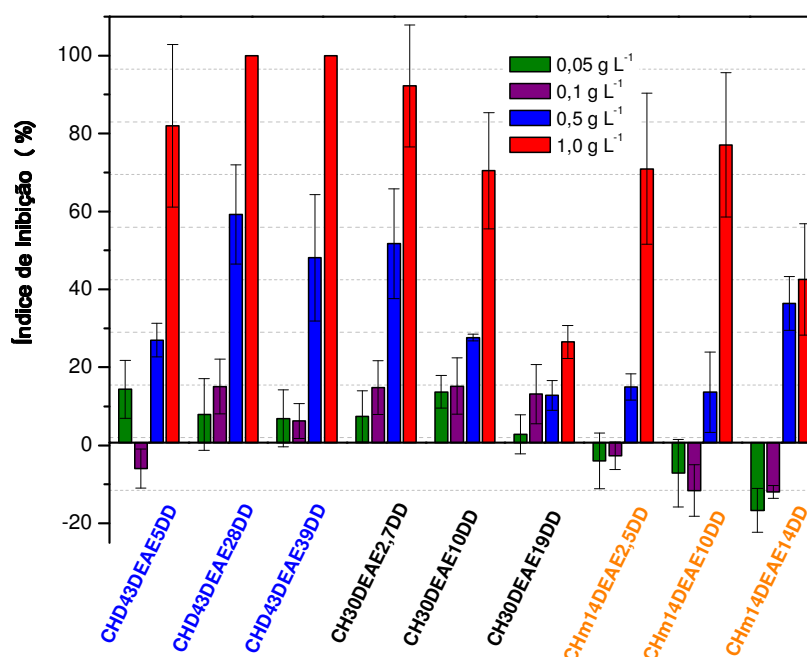


Figura 32. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. flavus* para as diferentes quitosanas anfífilas e concentrações. As diferentes cores nos nomes dos polímeros indicam as três diferentes séries de derivados de quitosana.

A análise estatística da atividade fúngica dos polímeros foi feita em etapas onde os índices de inibição dos polímeros de mesma massa molecular foram comparados entre si para a determinação do agente antifúngico mais eficiente daquela série. Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram que houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de inibição para os polímeros da série de 600,79 Da ($p < 0,05$). A partir da Tabela 8 observa-se a existência de evidências estatísticas de que os biopolímeros CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD, na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, são os mais eficientes dessa série de polímeros possuindo a mesma mediana (letra A), entretanto, o derivado CHD43DEAE28DD possui menor porcentagem de grupos dodecila, fato que levou a determinação desse polímero como o de maior eficiência dentre os polímeros analisados.

Tabela 8. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 600,79 Da.

Polímero- concentração	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor <i>p</i>
CHD - 0,05	4	7,00 $\pm$ 3,64	7,10 ^D	3,04	10,75	< 0,001
CHD - 0,1	4	-7,45 $\pm$ 10,14	-10,75 ^D	-15,01	6,69	
CHD - 0,5	4	1,27 $\pm$ 3,00	1,52 ^D	-2,64	4,67	
CHD - 1,0	4	7,40 $\pm$ 6,87	7,10 ^{CD}	-0,61	16,02	
CHD43DEAE- 0,05	4	1,37 $\pm$ 4,93	2,29 ^D	-5,38	6,30	
CHD43DEAE- 0,1	4	-0,52 $\pm$ 3,77	-0,92 ^D	-4,70	4,47	
CHD43DEAE- 1,0	4	7,97 $\pm$ 3,82	8,41 ^D	2,89	12,17	
CHD43DEAE5DD- 0,05	4	14,36 $\pm$ 7,43	14,76 ^{CD}	4,88	23,03	
CHD43DEAE5DD- 0,1	4	-4,06 $\pm$ 8,67	-3,04 ^D	-14,60	4,46	
CHD43DEAE5DD- 0,5	4	27,00 $\pm$ 4,29	27,97 ^C	20,96	31,07	
CHD43DEAE5DD- 1,0	4	81,96 $\pm$ 20,84	82,42 ^{AB}	63,01	100,00	
CHD43DEAE28DD- 0,05	4	7,91 $\pm$ 9,22	9,63 ^{CD}	-3,85	16,23	
CHD43DEAE28DD- 0,1	4	15,00 $\pm$ 7,05	14,55 ^{CD}	6,99	24,17	
CHD43DEAE28DD- 0,5	4	59,23 $\pm$ 12,70	56,93 ^B	48,63	74,44	
CHD43DEAE28DD- 1,0	4	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
CHD43DEAE39DD- 0,05	4	6,90 $\pm$ 7,34	6,29 ^{CD}	-1,42	16,43	
CHD43DEAE39DD- 0,1	4	6,24 $\pm$ 4,48	5,38 ^D	1,83	12,37	
CHD43DEAE39DD- 0,5	4	48,12 $\pm$ 16,22	44,22 ^B	34,48	69,57	
CHD43DEAE39DD- 1,0	4	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações antifúngicas a 0,05.

A análise estatística dos derivados da série de massa molecular de 15,22 kDa demonstrou que também houve diferenças estatisticamente significativas entre os índices de inibição para os polímeros dessa série. Os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que os derivados CH30DEAE2,7DD e CH30DEAE10DD, na concentração de 1,0 g L⁻¹, são os mais eficientes dessa série de polímeros possuindo a mesma mediana (letra A), entretanto, a menor porcentagem de grupos dodecila presentes no polímero CH30DEAE2,7DD faz

desse o biopolímero de maior eficiência contra o *A. flavus* dessa série de polímeros.

Tabela 9. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 15,22 kDa.

Polímero-concentração	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor <i>p</i>
CH-0,05	4	28,78 $\pm$ 5,98	29,03 ^C	21,37	35,69	< 0,001
CH -0,1	4	10,74 $\pm$ 5,08	11,59 ^D	4,64	15,12	
CH -0,5	4	22,78 $\pm$ 3,85	24,09 ^{CD}	17,14	25,81	
CH -1,0	4	26,01 $\pm$ 2,78	25,91 ^C	22,78	29,44	
CH30DEAE - 0,05	4	-4,75 $\pm$ 8,46	-4,47 ^D	-13,17	3,09	
CH30DEAE - 0,1	4	-0,52 $\pm$ 6,72	-2,29 ^D	-5,84	8,36	
CH30DEAE - 1,0	4	1,84 $\pm$ 3,04	1,44 ^D	-1,32	5,80	
CH30DEAE2,7DD - 0,05	4	7,43 $\pm$ 6,58	7,81 ^D	-0,19	14,30	
CH30DEAE2,7DD - 0,1	4	14,80 $\pm$ 6,93	14,43 ^{CD}	7,31	23,05	
CH30DEAE2,7DD - 0,5	4	51,72 $\pm$ 14,08	51,91 ^{ABC}	34,29	68,77	
CH30DEAE2,7DD - 1,0	4	92,19 $\pm$ 15,62	100,00 ^A	68,77	100,00	
CH30DEAE10DD-0,05	4	13,72 $\pm$ 4,19	14,35 ^{CD}	8,38	17,80	
CH30DEAE10DD-0,1	4	15,21 $\pm$ 7,25	16,99 ^{CD}	4,94	21,93	
CH30DEAE10DD-0,5	4	27,61 $\pm$ 0,87	27,32 ^C	26,98	28,82	
CH30DEAE10DD-1,0	4	70,44 $\pm$ 14,92	71,41 ^A	54,08	84,85	
CH30DEAE19DD-0,05	4	2,82 $\pm$ 5,00	3,23 ^D	-3,28	7,99	
CH30DEAE19DD-0,1	4	13,12 $\pm$ 7,59	15,57 ^{CD}	2,08	19,26	
CH30DEAE19DD-0,5	4	12,79 $\pm$ 3,83	12,15 ^{CD}	9,47	17,41	
CH30DEAE19DD-1,0	4	26,51 $\pm$ 4,25	27,67 ^{CD}	20,74	29,98	
CH-DD - 0,05	4	12,36 $\pm$ 4,98	12,03 ^{CD}	6,66	18,74	
CH-DD - 0,1	4	29,42 $\pm$ 2,77	29,18 ^C	26,40	32,92	
CH-DD - 0,5	4	27,84 $\pm$ 2,15	28,03 ^C	25,25	30,04	
CH-DD - 1,0	4	43,17 $\pm$ 1,00	43,08 ^B	42,12	44,42	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações antifúngicas a 0,05.

Para os derivados da série de massa molecular de 42,93 kDa, a análise estatística mostrou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os índices de inibição dessa série de polímeros. Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam os biopolímeros CHm14DEAE2,5DD e CHm14DEAE10DD, na concentração de 1,0 g L⁻¹, que apresentam a mesma mediana (letra A) como os mais eficientes dessa série de polímeros. A presença de menor porcentagem de grupos dodecila no derivado CHm14DEAE2,5DD faz desse o polímero de maior eficiência antifúngica dessa série de derivados.

Tabela 10. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 42,93 kDa.

Polímero-concentração	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor <i>p</i>
CHm-0,05	4	14,47 ± 4,11	14,42 ^C	9,54	19,50	< 0,001
CHm-0,1	4	7,76 ± 2,29	8,29 ^{CD}	4,55	9,92	
CHm-0,5	4	28,56 ± 5,51	29,47 ^{BC}	21,99	33,30	
CHm-1,0	4	30,62 ± 3,62	30,91 ^{BC}	26,40	34,26	
CHm14DEAE -0,05	4	-37,95 ± 1,33	-37,42 ^E	-39,91	-37,04	
CHm14DEAE -0,1	4	-25,06 ± 5,54	-26,02 ^{DE}	-29,95	-18,26	
CHm14DEAE -1,0	4	6,13 ± 3,35	5,41 ^{CD}	3,02	10,69	
CHm14DEAE2,5DD -0,05	4	-3,98 ± 7,19	-1,90 ^{CD}	-14,35	2,25	
CHm14DEAE2,5DD -0,1	4	-2,71 ± 3,52	-2,13 ^{CD}	-7,20	0,63	
CHm14DEAE2,5DD -0,5	4	14,99 ± 3,40	15,04 ^C	10,78	19,08	
CHm14DEAE2,5DD -1,0	4	70,95 ± 19,41	61,96 ^A	59,88	100,00	
CHm14DEAE10DD -0,05	4	-7,15 ± 8,71	-8,13 ^{CD}	-16,66	4,32	
CHm14DEAE10DD -0,1	4	-11,59 ± 6,61	-12,97 ^{BD}	-18,04	-2,36	
CHm14DEAE10DD -0,5	4	13,66 ± 10,32	14,47 ^{BCD}	0,40	25,30	
CHm14DEAE10DD -1,0	4	77,06 ± 18,52	75,79 ^A	56,66	100,00	
CHm14DEAE14DD -0,05	4	-16,71 ± 5,65	-17,81 ^D	-21,96	-9,28	
CHm14DEAE14DD -0,1	4	-11,93 ± 1,62	-11,82 ^D	-13,66	-10,43	
CHm14DEAE14DD -0,5	4	36,37 ± 6,89	37,06 ^B	28,53	42,82	
CHm14DEAE14DD -1,0	4	42,54 ± 14,29	47,90 ^{ABC}	21,84	52,51	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações antifúngicas a 0,05.

Na tentativa de se determinar o melhor agente antifúngico dentre aqueles selecionados na análise estatística de cada série de polímeros, realizou-se um segundo tratamento estatístico. O valor p obtido na segunda análise estatística foi 0,06 indicando que não existe diferença estatística de índice de inibição entre os polímeros selecionados.

4.5.2. Efeito da massa molecular na atividade antifúngica da quitosana e seus derivados contra o fungo *A. flavus*

Segundo Xu et al. (2007), a atividade antifúngica da quitosana é dependente de sua massa molecular, grau de desacetilação, pH, além do micro-organismo alvo. De acordo com Rabea et al. (2003), quitosanas oligoméricas apresentam um melhor efeito antifúngico do que os polímeros de unidades maiores. A interação eletrostática das cargas da quitosana com as cargas existentes na parede celular dos micro-organismos alvo pode lesionar a célula, explicando assim a ação da quitosana (XU et al. 2007 e GUO et al. 2008).

Segundo Liu et al. (2004), uma outra possível explicação para ação da quitosana é a alteração da permeabilidade da membrana plasmática do fungo, resultado das interações dos grupos amino positivos da quitosana com as cargas negativas dos fosfolipídeos. Estudos de Palma-Guerrero et al. (2009) envolvendo o modo de ação da quitosana contra *Neurospora crassa* mostraram que a quitosana entra na célula matando-a, por meio do aumento da permeabilidade de sua membrana plasmática, por um mecanismo desconhecido em que há gasto de energia, não havendo endocitose.

Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos (Figura 30 e Tabelas 8, 9 e 10) demonstraram a atividade antifúngica natural da quitosana comercial (CC) quando realizados testes *in vitro*. O processo de desacetilação aumenta discretamente essa atividade, deixando mais monômeros com grupamentos amino livres. Considerando que o pK_a da quitosana é 6,4 e o pH do meio de cultura é aproximadamente 5,5, pode-se inferir que nesse pH os grupamentos amino

encontram-se protonados (cargas positivas), o que permite a interação das cargas positivas da cadeia polimérica da quitosana com as cargas negativas das membranas celulares do fungo, como descrito por Jia (2001).

Pode-se observar ainda que dentre as quitosanas desacetiladas, o maior índice de inibição foi obtido para a quitosana de média massa molecular (CHm). Para alguns polímeros em determinadas concentrações o índice de inibição foi negativo o que indica que nessas condições o micro-organismo utiliza o polímero como nutriente para se desenvolver, fato também verificado por Palma-Guerrero et al. (2008) em seus estudos sobre a ação antifúngica da quitosana sobre *V. dahliae*. A presença de grupamento hidrofóbico na estrutura da quitosana aumenta a atividade de inibição do *A. flavus* chegando, em alguns casos, a inibir 100% do crescimento do fungo, o que caracteriza a ação fungicida desses derivados.

Para avaliar a presença do grupo DEAE na CHD foram realizados ensaios microbiológicos com o derivado CHD43DEAE. A avaliação dos índices de inibição indicou que o grupamento DEAE não interfere significativamente na inibição do fungo, o que já era esperado. Em relação aos ensaios realizados com os demais derivados, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD, é possível observar um aumento considerável do índice de inibição do micro-organismo, atingindo 100% para os experimentos utilizando os derivados CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD na concentração de 1 g L^{-1} . Esse fato pode ser explicado considerando o tamanho do oligômero, dímero ou talvez trímero, que pode fazer com que a formação dos agregados não se dê de forma efetiva, permitindo assim a interação da cadeia hidrofóbica com a parede celular do micro-organismo. Dessa forma, assim como o estudado por Rabea et al. (2003) e Kong et al. (2010), as quitosanas de baixas massas moleculares apresentaram um melhor efeito antifúngico em relação aos outros polímeros. Ainda para os ensaios microbiológicos com derivados CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD na concentração de 1 g L^{-1} é possível observar que os índices de inibição do *A. flavus* não variam com o aumento da porcentagem de substituição por grupos hidrofóbicos,

indicando que o efeito da massa molecular do polímero se sobrepõe ao efeito da presença de grupos dodecila na atividade sobre o fungo.

Observando-se a sequência de ensaios envolvendo os derivados de quitosana não degradada ($\bar{M}_v = 15,22$ kDa), contendo 30% de grupamentos DEAE (CH30DEAE), nota-se que não há inibição do fungo quando comparado com aqueles que apresentam porção hidrofóbica. Para as concentrações de 0,5 e 1,0 g L⁻¹ houve uma diminuição do índice de inibição do fungo com a crescente porcentagem de substituição por grupos dodecila. Esse fato pode estar relacionado com as interações intramoleculares da cadeia do polímero que diminuem as interações com a parede celular do fungo, indicando que a massa molecular do polímero é um segundo fator importante na atividade de inibição do crescimento do *A. flavus*, fato também verificado por Li et al. (2008) em seus estudos sobre o efeito da massa molecular e da concentração da quitosana contra o fungo *Aspergillus niger*.

Com a análise da sequência de ensaios envolvendo os derivados da quitosana de média massa molecular ($\bar{M}_v = 42,93$ kDa) contendo 14% de grupamentos DEAE, nota-se a existência de índices de inibição negativos sugerindo que nessas condições o *A. flavus* utilize os derivados de quitosana como nutrientes. Observa-se para os derivados CHm14DEAE2,5DD, CHm14DEAE10DD e CHm14DEAE14DD, nas concentrações de 0,05 e 0,1 g L⁻¹, índices de inibição negativos, resultados não verificados para os polímeros de massas moleculares menores, indicando mais uma vez a importância da massa molecular do polímero na inibição do micro-organismo.

A Figura 33 apresenta as imagens do sétimo dia de incubação do fungo *A. flavus* em presença do polímero CHD43DEAE28DD nas concentrações de 0,05, 0,1 e 1,0 g L⁻¹. Analisando as imagens é possível observar uma discreta diferença entre os diâmetros de crescimento radial do fungo nas concentrações de 0,05 e 0,1 g L⁻¹. Na concentração de 1,0 g L⁻¹, observa-se o não desenvolvimento do fungo o que caracteriza a ação biofungicida desse polímero nessas condições.

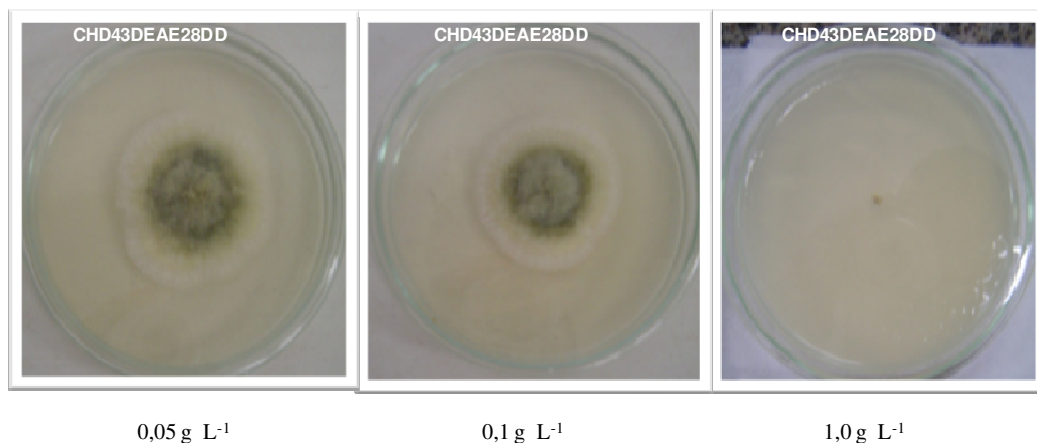


Figura 33. Imagens do ensaio microbiológico com o polímero CHD43DEAE28DD, nas concentrações de 0,05, 0,1 e 1,0 g L⁻¹, contra o fungo *A. flavus* no sétimo dia de incubação.

4.6. Eficiência dos agentes antifúngicos contra o fungo *Aspergillus parasiticus*

Os ensaios microbiológicos contra o fungo *A. parasiticus* foram feitos apenas com a quitosana desacetilada de média massa molecular (CHm) e seus derivados. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis.

4.6.1. Efeito da concentração do agente antifúngico na inibição do crescimento do fungo *A. parasiticus*

A partir dos resultados obtidos nos ensaios microbiológicos envolvendo a série de quitosana de média massa molecular (CHm) contra o fungo *A. parasiticus* pode-se observar, Figura 34, que a quitosana desacetilada CHm não apresentou índice de inibição significativo nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,5 g L⁻¹, entretanto, na concentração de 1,0 g L⁻¹ o índice de inibição do *A. parasiticus* apresentou um ligeiro aumento. A presença de grupos DEAE na estrutura do polímero não interferiu significativamente no índice de inibição do fungo, que por

sua vez aumentou discretamente com o aumento da concentração do derivado CHm14DEAE.

Para a sequência de derivados anfifílicos ficou evidente o aumento do índice de inibição do fungo, atingindo o valor máximo de inibição (100%), para o derivado CHm14DEAE2,5DD na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Analisando-se a Figura 34 observa-se que o aumento da concentração dos polímeros contendo grupos dodecila aumenta o índice de inibição do micro-organismo, indicando a importância do fator concentração para o aumento do índice de inibição do *A. parasiticus*. Observa-se também que o aumento da porcentagem de grupos dodecila nos polímeros, para uma mesma concentração, diminui o índice de inibição do *A. parasiticus*. Esse fato pode estar relacionado à menor interação do polímero com a parede celular do fungo devido a maior interação intramolecular do polissacarídeo.

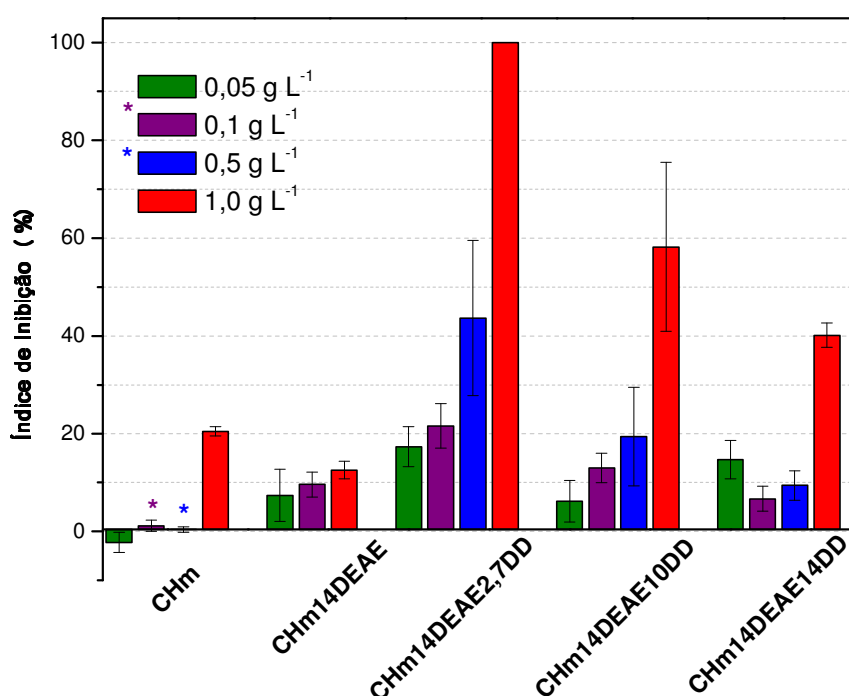


Figura 34. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. parasiticus* para série de quitosanas de média massa molecular. Os asteriscos fazem referência as concentrações em que os índices de inibição foram determinados.

A Figura 35 apresenta imagens do sétimo dia de incubação do fungo *A. parasiticus* em presença do polímero CHm14DEAE2,5DD na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e o ensaio controle (na ausência de quitosana). Analisando as imagens observa-se o não desenvolvimento do fungo na placa contendo o derivado de quitosana o que caracteriza a ação biofúngica desse polímero nessas condições.

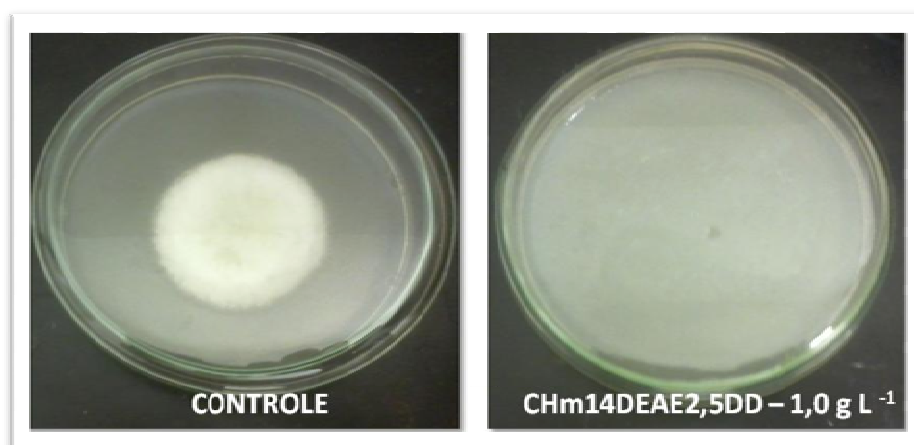


Figura 35. Imagens do ensaio microbiológico com o polímero CHm14DEAE2,5DD na concentrações de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ contra o fungo *A. parasiticus* no sétimo dia de incubação.

A análise estatística dos resultados demonstrou que houve diferenças estatisticamente significativas entre os índices de inibição para os polímeros estudados ($p < 0,05$). Os resultados apresentados na Tabela 11 indicam que o derivado CHm14DEAE2,5DD, na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, é o biopolímero mais eficiente contra o *A. parasiticus* dentre os polímeros estudados.

Tabela 11. Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos derivados da quitosana de 42,93 kDa contra o fungo *A. parasiticus*.

Polímero-concentração	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor <i>p</i>
CHm-0,05	4	-2,25 ± 2,09	-2,51 ^D	-4,47	0,47	< 0,001
CHm-0,1	4	1,17 ± 1,19	0,61 ^D	0,50	2,95	
CHm-0,5	4	0,38 ± 0,56	0,47 ^D	-0,38	0,98	
CHm-1,0	4	20,46 ± 0,99	20,88 ^C	19,01	21,05	
CHm14DEAE -0,05	4	7,40 ± 5,03	7,18 ^{CD}	2,95	12,30	
CHm14DEAE -0,1	4	9,61 ± 2,55	8,55 ^{CD}	7,95	13,40	
CHm14DEAE -1,0	4	12,55 ± 1,77	12,63 ^C	10,51	14,42	
CHm14DEAE2,5DD -0,05	4	17,32 ± 4,10	18,17 ^C	11,60	21,35	
CHm14DEAE2,5DD -0,1	4	21,60 ± 4,55	21,85 ^C	16,38	26,33	
CHm14DEAE2,5DD -0,5	4	43,65 ± 15,89	36,59 ^{BC}	34,10	67,35	
CHm14DEAE2,5DD -1,0	4	100,00 ± 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
CHm14DEAE10DD -0,05	4	6,18 ± 4,24	6,62 ^{CD}	1,39	10,07	
CHm14DEAE10DD -0,1	4	12,97 ± 3,02	11,74 ^C	10,96	17,42	
CHm14DEAE10DD -0,5	4	19,41 ± 10,09	19,76 ^C	9,81	28,32	
CHm14DEAE10DD -1,0	4	58,19 ± 17,27	59,18 ^B	38,08	76,31	
CHm14DEAE14DD -0,05	4	14,68 ± 3,92	13,29 ^C	11,80	20,36	
CHm14DEAE14DD -0,1	4	6,67 ± 2,56	7,32 ^{CD}	3,04	9,01	
CHm14DEAE14DD -0,5	4	9,41 ± 2,98	8,61 ^{CD}	6,82	13,59	
CHm14DEAE14DD -1,0	4	40,12 ± 2,49	40,57 ^B	37,08	42,26	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações antifúngicas a 0,05.

4.7. Estudo do efeito da presença de grupos dodecila na quitosana

Para analisar a influência da presença de grupos dodecila no índice de inibição do *A. flavus* e do *A. parasiticus* foram realizados ensaios microbiológicos com o derivado CH-DD nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 g L⁻¹. Os resultados mostrados na Tabela 12 evidenciam o efeito positivo da presença de

grupos dodecila na cadeia da quitosana, potencializando a atividade antifúngica do biopolímero. O derivado CH-DD, possuindo 3% de grupos dodecila, atingiu aproximadamente 43% de índice de inibição no ensaio feito contra o *A. flavus* e aproximadamente 31% no ensaio contra o *A. parasiticus*, na concentração de 1,0 g L⁻¹. Com a análise da Tabela 12 e Figuras 36 e 37 é possível observar que o aumento da concentração do derivado CH-DD também aumenta o índice de inibição dos fungos assim como o verificado nos demais ensaios microbiológicos feitos.

Tabela 12. Índices de Inibição dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* em presença do polímero CH-DD.

Micro-organismo	Concentração do polímero CH-DD (g L ⁻¹)			
	0,05	0,1	0,5	1,0
<i>A. flavus</i>	12,36 ± 4,98	29,42 ± 2,76	27,84 ± 2,15	43,17 ± 0,99
<i>A. parasiticus</i>	11,95 ± 1,70	11,35 ± 2,89	23,18 ± 2,45	31,86 ± 1,65

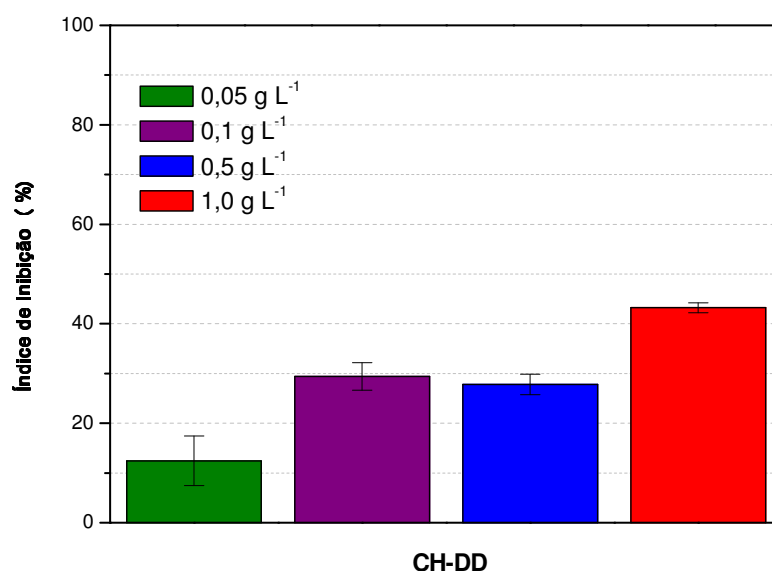


Figura 36. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. flavus* para o derivado de quitosanas CH-DD em concentrações crescentes.

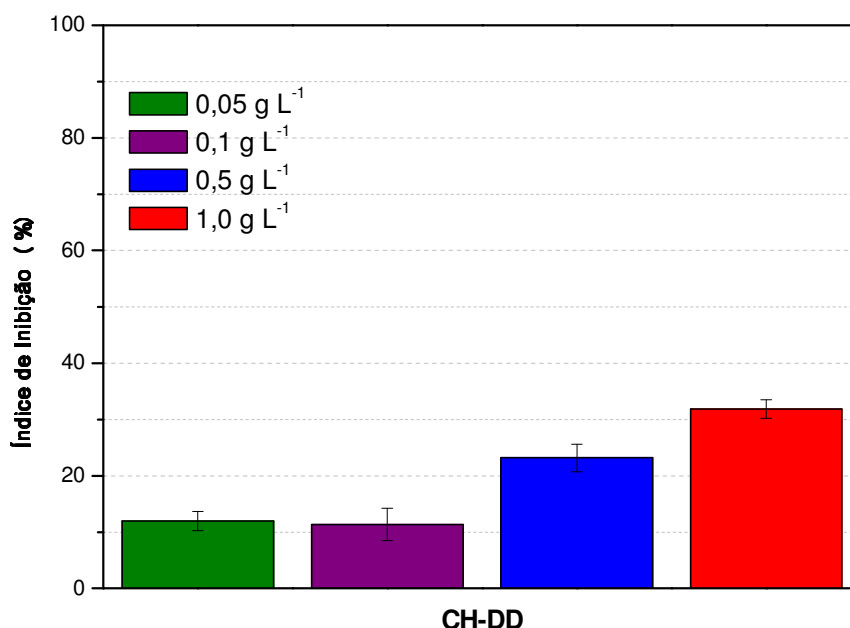


Figura 37. Índice de inibição em porcentagem para o fungo *A. parasiticus* para o derivado de quitosanas CH-DD em concentrações crescentes.

4.8. Microscopia confocal de fluorescência à laser

As imagens obtidas por meio dessa técnica para os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* (Figura 38) indicam que nos comprimentos de onda de excitação utilizados não houve fluorescência do material de estudo na ausência do fluoróforo rodamina, mas foi possível a observação da célula fúngica inoculada em presença de quitosana derivatizada. Por meio da observação das imagens pode-se concluir que a quitosana interage com as hifas dos fungos, entretanto não foi possível determinar se o polímero interage também com os constituintes intracelulares dos micro-organismos.

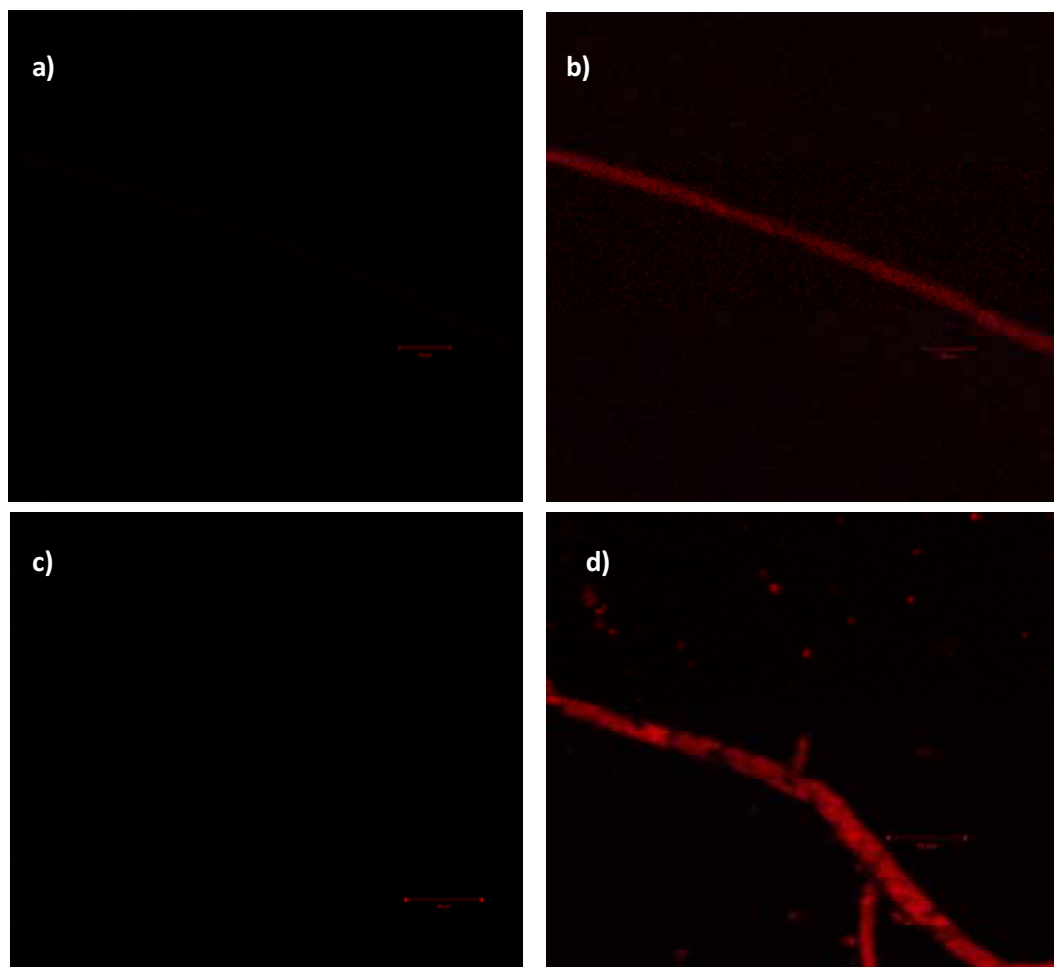


Figura 38. Imagens das lâminas contendo as células dos fungos a) *A. flavus* na ausência de quitosana ligada à rodamina, b) *A. flavus* na presença do grupo fluoróforo, c) *A. parasiticus* na ausência de quitosana ligada à rodamina e d) *A. parasiticus* na presença do grupo fluoróforo. As imagens estão na escalas: 10 μm para a) e b); 20 μm para c) e d) (Adaptado de PEDRO, 2013).

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o procedimento de síntese utilizado é viável para obtenção de derivados de quitosana, tanto com grupamentos DEAE quanto com grupamentos dodecila, como confirmado pela técnica de IV, com diferentes graus de substituição. Além disso, os graus de substituição e o grau médio de desacetilação podem ser determinados com boa precisão utilizando-se a técnica de RMN-H.

Os estudos em solução mostraram que em baixas concentrações os derivados anfifílicos se auto-associam para formar domínios hidrofóbicos. A CAC dos polímeros se mostrou dependente da massa molecular e do grau de substituição dos grupos hidrofóbicos presentes na estrutura polimérica.

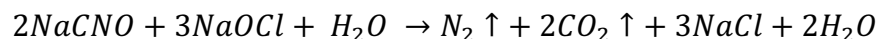
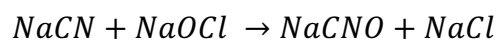
Os resultados dos ensaios microbiológicos contra o fungo *A. flavus* demonstraram a eficiência dos derivados de quitosana como biofungicidas, sendo a concentração e a massa molecular do polímero fatores importantes na inibição do micro-organismo. Os ensaios microbiológicos contra o fungo *A. parasiticus* mostraram que a concentração também é importante na inibição desse micro-organismo.

Os testes microscópicos evidenciaram a interação da quitosana com a hifa dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, entretanto, não foi possível determinar se há interação do polímero com os constituintes presentes no interior das células fúngicas.

6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO PROJETO

Todos os resíduos gerados nas etapas de desenvolvimento do projeto foram devidamente tratados antes de seus descartes e os resíduos que não puderam ser tratados foram devidamente armazenados para o encaminhamento dos mesmos ao entreposto de resíduos dessa instituição. A seguir estão descritos os procedimentos dos tratamentos para os resíduos mais problemáticos obtidos:

- As águas de lavagem da quitosana desacetilada, 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;
- A primeira água de diálise das quitosanas modificadas com grupamentos dodecila, contendo cianeto devido a utilização do agente redutor cianoboroidreto de sódio, foi tratada com excesso de hipoclorito de sódio (50% em mols) em pH básico permanecendo sob agitação constante por 12 horas, seguida do abaixamento do pH com HCl não muito concentrado até o pH próximo de 7,0 para o posterior descarte na rede pública de esgoto. A seguir é apresentada a reação de degradação do cianeto com hipoclorito a gás nitrogênio, gás carbônico, cloreto de sódio e água.



- As soluções contendo pireno, resultantes das análises de espectroscopia de fluorescência, foram armazenadas e identificadas para serem encaminhadas ao entreposto de resíduos;
- Todos os resíduos gerados durante os ensaios microbiológicos foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos antes de serem descartados.

7. REFERÊNCIAS

AKCELRUD, L., Massa Molar Viscosimétrica Média. *Fundamentos da ciência dos polímeros*. Taubaté, p. 227- 233, 2007. Disponível em <<http://books.google.com.br/books?id=3wJHvsGcjl4C&pg=PA227&lpg=PA227&dq=equa%C3%A7%C3%A3o+de+markhouwink&source=bl&ots=&sig=b9JrV7AsDr6glrEWOMLnbccoc&hl=ptBR#v=onepage&q=equa%C3%A7%C3%A3o%20de%20markhouwink&f=false>>. Acesso em: 18 de set. **2012**.

AL-HETAR, M. Y., ABIDIN, M. A. Z., SARIAH, M., WONG, M. Y., Antifungal Activity of Chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 120, 2434–2439, **2011**.

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*, v. 2, 27-34, **2007**.

BCL® - Indústria Argentina. Disponível em <http://www.bimarloga.com.ar/site/index.php?page=shop.product_details&flypage=shop.flypage&product_id=1092&category_id=117&manufacturer_id=0&option=com_virtuemart&Itemid=1>. Acesso em: 12 de dez. **2012**.

BENHABILES, M. S., SALAH, R., LOUNICI, H., DROUICHE, N., GOOSEN, M. F. A., MAMERI, N., Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste, *Food Hydrocolloids*, v. 29, p. 48-56, **2012**.

BRUGNEROTTO, J., DESBRIERES, J., ROBERTS, G., RINAUDO, M., Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography, *Polymer*, v. 42, p. 9921-9927, **2001**.

CAMPANA-FILHO, S. P., DE BRITO, D., CURTI, E., ABREU, F. R., CARDOSO, M. B., BATTISTI, M. V., SIM, P. C., GOY, R. C., SIGNINI, R., LAVALL, R. L., Extração, Estruturas e Propriedades de α - e β -Quitina, *Química Nova*, v. 30, nº 3, p. 644-650, **2007**.

CAMPANA-FILHO, S. P., SIGNINI, R., Efeito de aditivos da desacetilação da Quitosana, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, nº 4, p. 169-173, **2001**.

CAVALCANTI, J. A., DE FREITAS, J. C. R., DE MELO, A. C. N., FREITAS-FILHO, J. R., Agrotóxicos: Uma Temática para o Ensino de Química, *Química Nova na Escola*, v. 32, nº 1, **2010**.

CHANG, P. -K., EHRLICH, K. C., What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*? *International Journal of Food Microbiology*, v. 138, p. 189–199, **2010**.

CHANG, P. -K., MATSUSHIMA, K., TAKAHASHI, T., YU, J., ABE, K., BHATNAGAR, D., YUAN, G. F., KOYAMA, Y., CLEVELAND T. E., Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research, *Appl Microbiol Biotechnol*, 76:977 – 984, **2007**.

COPETTI, M. V., IAMANAKA, B. T., PEREIRA, J. L., FUNGARO, M. H., TANIWAKI, M. H., Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa, *International Journal of Food Microbiology*, v. 148, p. 141-144, **2011**.

COTA-ARRIOLA, O., CORTEZ-ROCHA, M. O., ROSAS-BURGOS, E. C., BURGOS-HERNÁNDEZ, A., LÓPEZ-FRANCO, Y. L., PLASCENCIA-JATOMEA, M., Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1, *Polymer International*, v. 60, p. 937-944, **2011**.

DAMIAN, C., BEIRÃO, L. H., FRANCISCO, A., ESPÍRITO SANTO, M. L. P., TEIXEIRA, E., Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais, *Alim. Nutr.* Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, **2005**.

DESBRIERES, J., MARTINEZ, C., RINAUDO, M., Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 19, p. 21-28, **1996**.

DOS SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R., Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 4, 242-249, **2003**.

GORAYEB, T. C. C., *Avaliação das condições críticas para o surgimento de aflatoxina na cadeia de processamento de amendoim (Arachis Hypogaea L.)*, IBILCE, UNESP, **2007**.

GOY, R. C., DE BRITO, D., ASSIS, O. B. G., A Review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 19, nº 3, p. 241-247, **2009**.

GUO, Z., XING, R., LIU, S., ZHONG, Z., JI, X., WANG, L., LI, P., The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity, *Carbohydrate Polymers*, 71, 694-697, **2008**.

JIA, Z. S., SHEN, D. F., XIE, W. L., Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan, *Carbohydrate Research*, 333(1), 1- 6, **2001**.

JUNG, B., KIM, C., CHOI, K., LEE, Y. M., KIM, J., *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 72, p. 1713, **1999**.

KAWASHIMA, L. M., Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, **2004**.

KIM, C. H., CHUN, H. J., A Synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro, *Polymer Bulletin*, v. 42, 25-32, **1999**.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., STALPES, J. A., *Dictionary of Fungi*, 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, 771, **2008**.

KLICH M. A., PITT J.I., A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs, *CSIRO Division of Food Processing*, North Ryde, NSW, **1988**.

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, p. 51 – 63, **2010**.

KUMAR, M. N. V. R., A review of chitin and chitosan applications, *React. Func. Polym.*, 46, 1–27, **2000**.

Li, X. F., FENG, X. -Q., YANG, S., WANG, T. -P, SU, Z. -X., Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Againsts *Aspergillus niger*, *Iranian Polymer Journal*, v. 17, n° 11, p. 843 – 852, **2008**.

LIU, H., DU, Y.M., WANG, X.H., SUN, L.P., Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *Int. J. Food Microbiol.* 95, 147–155, **2004**.

MATHUR, N. K., NARANG, C. K., Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942, **1990**.

MICOTOXINAS. *Food Ingredients Brasil*, n° 7, p. 32-40, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 18 out. **2012**.

MOURA, C., MUSZINSKI, P., SCHIMIDT, C., ALMEIDA, J., PINTO, L., Quitina e Quitosana produzidos a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto, *Vetor*, Rio Grande, 16(1/2): 37-45, **2006**.

MOURA, M. J. Aplicações do quitosana em liberação controlada de fármacos: algumas considerações, *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n° 14, p. 1489, **2012**.

NASÁRIO, F. D., Síntese, Caracterização e Estudo da Interação de Derivados Catiônicos de Quitosana com Vesículas de DPCC, Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química Ambiental), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, **2010**.

PALMA-GUERRERO J, HUANG I-C, JANSSON H-B, SALINAS J, LLORCA-LOPEZ LV., Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner, *Fungal Genet Biol.*, 46:585–594, **2009**.

PALMA-GUERRERO J, JANSSON H, SALINAS J, LOPEZ-LLORCA, JV., Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *J Appl Microbiol.*, 104:541– 553, **2008**.

PEDRO, R. O., Síntese de Novos Derivados de Quitosana para Aplicação como Biofungicida contra os Fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, 93 f. Dissertação de mestrado (Mestre em Química), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, **2013**.

PEDRO, R. O., 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*, artigo aceito, **2013**.

PHILIPPOVA, O. E., VOLKOV, E. V., SITNIKOVA, N. L., KHOKHLOV, A. R., DESBRIERES, J., RINAUDO, M., Two Types of Hydrophobic Aggregates in Aqueous Solutions of Chitosan and Its Hydrophobic Derivative, *Biomacromolecules*, v. 2, p. 483-490, **2001**.

PICOLA, I. P. D., Estudo físico-químico de nanopartículas de DNA com derivados de quitosana contendo grupos fosforilcolina, 119 f. Dissertação de mestrado (Mestre em Biofísica Molecular), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, **2009**.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., *Aspergillus* and related teleomorphs, In: PITT, J. I., Fungi and food spoilage, London: Chapman & Hall, 339-416, **1997**.

RABEA, E. I., BADAWY, M. E. -T., STEVENS. C. V., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W., Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of action, *Biomacromolecules*, Vol. 4, No. 6, **2003**.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M. C. C., Efeitos da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queriroz”, **2006**.

SANTANA, A. N., AB’SABER, A. M., TEODORO, W. R., CAPELOZZI, V. L., BARBAS, C. S. V., Trombose em artérias pulmonares pequenas e médias em granulomatose de Wegener: Um estudo com microscopia confocal por varredura a laser, *Jornal Brasileiro Pneumologia*, v. 36(6), p. 724-730, **2010**.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I., Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços, *Química Nova*, v. 29, n° 4, p. 776-785, **2006**.

SILVA, M. A. D. R., Utilização do pireno como uma sonda fluorescente na investigação de ligações intermoleculares em misturas binárias de solventes, Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, **2002**.

SKOOG, D. A., HOLLER, J. F., NIEMAN, T. A., Princípios de análise instrumental, Bookman, **2002**.

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html> Acesso em: 20 nov. **2012**.

TIERA, M. J., QIU, X.-P., BECHAOUCH, S., SHI, Q., FERNANDES, J. C., WINNIK, F. M., Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions, *Biomacromolecules*, v. 7, p. 3151-3156, **2006**.

TOLAIMATE, A., DESBRIERESB, J., RHAZIA, M., ALAGUIC, A., VINCENDOND, M., VOTTEROD, P., On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin, *Polymer*, v. 41, p. 2463-2469, **2000**.

TOMMERAAS, K., VARUM, K. M., CHRISTENSEN, B. E., SMIDSROD, O., Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, *Carbohydrate Research*, v. 333, p. 137-144, **2001**.

VIEIRA, N. A. B., MOSCARDINI, M. S., TIERA, V. A. D. O., TIERA, M. J., Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study, *Carbohydrate Polymers*, v. 53, p. 137-143, **2003**.

XU, J., ZHAO, X., HAN, X., DU, Y., Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 220-228, **2007**.

ZHANG, B., WANG, D. F., LI, H. Y., XU, Y., ZHANG, L., Preparation and properties of chitosan-saybean trypsin inhibitor blend film with anti-*Aspergillus flavus* activity. *Industrial Crops and Products*, 29, 541-548, **2009**.

YOO, S. -H., LEE, K. H., LEE, J. -S., CHA, J., ARK, C. S., LEE, H. G., Physicochemical Properties and Biological Activities of DEAE-Derivatized *Sphingomonas Gellan*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 6235 - 6239, **2005**.

8. APÊNDICE

CÓPIA

< Uso exclusivo do INPI >	
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL 21/09/2012 018120035352 11:31 DESP  BR 10 2012 023859 4 ... ao protocolo	Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO **Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

1.2 Qualificação

1.3 CNPJ/CPF: 48031918000124

1.4 Endereço Completo: Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo/SP

1.5 CEP: 01049010 1.6 Telefone: 1133937903 1.7 Fax: 1133937900

1.8 E-mail: auin@unesp.br

☐ continua em folha anexa**2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Privilégio de Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):BIOFUNCIDA A BASE DE DERIVADOS ANFIFÍLICOS CATIONICOS DE QUITOSANA E
MÉTODO DE OBTENÇÃO DO MESMO☐ continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº Data de Depósito:**5. Prioridade:** ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s):

6.1 Nome: Marcio José Tiera

6.2 Qualificação: Professor Universitário 6.3 CPF: 048217880850

6.4 Endereço completo: R. Cristóvão Colombo, 2255, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto/SP

6.5 CEP: 15054000 6.6 Telefone: 1133937903 6.7 Fax:

6.8 E-Mail: auin@unesp.br

☒ continua em folha anexa**INPI**

Formulário 181 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 12)

11 AIN 099

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☒ 7.1. Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos aos da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: Leopoldo Campos Zuaneti

9.2 CNPJ/CPF: 29059847830

9.3 API/OAB: 235031

9.4 Endereço completo: Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 273, Bl. 2, B. Funda, São Paulo/SP

9.5 CEP: 01140070

9.6 Telefone: 1133937903

9.7 Fax: 1133937900

9.8 E-Mail: zuaneti@reitoria.unesp.br

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

☐ Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia):

☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fls.

☐ Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1	fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	17	fls.
☒	11.2 Procuração	1	fls.	☒	11.6 Reivindicações	3	fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade		fls.	☒	11.7 Desenhos	5	fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho		fls.	☒	11.8 Resumo	1	fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar):						
	Termo de Cessão de Direitos (1 fls.); Decreto de Nomeação do Reitor (1 fls.)						

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 30 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Local e Data

Assinatura e Carimbo

LEOPOLDO C. ZUANETI
Assessor Jurídico
Agência Unesp de Inovação

CONTINUAÇÃO CAMPO 6. Inventor (72):

2. VERA APARECIDA DE OLIVEIRA TIEPRA, brasileira, solteira, professora universitária, inscrita no CPF/MF sob o nº 051.318.128-30, portadora do documento de identidade RG nº 14.724.847, SSP/SP residente e domiciliada em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, na Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, CEP 15.054-000; 3. JULIANA DOS SANTOS GABRIEL, brasileira, solteira, estudante, inscrita no CPF/MF sob o nº 380.038.718-24, portadora do documento de identidade RG nº 44.551.552-1, SSP/SP, residente e domiciliada em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, na Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, CEP 15.054-000; 4. RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO, brasileiro, solteiro, estudante, inscrito no CPF/MF sob o nº 364.414.128-29, portador do documento de identidade RG nº 40.002.313-1, SSP/SP, residente e domiciliado em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, na Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, CEP 15.054-000.

fim do documento

São Paulo, 19 de setembro de 2012.



LEOPOLDO C. ZUÑETTI
Assessor Jurídico
Agência Unesp de Inovação