



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

RICCHARD HALLAN FÉLIX VIEGAS DE SOUZA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE DERIVADOS
ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA: ESTUDO *in vitro* CONTRA
OS FUNGOS *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***

**São José do Rio Preto
2013**

Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE DERIVADOS
ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA: ESTUDO *in vitro* CONTRA OS
FUNGOS *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.

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

São José do Rio Preto
2013

Souza, Ricchard Hallan Félix Viegas de

Síntese, caracterização e estudo de derivados anfifílicos de quitosana: estudo *in vitro* contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* /Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

f.75: il.31 ; 30 cm.

Orientadora: Vera Aparecida de Olivera Tiera

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

1. Quitosana. 2. Biofungicida. 3. *Aspergillus*. I.Tiera, Vera Aparecida de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

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

Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE DERIVADOS
ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA: ESTUDO *in vitro* CONTRA OS
FUNGOS *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.

Banca Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
USP – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Bisinoti
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
18 de janeiro de 2013

**Dedico esse trabalho ao meu
amado pai, Sr. Placidino
Félix de Souza, falecido no
dia 30 de julho de 2012,
vítima de um câncer de
pulmão.**

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Vera Aparecida de Olivera Tiera por ter aceitado me orientar, por ter acreditado em mim, por me apoiar e ao Prof^o Dr^o Márcio José Tiera pelo apoio e dedicação. Pessoas fantásticas que possuem ética, grande coração, amigos mesmo.

A minha família, em especial a minha mulher, Sanderli, ao meu pai, Placidino, a minha mãe, Antonia, a minha sogra, Maria, e a minha filha, Maria Regina por terem me apoiado e possibilitado a continuidade dos meus estudos.

A todos os amigos de laboratório por terem me ajudado, suportado todo esse tempo e me ensinado muito, em especial ao Rafael, Juliana Gabriel, Mirelle e Hellen.

Aos professores do Departamento de Química e Ciências Ambientais do IBILCE que ajudaram na minha aprendizagem e formação.

Ao Prof^o Dr^o Vanildo Luiz Del Bianchi por ter cedido seu laboratório por tanto tempo e por ter nos auxiliado na pesquisa com os fungos.

Ao Prof^o Dr^o Fernando Fertoni e a Prof^a Dr^a Ieda Ap. Pastre Fertoni, vizinhos e parceiros de pesquisa.

Ao Prof^o Dr^o Maurício Boscolo e ao Olavo do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica pelas análises de Infravermelho.

Ao Prof^o Dr^o Sebastião Roberto Taboga do Laboratório de Microscopia e Microanálise por ter nos auxiliado na técnica de microscopia.

Ao Vinicius da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pelos espectros de RMN¹H.

Ao Prof^o Dr^o José Geraldo Nery por ceder o liofilizador no momento que mais precisávamos.

À CAPES pela bolsa concedida, proporcionando o desenvolvimento e conclusão do meu mestrado.

A FAPESP pelo apoio financeiro, possibilitando a compra de materiais e equipamentos para o laboratório.

E, a todos aqueles que me ajudaram de forma direta ou indireta em todas as dimensões.

“Se o propósito for nobre, para cada novo desafio, você terá a sua disposição novas ferramentas para superá-lo. Basta ter coragem e vontade de seguir em frente. Agindo sempre com cosmoética, amparo não faltará”.

Autoria própria

RESUMO

A quitosana e seus derivados têm se mostrado muito atrativos para a indústria de alimentos, visando principalmente a sua conservação. No presente trabalho foram sintetizados e caracterizados derivados de quitosana contendo grupos quaternários de amônio com proporções crescentes de grupos hidrofóbicos com o objetivo de investigar a atividade fungicida desses derivados contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que são um problema na contaminação do amendoim e outros grãos. Os derivados foram sintetizados usando quitosana desacetilada e a reação foi realizada em duas etapas, sendo a primeira a quaternização do polímero com brometo de propiltrimetilamônio seguido da reação de aminação redutiva com dodecildeído. Os derivados foram caracterizados por RMN¹H e os graus de substituição pelo grupo dodecil foram variados para melhorar a atividade antifúngica dos derivados. A atividade antifúngica da quitosana desacetilada e seus derivados foi testada variando-se a concentração dos polímeros de 0,1 a 1,0 g/L. Os resultados mostraram que a quitosana substituída com grupos propil exibiu uma baixa inibição contra o fungo *Aspergillus flavus*, resultado similar àquele obtido com quitosana desacetilada. Quanto aos derivados anfílicos com conteúdo crescente de grupos dodecil, observou-se um aumento no índice de inibição com o aumento da concentração e do conteúdo hidrofóbico. A partir de 0,5 g/L os derivados anfílicos contendo de 10% a 30% de grupos dodecil e 83% de grupos quaternários inibiram completamente o crescimento do fungo. Resultados similares foram obtidos no estudo de inibição do fungo *Aspergillus parasiticus*.

Palavras chave: quitosana, derivados anfílicos de quitosana, biofungicida, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*.

ABSTRACT

*Chitosan and its derivatives have been shown very attractive for the food industry, mainly targeting its conservation. In this study were synthesized and characterized chitosan derivatives containing quaternary ammonium groups with increasing proportions of hydrophobic groups in order to investigate the antifungal activity of these derivatives against the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* that are a problem in the contamination of peanuts and other grains. The derivatives were synthesized using deacetylated chitosan and the reaction was carried out in two steps, first the quaternization of the polymer with propyltrimethylammonium bromide followed by reductive amination reaction with dodecylaldehyde. The derivatives were characterized by ^1H NMR and the degree of substitution by the group dodecyl was varied to enhance the antifungal activity of the derivatives. The antifungal activity of deacetylated chitosan and their derivatives was tested by varying the concentration of the polymers 0.1 to 1.0 g/L. The results showed that chitosan substituted with propyl groups exhibited a low inhibition against the fungus *Aspergillus flavus*, a result similar to that obtained with chitosan deacetylated. Regarding the amphiphilic derivatives with increasing content of dodecyl groups, we observed an increase in the rate of inhibition with increased concentration and hydrophobic content. Since 0.5 g/L amphiphilic derivatives containing from 10% to 30% dodecyl groups and 83% of quaternary groups inhibited completely growth of the fungus. Similar results were obtained in the study of inhibition of *Aspergillus parasiticus*.*

Keywords: *chitosan, amphiphilic derivatives of chitosan, biofungicide, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*.*

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da estrutura química da quitina e quitosana ...	19
Figura 2. Representação esquemática da estrutura reprodutiva dos fungos <i>Aspergillus</i>	21
Figura 3. Detalhe de uma espiga de milho com colônias de fungos.	22
Figura 4. Estruturas das aflatoxinas produzidas pelos fungos <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	24
Figura 5. Parede celular de um fungo do gênero <i>Aspergillus</i>	26
Figura 6. Estrutura da Quitosana com Rodamina – QDR	35
Figura 7. Reações de obtenção dos derivados de quitosana	36
Figura 8. Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada.....	38
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H para a quitosana desacetilada	39
Figura 10. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para as quitosanas comercial e desacetilada	40
Figura 11. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada	41
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H para o derivado QPO	42
Figura 13. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e o derivado QPO83.....	43
Figura 14. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica do derivado quaternário QPO83	44
Figura 15. Espectros de RMN ¹ H dos derivados anfifílicos de quitosana QPO83D10, QPO83D15 e QPO83D30	45
Figura 16. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada, os derivados QPO83 e QPO83D10.....	47
Figura 17. Gráfico de inibição fúngica da quitosana desacetilada	48
Figura 18. Índices de inibição fúngica em função da concentração para os derivados quaternários anfifílicos.....	52
Figura 19. Ensaio realizado com o derivado QPO83D10 (7º dia)	53

Figura 20. Gráfico com os valores de inibição fúngica para a quitosana desacetilada.....	56
Figura 21. Índices de inibição fúngica em função da concentração para os derivados quaternários anfifílicos.....	59
Figura 22. Ensaio realizado com o derivado QPO50D10 (7º dia)	61
Figura 23. Interação da QDR com hifas e conídios dos fungos	62
Figura 24. Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada.....	70
Figura 25. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada	71
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H para a QD	71
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H para o derivado QPO	72
Figura 28. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e o derivado QPO50.....	72
Figura 29. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica do derivado QPO50	73
Figura 30. RMN ¹ H dos derivados quaternários anfifílicos.....	74
Figura 31. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e os derivados QPO50 e QPO50D10.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais fontes naturais de quitina e quitosana.....	18
Tabela 2. Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados	20
Tabela 3. Reagentes utilizados no trabalho	29
Tabela 4. Relação molar, grau de substituição, viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada e seus derivados	46
Tabela 5. Estatística descritiva dos índices de inibição da quitosana desacetilada – QD..	48
Tabela 6. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário QPO83.....	50
Tabela 7. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D10	50
Tabela 8. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D15	51
Tabela 9. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D30.	51
Tabela 10. Relação molar, grau de substituição, viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da QD e seus derivados.....	54
Tabela 11. Estatística descritiva dos índices de inibição para a quitosana desacetilada.....	55
Tabela 12. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário QPO50.....	57
Tabela 13. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D10	57
Tabela 14. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D15	58
Tabela 15. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D30	58

Lista de Siglas e Abreviações

ATR-IV - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier - Reflectância Total Atenuada

BDA - Batata Dextrose Ágar

BPTA - Bometo de 3-Bromo-propiltrimetilamônio

DA - Dodecialdeído

IV - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GA - Grau de Acetilação

GD - Grau de desacetilação

GS - Grau de Substituição

GSD - Grau de substituição de dodecil

QC - Quitosana Comercial

QD - Quitosana Desacetilada

QPO - Quitosana - Propiltrimetilamônio

QPO50 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 50%

QPO50D10 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 50% - Dodecil 10%

QPO50D15 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 50% - Dodecil 15%

QPO50D30 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 50% - Dodecil 30%

QPO83 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 83%

QPO83D10 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 83% - Dodecil 10%

QPO83D15 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 83% - Dodecil 15%

QPO83D30 - Quitosana - Propiltrimetilamônio 83% - Dodecil 30%

QPOD - Quitosana - Propiltrimetilamônio - Dodecil

RMN¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Quitosana.....	18
1.2 Fungos aspergillus.....	20
1.3 Ação biofúngica da quitosana	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivos específicos	28
3. METODOLOGIA.....	29
3.1 Materiais	29
3.2 Sínteses	29
3.2.1 Desacetilação da quitosana.....	29
3.2.2 Síntese do derivado quaternário de quitosana	30
3.2.3 Síntese do derivado quaternário dodecilado de quitosana	30
3.3 Caracterização dos polímeros	31
3.3.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN ¹ H)	31
3.3.2 Potenciometria.....	31
3.3.3 Espectroscopia de infravermelho.....	31
3.3.4 Determinação da massa molar viscosimétrica.....	32
3.4 Parte microbiológica	32
3.4.1 Preparo das soluções para os ensaios microbiológicos	32
3.4.2 Ensaios microbiológicos	33
3.4.3 Cálculo do índice de inibição dos fungos.....	33
3.4.4 Estatística	34
3.4.5 Microscopia.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Obtenção dos derivados anfífilos de quitosana.....	36
4.2 Caracterização da quitosana e seus derivados	37
4.2.1 Grau de desacetilação da quitosana - titulação potenciométrica.....	37
4.2.2 Grau de desacetilação da quitosana por RMN ¹ H	38

4.2.3 Massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada	41
4.3. Caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana	41
4.3.1. Caracterização do derivado quaternário	41
4.3.2 Massa molar viscosimétrica do derivado QPO83	43
4.4 Caracterização do derivado dodecilado QPOD.	44
4.4.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	44
4.4.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)	46
4.5 Atividade fungicida contra o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	47
4.5.1 Efeito da quitosana desacetilada.	47
4.5.2 Efeito fungicida dos derivados quaternários anfifílicos	49
4.6 Atividade fungicida contra o fungo <i>Aspergillus parasiticus</i>	54
4.6.1. Efeito da quitosana desacetilada	54
4.6.2 Efeito fungicida dos derivados quaternários anfifílicos	56
4.7 Microscopia.....	62
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7. ANEXO	68
7.1 Quitosana desacetilada - QD	70
7.1.1 Titulação potenciométrica	70
7.1.2 Massa molar viscosimétrica.....	71
7.1.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ¹ H	71
7.2 Derivado quaternário – QPO50.....	72
7.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN ¹ H	72
7.2.2 Infravermelho (IV)	72
7.2.3 Massa molar viscosimétrica.....	73
7.3 Derivados quaternários anfifílicos	74
7.3.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênios – RMN ¹ H	74
7.3.2 Infravermelho (IV)	75

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos avanços foram alcançados na agricultura, sobretudo na eficiência da produção de alimentos e no controle de pragas. Com a necessidade do desenvolvimento sustentável, com o cuidado de não causar danos ao meio ambiente, novos defensivos agrícolas que não agredem a natureza se tornaram imprescindíveis nos dias atuais. Dentro desse contexto, estudos têm mostrado que a quitosana e seus oligômeros apresentam amplo espectro de aplicação, destacando principalmente o uso como fungicidas e bactericidas (UENO *et al.*, 1997). Dessa forma a atividade antifúngica da quitosana contra diferentes grupos de microrganismos tais como bactérias, fungos e leveduras tem recebido uma atenção especial nos últimos anos

Os fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente o *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus* são considerados economicamente importantes (Council for Agricultural Science e Technology, 2003). Eles estão relacionados com problemas na produção e no consumo de grãos pelo mundo todo, pois produzem micotoxinas, como as aflatoxinas, causadoras de necrose aguda, cirrose e carcinoma de fígado em diversas espécies de animais e humanos (MAIA *et al.*, 2011). A atividade metabólica dos fungos cresce com o aumento da umidade dos grãos. A partir de um determinado valor limite, denominado “umidade crítica”, esta atividade é muito acelerada, promovendo a degradação de proteínas, de carboidratos, de fosfolipídios e outros compostos, originando substâncias lipossolúveis que contaminam o óleo, afetando a cor, o aroma e o sabor (PEDRO *et al.*, 2012).

A ocorrência das aflatoxinas é maior no amendoim porque este é o substrato preferido pelos fungos. Além do amendoim, a aflatoxina pode ser encontrada em muitos outros produtos, tais como milho, centeio, cevada e outros cereais, sementes oleaginosas, nozes, castanha-do-brasil e produtos curados, entre outros.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal a modificação estrutural da quitosana pela introdução de grupos hidrofílicos catiônicos e de grupos hidrofóbicos, procurando-se otimizar a atividade biofungicida deste polissacarídeo.

1.1 Quitosana

A quitosana é um polímero obtido a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo de origem animal encontrado abundantemente na natureza por ser o principal constituinte do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A Tabela 1 lista as principais fontes naturais de quitina e quitosana. A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose, no entanto, é pouco solúvel e tem baixa reatividade.

Tabela 1. Principais fontes naturais de quitina e quitosana.

Animais Marinhos	Insetos	Microrganismos
Anelídeos	Escorpiões	Algas verdes
Moluscos	Aranhas	Leveduras
Lagosta	Formigas	Fungos
Camarão	Besouros	Esporos
Caranguejo		Algas Marrons
Krill		

A quitina e a quitosana são compostas por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ em porções variáveis, na qual a quitina é composta predominantemente por grupos acetamidos enquanto que a quitosana possui predominantemente grupos amino (CAMPANA e SIGNINI, 2001) (Figura 1). Desse modo, o parâmetro para diferenciar a quitina da quitosana é o grau de desacetilação (GD), sendo esse determinado por meio de técnicas analíticas como a Potenciometria, Espectroscopia na região do Infravermelho, Condutimetria, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios, entre outras (CAMPANA e SIGNINI, 2001). Denomina-se quitosana quando o grau de desacetilação é maior que 50%. As vantagens de se obter quitosana com alto GD são: aumentar a sua reatividade, proporcionar modificações através de ligações de substituintes a partir dos grupos aminos livres e aumentar a sua atividade antifúngica. Alguns estudos relacionam o aumento da atividade antifúngica com o aumento do GD (TSAI *et al.*, 2004; ANDRES *et al.*, 2007).

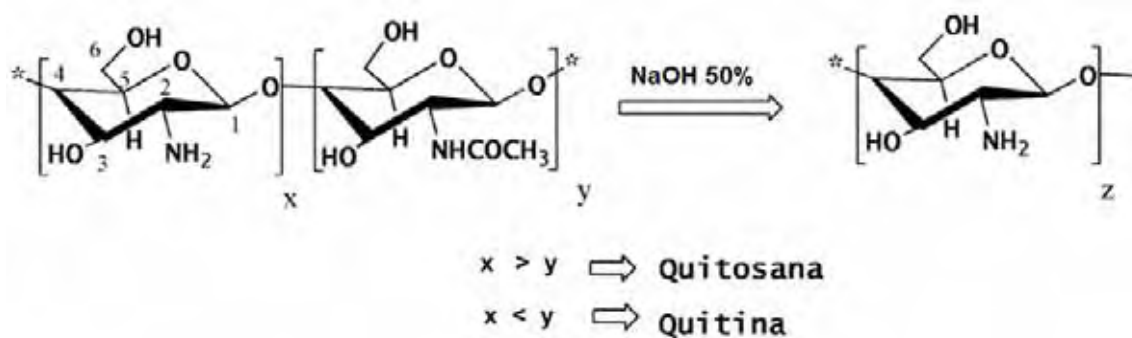


Figura 1. Representação da estrutura química da quitina e quitosana.

A quitosana é inicialmente caracterizada pela sua massa molar e pelo seu grau de desacetilação. O grau médio de desacetilação das quitosanas comerciais é de 84% e a massa molar pode variar de 30 kDa a 1000 kDa. Pode-se classificá-la como quitosana de baixa massa molar quando o valor é inferior a 50 kDa, de 50 kDa a 150 kDa como uma quitosana de massa molar média e acima de 150 kDa como uma quitosana de massa molar alta. É pouco solúvel em água, mas é solúvel em soluções diluídas de ácidos, onde ocorre a protonação dos seus grupos aminos livres ($-\text{NH}_3^+$), aumentando sua solubilidade (GOY *et. al.*, 2009).

A desacetilação da quitosana comercial (QC) para obtenção de quitosana com alto grau de desacetilação pode ser realizada em meio ácido ou alcalino, sendo o último o mais utilizado, já que as ligações glicosídicas são suscetíveis à hidrólise ácida (CAMPANA e SIGNINI, 2001). O alto grau de desacetilação é alcançado com sucesso por meio de hidrólise alcalina, mas a cadeia polimérica sofre degradação. Os principais fatores que influenciam na eficiência da desacetilação são: a) temperatura e tempo de reação; b) concentração da solução alcalina; c) razão quitosana/base; d) massa molar da quitosana; e) atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (ROBERTS, 1992; NO e MEYERS, 1997).

A quitosana tem sido amplamente estudada e a facilidade de formar derivados a partir da inserção de grupos químicos variados aos grupos aminos livres de sua cadeia polimérica faz dela uma substância com muitas aplicações no cotidiano. Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados têm sido propostas na literatura e são mostradas na Tabela 2, como por exemplo, a quelação de íons metálicos (SUN *et al.*, 2009), controle do colesterol (MALHOTRA e KAUSHIK, 2009), tratamento de efluentes (MILHOME *et al.*,

2009), inibição de fungos (GUO *et al.*, 2007) e bactérias (SADEGHI *et al.*, 2008), entre outras. Além disso, devido a sua estabilidade, facilidade de obtenção e baixa toxicidade a quitosana e seus derivados têm se mostrado muito atrativos para a indústria de alimentos (KONG *et al.*, 2010). A Coréia do Sul e o Japão permitem a adição desse biopolímero em alimentos desde 1995 e 1983 respectivamente, visando principalmente a preservação de alimentos (KONG *et al.*, 2010).

Tabela 2. Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados. Adaptado de Campana Filho, 2004.

Aplicações	Exemplos
Tratamento de água	Remoção de íons metálicos; agente floculante para retirada de proteínas, corantes e herbicidas; clarificação e filtração por membranas de quitosana.
Agricultura e processamento de alimentos.	Tratamento de sementes para inibição de fungos; formação de películas protetoras comestíveis para frutos; remoção de corantes em sucos cítricos; remoção de sólidos, β -caroteno e substâncias ácidas de sucos de maçã e de cenoura; clarificação de vinhos.
Medicina e biotecnologia	Formulações contra o colesterol; combate de células cancerígenas; agente de transfecção de genes; carreadora para transporte e liberação controlada de fármacos; tratamento da leucemia; preparação de lentes de contato; produção de membranas para diálise; agente anticoagulante sanguíneo.
Cosméticos	Produtos para tratamento de pele e cabelo.
Polpa e papel	Obtenção de papel isolante resistente ao envelhecimento; tratamento de superfícies celulósicas para aumentar a dureza sem alterar o brilho.

1.2 Fungos aspergillus

O *Aspergillus* foi catalogado em 1729 pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli. Observando o fungo no microscópio, lembrou-se de um aspergillum (borrifador de água santa) e deu esse nome em função da semelhança com o objeto. Existem mais de 200 espécies na natureza, sendo todas aeróbicas, pois crescem em ambientes ricos em oxigênio.

Os micélios de *Aspergillus* são constituídos basicamente por filamentos denominados hifas que podem se ramificar dando origem aos conidióforos. Os conidióforos são estruturas que sustentam as fiálides que possuem forma de garrafa e são responsáveis pela produção de conídios (Figura 2). Os conídios

são as estruturas responsáveis pela reprodução assexuada tanto em *Aspergillus flavus* quanto em *Aspergillus parasiticus*.

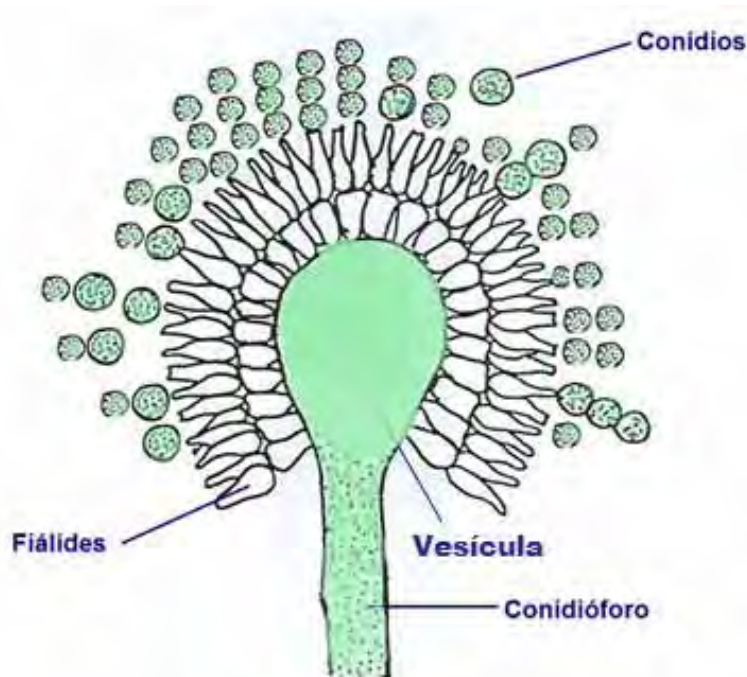


Figura 2. Representação esquemática da estrutura reprodutiva dos fungos *Aspergillus*. (Adaptado de PEDRO, 2012).

O *Aspergillus flavus* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família *Trichomaceae* (KIRK *et al.*, 2008). Esse microrganismo possui como característica o desenvolvimento de colônias esverdeadas quando na fase inicial e acinzentadas com a idade (PITT e HOCKINF, 1997, apud REIS, 2009, p 9). Além disso, segundo Reis (2009), esse fungo apresenta uma maior produção de aflatoxinas quando instalado em amendoim cujo crescimento se dá em solos ricos em zinco. 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). Esse fungo também apresenta colônias esverdeadas na fase inicial e amareladas com a idade. Além das espécies que estão agrupadas na seção *Flavi*, outras espécies também podem produzir aflatoxinas como, por exemplo, *Aspergillus ochraceoroseus* agrupado na seção *Ochraceorosei* (CHANG *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra o desenvolvimento de fungos *Aspergillus* numa espiga de

milho, onde é possível observar as colônias esverdeadas resultantes da proliferação do fungo.



Figura 3. Detalhe de uma espiga de milho com colônias de fungos. Adaptado de: <<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2005/9-19/aflatoxin.html>> Acesso em: 08.08.2012).

Os fungos produzem toxinas que apresentam propriedades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas, hepatotóxicas e imunossupressoras (LEWIS *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011). Um tipo em particular dessas toxinas é a aflatoxina, produzida principalmente por fungos do gênero *Aspergillus*, especialmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, que podem estar presentes em amendoim, milho, trigo, algodão, castanha, leite, ovos, queijo, figos e outros alimentos (PATERSON e LIMA, 2010).

As aflatoxinas estão entre as substâncias mais cancerígenas conhecidas e a ingestão de alimentos e sementes altamente contaminados pode provocar desde intoxicação aguda até a morte, dependendo da quantidade ingerida (PATERSON e LIMA, 2010). Vários tipos de aflatoxinas são produzidos por fungos *Aspergillus*, destacando-se os tipos B1, B2, G1 e G2 representados na Figura 4.

Somente as aflatoxinas B1 e B2 são produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus*, sendo que menos de 50% delas são toxicogênicas. O fungo *Aspergillus parasiticus* produz aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e todas são toxicogênicas (Klich & Pitt, 1988), sendo as do grupo 1 sempre mais tóxicas. O termo B vem do

inglês blue (azul em português) e faz referência a fluorescência de cor azul liberada por esse tipo de aflatoxina quando exposta a luz ultravioleta em 365 nm e o termo G vem do inglês green (verde em português), também devido ao mesmo fato. Existem ainda as aflatoxinas M1 e M2 que são encontradas no leite, urina e fezes de mamíferos, resultantes do metabolismo das toxinas B1 e B2 (PINHEIRO, 2004).

As aflatoxinas foram inicialmente detectadas em 1960 na Inglaterra, após a morte de 100.000 perus que ingeriram farelo de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) proveniente do Brasil (BLOUNT, 1961 apud REIS, 2009). Nesse episódio, o fungo *Aspergillus flavus* foi confirmado como responsável pela produção dessa toxina (BLOUNT, 1961 apud REIS, 2009).

Segundo Ehrlich *et al.*, (2005) as aflatoxinas não são essenciais para o crescimento dos fungos, são substâncias secundárias, no entanto, elas provavelmente são produzidas para remover o excesso de carbono presente no meio onde o fungo está crescendo (BU'LOCK, 1965), agir como sinal químico entre espécies (LILLEHOJ, 1991) e proteger o fungo contra hostilidades do meio em que se encontra.

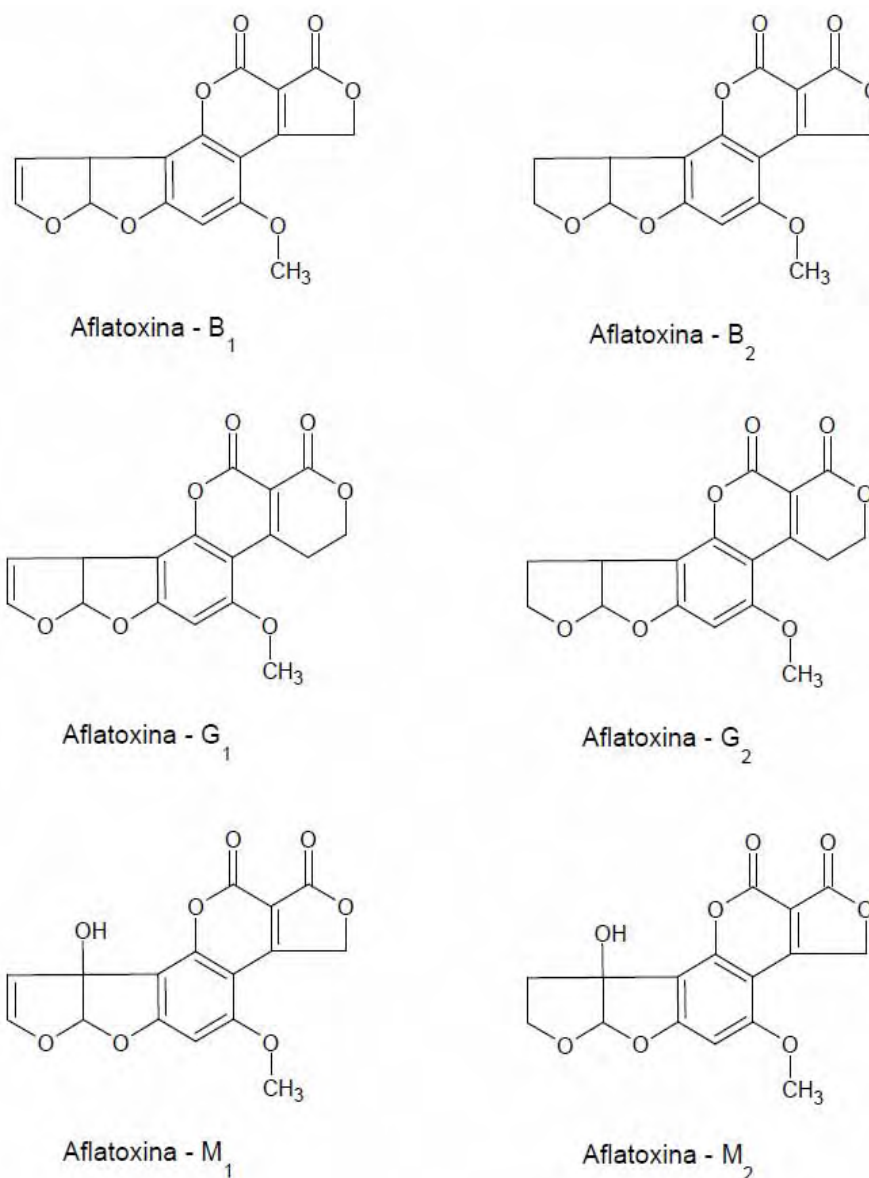


Figura 4. Estruturas das aflatoxinas produzidas pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Diante dessa realidade, a comunidade científica tem buscado cada vez mais encontrar fungicidas de origem natural para controlar o crescimento e desenvolvimento dos fungos do gênero *Aspergillus* e as suas micotoxinas (*mico* = fungo em grego, e *toxicum* = toxina em latim). Óleos essenciais, extratos vegetais e biopolímeros como quitina e quitosana são exemplos de compostos que podem ser utilizados como biofungicidas, os quais possuem como grande vantagem a baixa toxicidade aliada a biodegradabilidade, além de

serem renováveis e facilmente obtidos da natureza (EL-REFAIE KENAWY *et al.*, 2005), como descrito na Tabela 2.

1.3 Ação biofúngica da quitosana

A ação microbicida da quitosana depende de vários parâmetros como as características do microrganismo alvo, a massa molar, o grau de desacetilação (GD), os grupos substituintes presentes na cadeia polimérica e de fatores físicos como pH, temperatura e força iônica do meio onde a quitosana está sendo aplicada (KONG *et al.*, 2010). Quando aplicada em fungos, esse polímero atua inibindo a esporulação (HERNANDEZ-LAUZARDO *et al.*, 2008) e o crescimento e desenvolvimento de hifas (PEDRO *et al.*, 2012). No entanto, segundo o trabalho realizado por Chen e Chou (2005) envolvendo *S. aureus* e quitosana, a susceptibilidade do alvo a esse biofúngica está diretamente relacionada com as diferentes fases de crescimento do microrganismo. Ou seja, a carga superficial celular varia de acordo com a fase de crescimento do organismo alvo, influenciando, portanto, na eficiência da quitosana (TSAI e SU, 1999; KONG *et al.*, 2010).

O estudo do microrganismo alvo torna-se necessário para a criação de um biofúngica eficiente, entender o mecanismo de ação do biofúngica contra o fungo é um fator muito importante. A parede celular é o principal mecanismo de defesa e sobrevivência de alguns fungos. No caso dos fungos *Aspergillus*, 90% dela é constituída por polissacarídeos e proteínas, formando uma estrutura tridimensional que mantém sua integridade estrutural, proporcionando uma defesa física à célula e a protegendo de qualquer hostilidade do meio. (ABAD *et al.*, 2010). Foi detectado, também, uma camada adicional hidrofóbica na parte externa da parede celular de hifas e conídios. Essa camada hidrofóbia ajuda na dispersão dos conídios, na fixação do fungo ao solo, na adesão do conídio ao hospedeiro alvo (alvéolos do pulmão, por exemplo) e na defesa de ataques de outras células (LINDER *et al.*, 2005).

Vários estudos (KUMAR, *et al.*, 2005, TIKHONOV *et al.*, 2006) têm mostrado que quitosanas com baixas massas molares apresentaram atividade antimicrobiana maior. Como as massas molares são menores a mobilidade e a interação eletrostática com o microrganismo alvo são mais fáceis do que com

as quitosanas de massas molares maiores – a conformação e a ligação com a membrana celular são mais efetivas (KUMAR, *et al.*, 2005).

A presença de longa cadeia alifática na quitosana facilita a absorção e aumenta a atividade antifúngica da quitosana de baixa massa molar devido à interação hidrofóbica com as proteínas da parede celular (TIKHONOV *et al.*, 2006).

Assim, a ação da quitosana pode se dar por vários mecanismos, mas o mais aceito para explicar sua ação biofungicida, baseia-se na desestruturação da parede celular causada pela ação conjunta das interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o polímero, positivamente carregado, e macromoléculas com resíduos de carga negativa como os lipossacarídeos e proteínas (GOY *et al.*, 2009; MARTINEZ-CAMACHO *et al.*, 2010). A partir daí pode ocorrer o rompimento da parede celular, levando ao vazamento de proteínas e outros constituintes celulares (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004) (Figura 5) ou a formação de uma barreira externa que levará à redução de nutrientes essenciais para o desenvolvimento do fungo (ROLLER & COVILL, 1999) ou, ainda, a penetração da quitosana no núcleo da célula, inibindo a produção de mRNA e a síntese de proteínas (SEBTI, *et al.*, 2005).

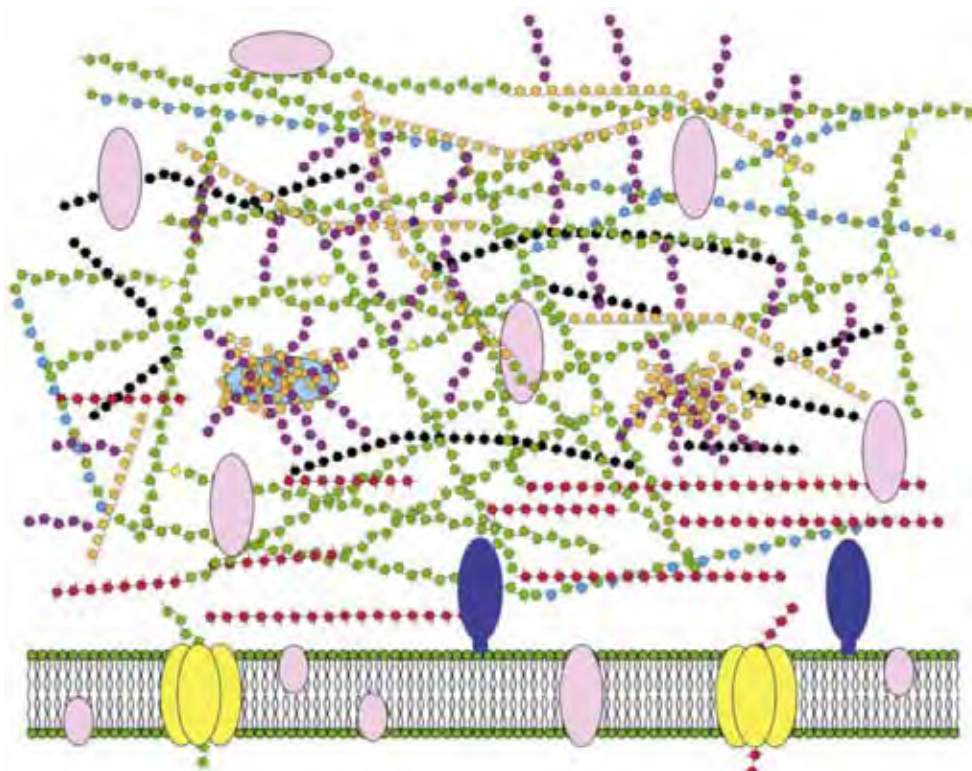


Figura 5. Esquema da parede celular de um fungo do gênero *Aspergillus*. Na parte superior o emaranhado tridimensional de polissacarídeos e proteínas; abaixo a membrana celular. Adaptado de Abad *et al.*, Rev. Iberoam. Micol., 2010.

Dentro deste contexto, o presente trabalho apresenta a obtenção de derivados quaternários de amônio com proporções crescentes de grupos hidrofóbicos com grande potencial de aplicação como biofungicida contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi sintetizar e caracterizar derivados anfifílicos de quitosana para avaliar sua ação biofungicida contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

2.1. Objetivos específicos

- Síntese e caracterização dos derivados quaternários anfifílicos de quitosana;
- Estudo do efeito da composição dos derivados de quitosana na eficiência como biofungicida contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*;
- Estudo do efeito da concentração dos polímeros na inibição do crescimento fúngico;
- Estudo do mecanismo de interação entre o polímero e o fungo, utilizando-se a técnica de microscopia de fluorescência.

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados no trabalho estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados no trabalho.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Quitosana	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda.
BPTA	Aldrich Chemical Co.
Dodecilaldeído	Aldrich Chemical Co.
Etanol	Synth
Ácido Acético	Synth
Cloreto de Deutério	Aldrich Chemical Co.
Tween® 80	Synth
Batata Dextrose Agar - BDA	Acumedia Manufacteres, Inc. Lansing
Hidróxido de Sódio	Dinâmica
Água Deionizada	Gehaka, modelo DG

3.2 Sínteses

3.2.1 Desacetilação da quitosana

Uma massa de 8,0 g de quitosana comercial foi adicionada em 100 mL de água deionizada sob agitação. Em seguida, 8,0 mL de ácido acético foram adicionados gota-a-gota e, depois, mais 300 mL de água. A solução foi mantida sob agitação magnética por 12 horas, até completa solubilização. Então, foi transferida para um balão de 3 bocas equipado com termômetro, condensador e manta aquecedora. A temperatura foi elevada para 100 °C (± 5 °C), seguida da adição de aproximadamente 100 mL de solução de hidróxido de sódio 50 % em massa, obtendo-se um precipitado finamente dividido. O sistema foi mantido em refluxo por 90 minutos sob atmosfera de nitrogênio. O conteúdo resultante foi transferido para um béquer de 4 L contendo 2L de água deionizada a 60 °C e em seguida teve seu volume completado com água deionizada à temperatura ambiente.

O produto resultante foi lavado com água destilada 2 vezes ao dia por um período de 5 dias, até atingir pH neutro, tomando-se o cuidado de neutralizar a água residual antes do descarte. Em seguida, a quitosana foi filtrada e todo o processo foi repetido. O produto final obtido foi lavado com acetona e seco em estufa a 50 °C até secagem completa. A quitosana desacetilada foi caracterizada por Titulação Potenciométrica, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), Infravermelho com Transformada de Fourier - Reflectância Total Atenuada (ATR-IV) e teve sua massa molar determinada por Viscosimetria.

3.2.2 Síntese do derivado quaternário de quitosana

Uma massa de 4,0 g de quitosana desacetilada (QD) foi dissolvida em 80 mL de água e transferida para um balão equipado com condensador, agitador e um sistema de banho com temperatura controlada. Separadamente, 24,5 g do sal brometo de 3-bromo-propiltrimetilamônio (BPTA) foram dissolvidos em 50 mL de água e a solução resultante foi adicionada à solução de quitosana. A reação foi conduzida por 72 horas a 55 °C, monitorando-se o pH para mantê-lo próximo de 8. O produto obtido foi purificado por diálise por 5 dias em membrana de 6 kDa, sendo no primeiro dia em solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹ e nos outros em água deionizada.

O derivado de quitosana obtido (QPO) foi recuperado por liofilização e caracterizado por RMN¹H, ATR-IV e teve sua massa molar determinada por Viscosimetria.

3.2.3 Síntese do derivado quaternário dodecilado de quitosana

O derivado resultante da primeira síntese, QPO, foi dividido em 3 amostras, cada uma com, aproximadamente, 1,0 g de massa. Então, quantidades diferentes de dodecilaldeído (DA) foram adicionadas a cada uma para obter derivados com diferentes proporções hidrofóbicas. O primeiro com 10% de DA, o segundo 15% e o terceiro 30%.

As amostras do derivado QPO foram dissolvidas em 110 mL de solução de ácido acético 0,2 mol.L⁻¹. Em seguida, 76 mL de etanol foram adicionados

sob agitação vigorosa, resultando em soluções homogêneas e claras. O pH das soluções foram ajustados para 5,1. Às suspensões foram adicionadas diferentes quantidade de DA. As misturas foram agitadas por 24 horas à temperatura ambiente. Os produtos obtidos foram dialisados por 3 dias em água deionizada e recuperados por liofilização. Os resíduos de cianeto resultantes da diálise foram neutralizados com solução de hipoclorito de sódio 2% e depois descartados.

3.3 Caracterização dos polímeros

3.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênios (RMN¹H)

Amotras de 20 mg de quitosana e seus derivados foram dissolvidas em 1 mL de água deuterada e 10 µL de cloreto de deutério. As soluções foram mantidas sob agitação até completa solubilização e transferidas para tubos de RMN¹H. Os espectros de RMN¹H foram realizados na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, num espectrômetro Bruker de 500 MHz à temperatura de 70 °C.

3.3.2 Potenciometria

Amostras de 40,0 mg de quitosana desacetilada (QD) foram previamente secas na estufa a 50 °C até atingirem valores constantes (Método de Tolaimate, 2000). Em seguida, foram dissolvidas em, aproximadamente, 10 mL de uma solução padronizada de HCl 0,0996 mol.L⁻¹. A solução resultante foi titulada por Potenciometria com uma solução padronizada de NaOH 0,0974 mol.L⁻¹.

3.3.3 Espectroscopia de infravermelho

Amostras de quitosana com massa de aproximadamente 2 mg foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 h, para eliminação de água. Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos num espectrofotômetro Perkin Elmer

Spectrum 100, no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do Departamento de Química e Ciências Ambientais desta Instituição (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP / São José do Rio Preto – SP).

3.3.4 Determinação da massa molar viscosimétrica

As medidas de viscosidade dos polímeros foram realizadas em um viscosímetro calibrado modelo Cannon-Ubbelohde 9722M-50 (Cannon Instr. Co.) imerso em banho de água termostatizado. Os polímeros foram solubilizados em tampão ácido acético 0,3 mol.L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,5 e temperatura de 25 ± 0,05 °C. Antes da realização das medidas, as amostras foram mantidas por 10 minutos em banho para equalização da temperatura. As medidas foram feitas em quadruplicatas e as viscosidades calculadas pela equação de Mark-Houwink (Equação 1).

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

Onde: $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (calculada de acordo com os dados das medidas), K_m e a são constantes dependentes do grau de acetilação da quitosana com valores 0,079 e 0,796 - Grau de acetilação 2% (BRUGNEROTTO *et. al.*, 2001), respectivamente, e $\overline{M}_v$ é a massa molar viscosimétrica média (ROBERTS & WANG, 1996).

3.4 Parte microbiológica

3.4.1 Preparo das soluções para os ensaios microbiológicos

As soluções dos polímeros foram preparadas solubilizando-se uma determinada massa de polímero - de acordo com a concentração desejada - em 50 mL de solução de ácido acético 1% (V/V). O pH foi ajustado para 5,0 por meio da adição de solução de NaOH concentrado. De acordo com a literatura,

a faixa de pH compreendida entre 5 e 6 é a ideal para o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Os meios de cultura batata dextrose ágar (BDA) foram preparados em erlenmeyers, adicionando-se 3,9 g de BDA em 50 mL de água deionizada. Em seguida, as soluções foram adicionadas ao meio de cultura BDA para a obtenção das concentrações finais desejadas que variaram de 0,10 g.L⁻¹ a 1,00 g.L⁻¹. Todas as soluções de BDA foram esterilizadas em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

3.4.2 Ensaios microbiológicos

Para os ensaios, alçadas de esporos retiradas de cepas previamente cultivadas (*Aspergillus flavus* - CBMAI 0190 e *Aspergillus parasiticus* – CBMAI – 0551) foram dispersas em, aproximadamente, 1,5 mL de Tween 80 a 0,1% estéril. Utilizando-se uma pipeta automática, 2 µL da solução de esporos foram depositados no centro de cada placa de Petri (aproximadamente 10⁶ conídios), resultando numa colônia fúngica de, aproximadamente, 2 mm de diâmetro. Um controle foi feito somente com BDA e fungo para efeito de comparação. O crescimento radial da colônia de fungos foi medido com um paquímetro e o resultado obtido no sétimo dia (fim do primeiro ciclo de crescimento do microrganismo) foi utilizado para comparação. Os ensaios foram feitos em quadruplicatas e as placas foram distribuídas na incubadora de forma aleatória. A temperatura de incubação foi mantida em 25 ± 0,05 °C.

3.4.3 Cálculo do índice de inibição dos fungos

O índice de inibição do desenvolvimento e crescimento dos fungos foi determinado pela relação entre o diâmetro das colônias nas placas de Petri com BDA e as placas contendo soluções de polímeros e BDA. A inibição fúngica foi calculada de acordo com o proposto por Guo *et al.*, (2008):

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

(2)

onde D_a é o diâmetro das colônias das placas com polímero e D_b é o diâmetro das placas com BDA (controle).

3.4.4 Estatística

Para avaliar estatisticamente a atividade fungicida dos polímeros foram utilizadas estatísticas descritivas com cálculo de média, desvio padrão, mediana e valores de mínimo e máximo para os índices de inibição. Devido à realização de ensaios com quatro amostras, as medianas dos índices de inibição foram comparadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

O teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis (homenagem a William Kruskal e Allen Wallis) é um método não paramétrico que analisa se as amostras pequenas são provenientes de uma mesma distribuição. Ele é utilizado quando se deseja comparar mais de duas amostras independentes. Esse teste informa se há ou não diferença significativa nas amostras, mas não pode informar quais amostras são diferentes. Nesse caso, utiliza-se o pós-teste de Dunn para se verificar qual das amostras apresenta diferença significativa para as outras.

3.4.5 Microscopia

Com o objetivo de observar a interação da quitosana com os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* foram realizados ensaios utilizando-se uma solução de quitosana desacetilada 0,5 g/L de massa molar 27 kDa marcada com rodamina® (QDR – Figura 6). Após três dias de incubação, amostras dos fungos foram retiradas e analisadas num microscópio equipado com lentes Carl Zeiss, empregando-se aumento de 63 x, através da técnica de Microscopia Confocal a Laser de Fluorescência no Laboratório de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto-SP.

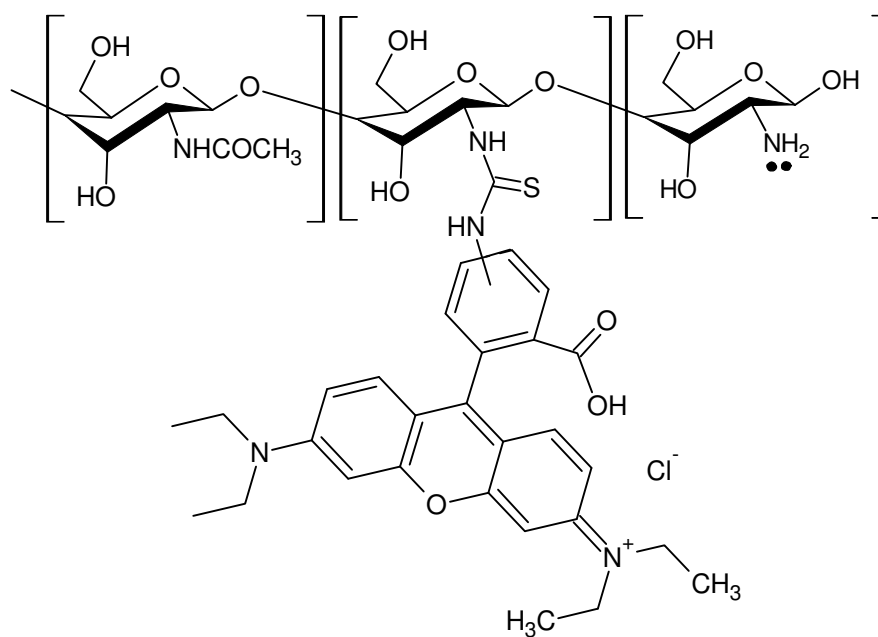


Figura 6. Estrutura da Quitosana com Rodamina® – QDR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos derivados anfílicos de quitosana

A preparação das quitosanas modificadas com BPTA e alquiladas com DA está apresentada na Figura 7. A síntese envolveu três etapas, a desacetilação da QC, seguida pela quaternização com BPTA e a reação de alquilação via redução da base de Schiff.

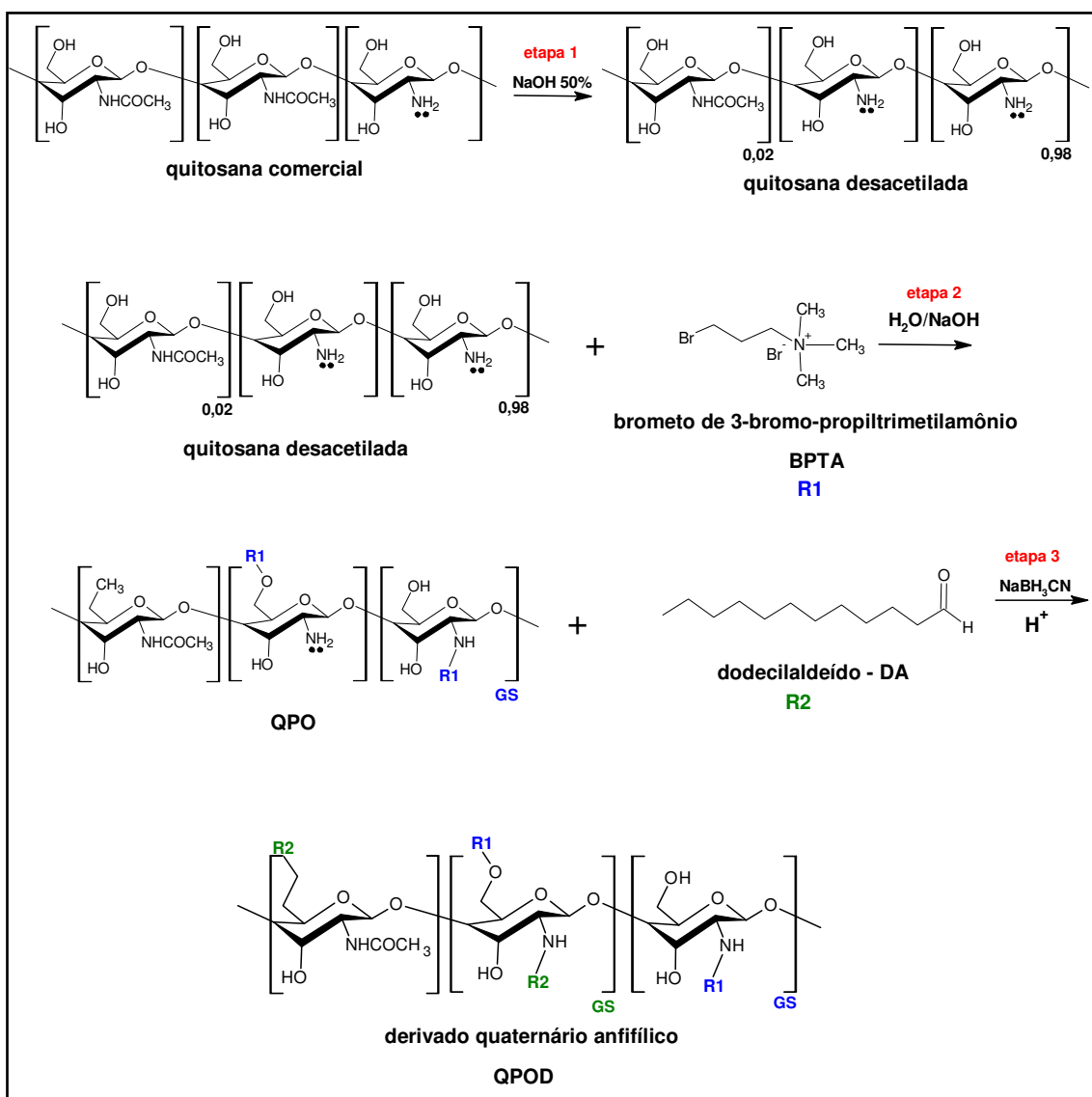


Figura 7. Esquema das reações de obtenção dos derivados de quitosana.

A primeira e segunda etapas correspondem às reações de substituição nucleofílica. Na terceira etapa é realizada a alquilação redutiva que envolve a formação de uma imina, seguida da reação com borocianohidreto de sódio (NaBH_3CN).

4.2 Caracterização da quitosana e seus derivados

4.2.1 Determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana por titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi realizada de acordo com o item 3.3.2 descrito na parte experimental. A Figura 8 mostra a curva potenciométrica e a derivada primeira da titulação da quitosana desacetilada. No gráfico observa-se dois ponto de inflexão: o primeiro corresponde a neutralização do excesso de ácido, e o segundo à desprotonação dos grupos aminos. O volume de NaOH necessário para desprotonação é utilizado para calcular o grau de desacetilação, por meio da Equação 3. Utilizando-se os dados da Figura 8, o GD calculado foi de 92,5%.

$$\text{GD} = \left[\frac{\text{VNaOH} \times m\text{NaOH}}{(\text{VNaOH} \times m\text{NaOH}) + \frac{(m\text{Q} - (\text{VNaOH} \times m\text{NaOH} \times 161,22))}{203,22}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde: **VNaOH** é o volume da base, **mNaOH** é a concentração da base em mol.L^{-1} e **mQ** é a massa de quitosana utilizada na titulação.

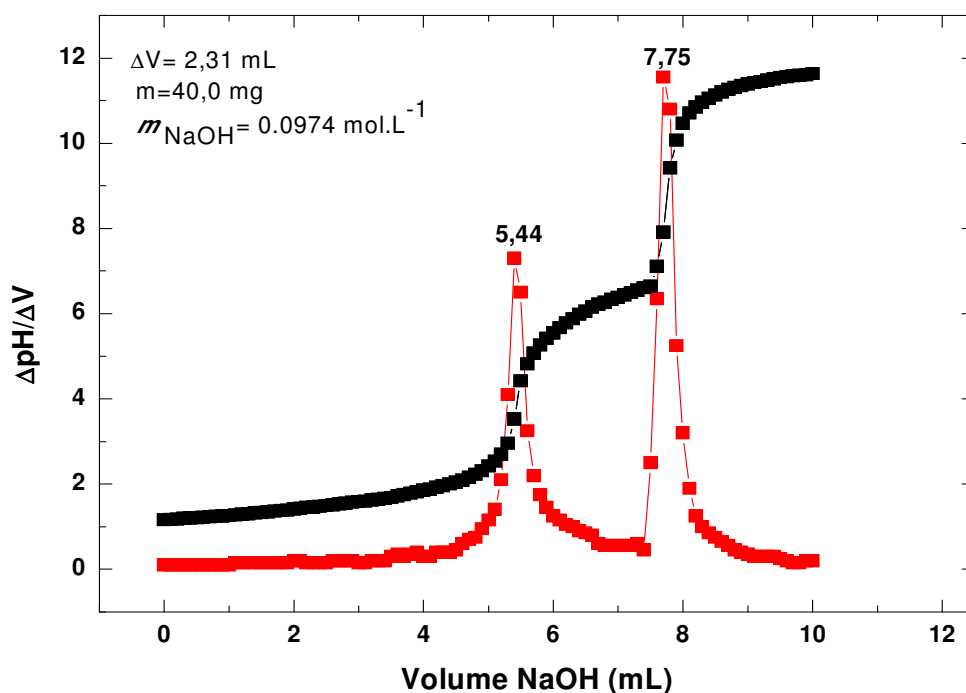


Figura 8. Curva de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada. Em preto: variação de pH em função do volume de NaOH; em vermelho: derivada primeira.

4.2.2 Determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

A Figura 9 mostra o espectro de RMN¹H para a quitosana desacetilada utilizada como material de partida para a síntese dos derivados anfifílicos. Os sinais localizados em 5,40 ppm correspondem aos átomos de hidrogênio ligados ao carbono anomérico C1. Os sinais localizados, aproximadamente, na região de 4,0 a 4,5 ppm correspondem aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono 3, 4, 5 e 6 da unidade glucopiranosose, o sinal centrado em 3,5 ppm corresponde ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel e o sinal centrado em 2,51 ppm corresponde aos átomos de hidrogênio pertencentes aos grupos acetamido.

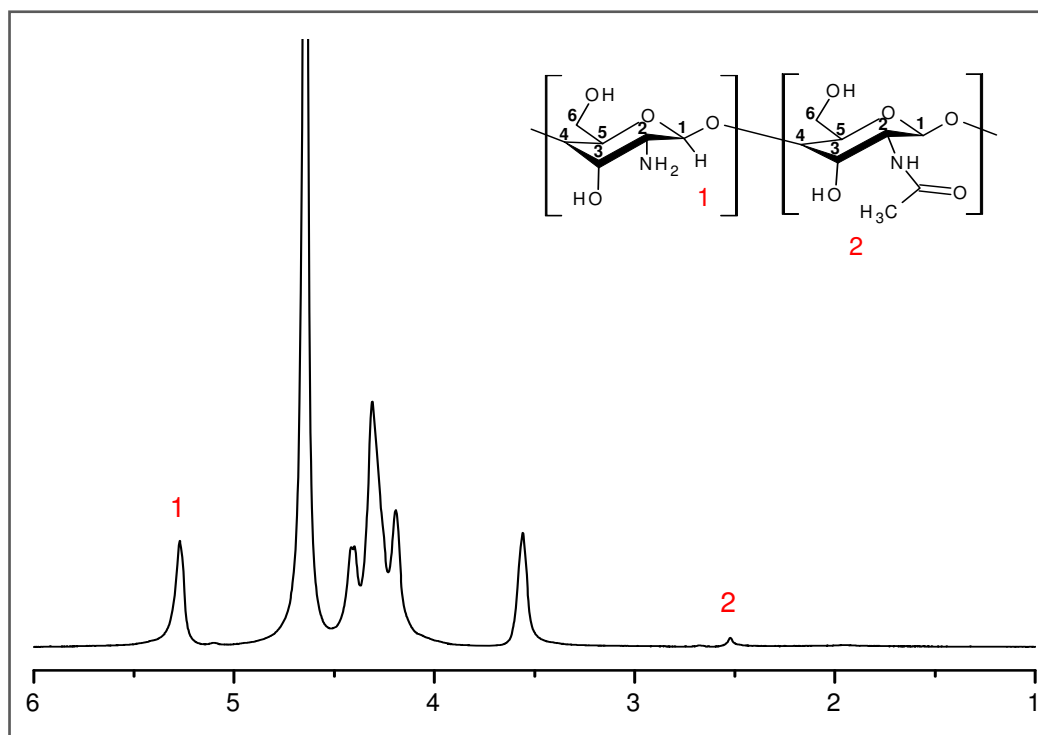


Figura 9. Espectro de RMN¹H para a quitosana desacetilada.

Deste espectro o grau de desacetilação foi determinado utilizando-se os picos em 5,40 ppm (1) e 2,51 ppm (2) através da Equação 4, fornecendo um valor de 98%.

$$\text{GD}\% = \left[1 - \left(\frac{I_2}{3I_2 + I_1} \right) \times 100 \right] \quad (4)$$

A Figura 10 mostra os espectros de IV para as quitosanas comercial e desacetilada. Na região de 3400 cm⁻¹ é possível observar que ambas apresentam bandas características devido às vibrações de estiramento axial dos grupos hidroxilas presentes nos polímeros, estando sobrepostas ao estiramento das ligações nitrogênio-hidrogênio.

Alguns trabalhos na literatura (DOMSZY & ROBERTS, 1985; BAXTER, *et al.*, 1992; BRUGNEROTTO, *et al.*, 2001; DOS SANTOS, *et al.*, 2003) citam um pico intenso e característico em 1650 cm⁻¹ e um segundo pico discreto em 1625 cm⁻¹ da banda de vibração do grupamento amida no substituinte acetamido para diferenciar a quitosana comercial (maior quantidade de grupos

acetamidos) da quitosana desacetilada (menor quantidade de grupos acetamidos). Assim, a quitosana comercial apresenta esses dois picos bem visíveis, enquanto na quitosana desacetilada são mais discretos.

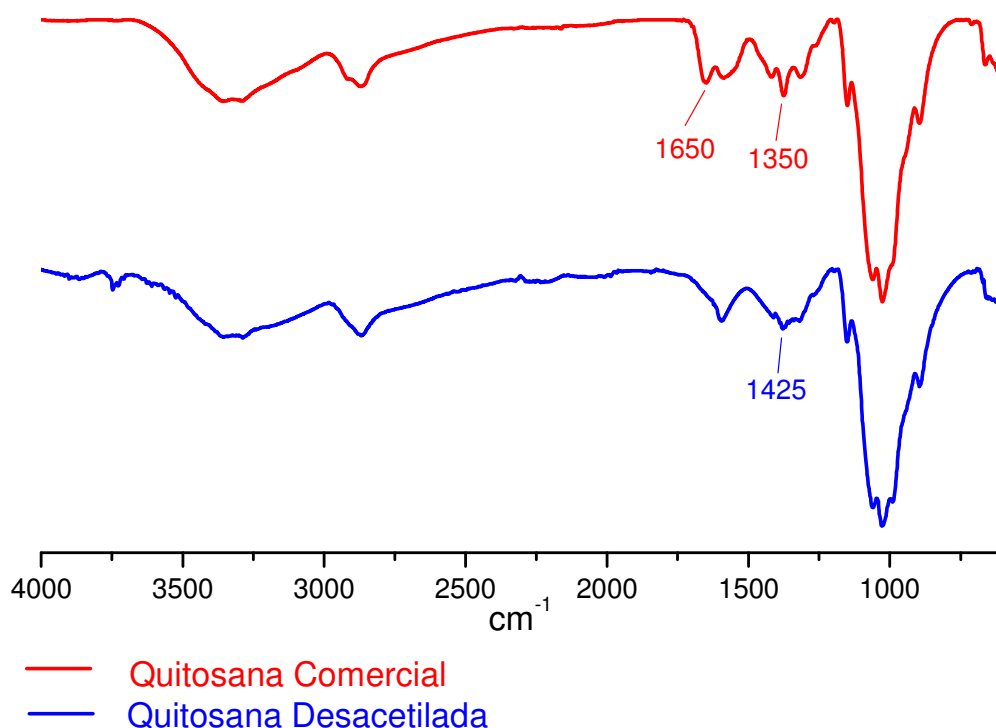


Figura 10. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para as quitosanas comercial e desacetilada.

A região compreendida entre 1450 e 1300 cm⁻¹ também é utilizada para diferenciar a quitosana comercial da desacetilada (DOS SANTOS, *et al.*, 2003). Por volta da região que vai de 1308 a 1385 cm⁻¹ ocorre a deformação axial da ligação carbono-nitrogênio do grupo amida, enquanto a deformação da ligação carbono-nitrogênio do grupo amino ocorre por volta de 1425 cm⁻¹. Essas características diferentes demonstram a eficiência no processo de desacetilação.

4.2.3 Determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada

As medidas viscosimétricas para a determinação da massa molar da quitosana desacetilada foram realizadas de acordo com o item 3.3.4. Com os dados da Figura 11 determinou-se a viscosidade intrínseca e o valor de 219,89 foi obtido. Esse dado, juntamente com as constantes, permite estimar a massa molar viscosimétrica utilizando-se a equação 1 de Mark Haouwink-Sakurada, obtendo-se um valor de $M_v = 21,3$ kDa.

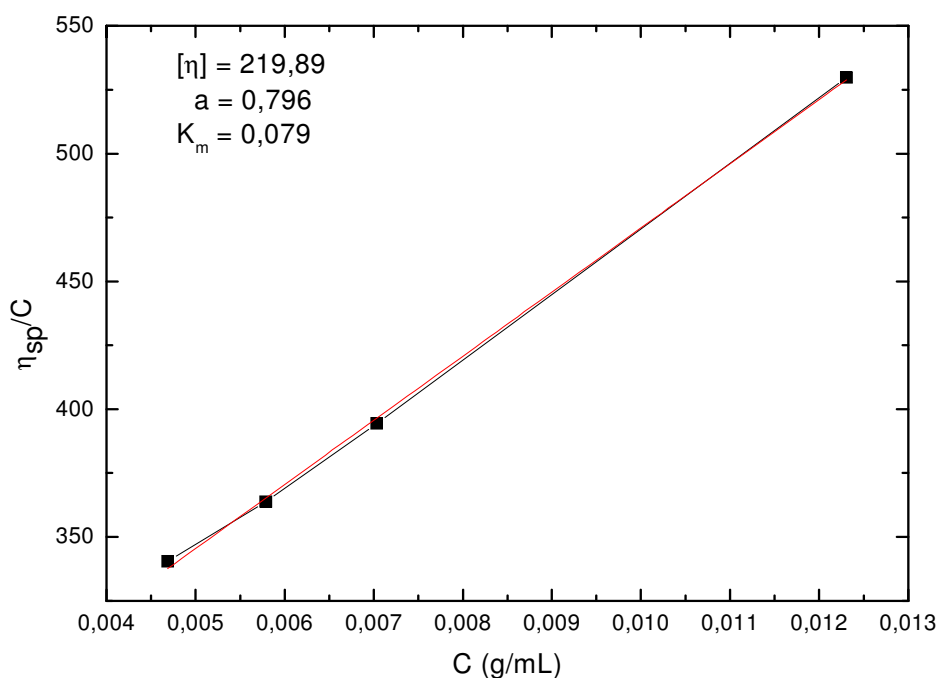


Figura 11. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada.

4.3. Caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana

4.3.1. Caracterização do derivado quaternário

Na Figura 12 é apresentado o espectro de RMN¹H do derivado QPO. Para analisar o espectro, foi considerada a estrutura da quitosana dividida em duas partes, sendo que a unidade substituída está representada pelo subíndice s.

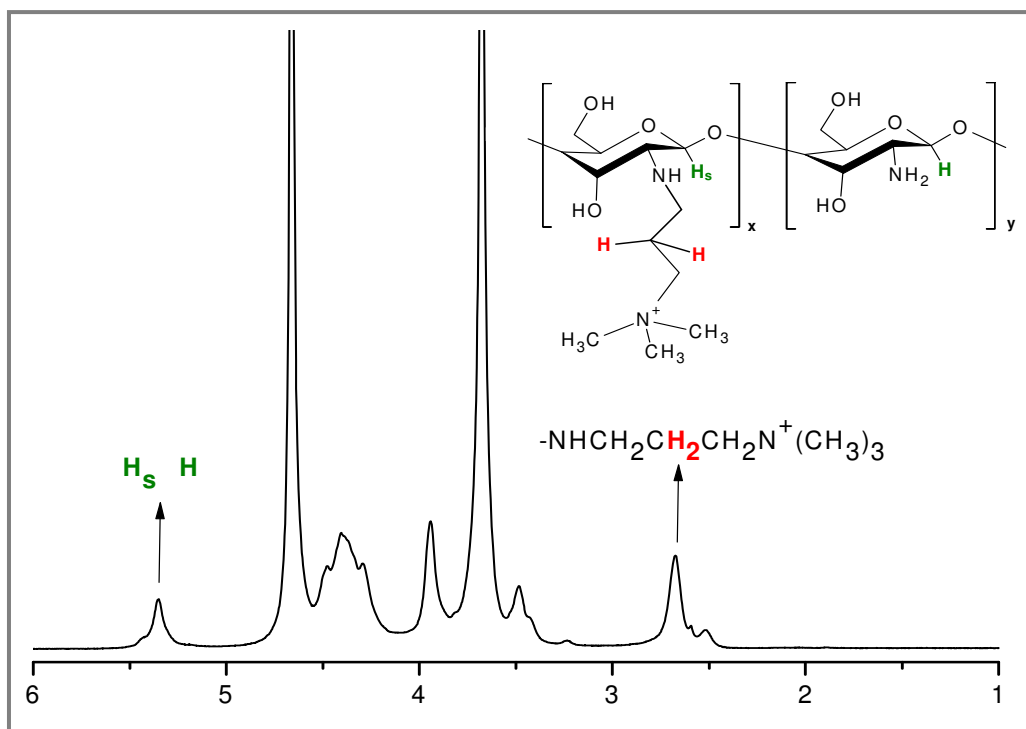


Figura 12. Espectro de RMN¹H para o derivado QPO.

Pode se observar no espectro de RMN¹H que além dos picos característicos dos prótons da quitosana, o sinal característico e intenso em 2,8 ppm refere-se ao grupo metileno intermediário do grupo propil (indicado em vermelho), o que mostra a incorporação de BPTA à cadeia de quitosana. A porcentagem de propiltrimetilamônio ligada à cadeia foi calculada comparando-se a integração do sinal do grupo metileno com a integração correspondente aos prótons anoméricos substituídos e não substituídos em 5,4 ppm. Observa-se também que o pico do próton anomérico substituído sobrepõe ao não substituído, ou seja, não houve uma separação definida, e sim um alargamento do pico. A relação utilizada para o cálculo da porcentagem é dada pela Equação 5.

$$GS\% = \left(\frac{\frac{I_{CH_2}}{2}}{I_{H_1} + I_{H_{1s}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde I_{CH_2} é a área integrada do pico em 2,8 ppm e $I_{H_1} + I_{H_{1s}}$ corresponde a área integrada do pico referente aos hidrogênios anoméricos das unidades

substituídas e não substituídas. Assim, empregando-se a equação 5, obteve-se 83 % de substituição e o derivado passou a ser denominado QPO83.

O derivado também foi caracterizado por IV e na Figura 13 são mostrados os espectros da quitosana desacetilada e do derivado QPO83. Na região compreendida entre a faixa de 1400 e 1500 cm^{-1} estão bem visíveis no espectro do QPO83 as bandas características das deformações angulares das ligações de carbono-hidrogênio dos grupos CH_2 (1467 cm^{-1}) e CH_3 (1450 cm^{-1}) que, por sua vez, não aparecem no espectro da QD (SILVERSTEIN E WEBSTER), comprovando a eficiência da reação.

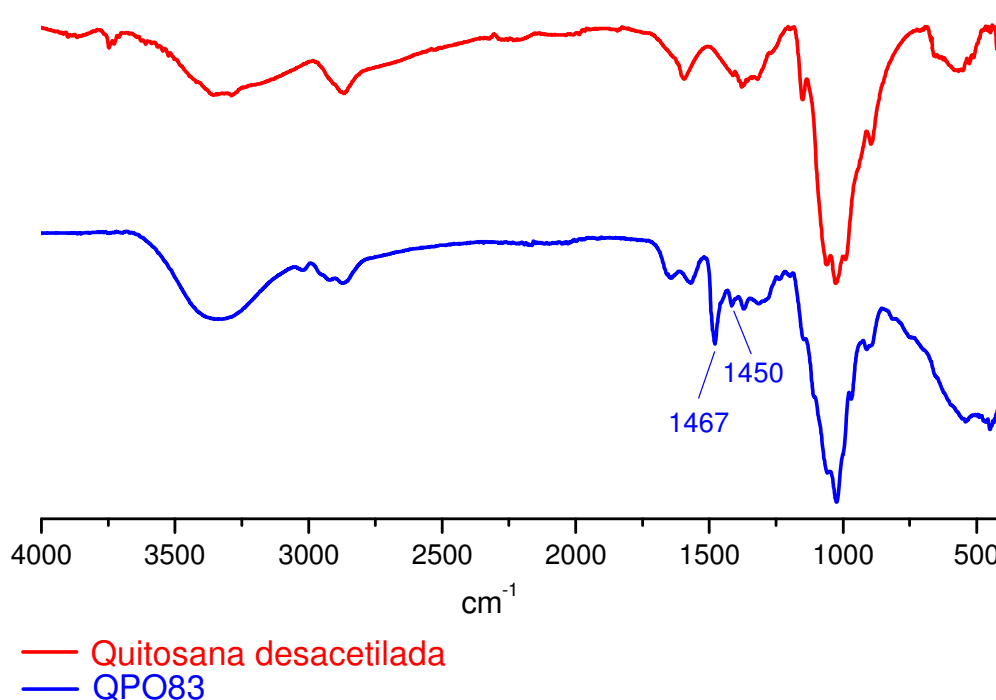


Figura 13. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e o derivado QPO83.

4.3.2 Determinação da massa molar viscosimétrica do derivado QPO83

As medidas viscosimétricas do derivado quaternário QPO83 foram realizadas de acordo com o item 3.3.4 e os resultados são apresentados na Figura 14. Do gráfico foi obtido uma viscosidade intrínseca de 160,01 que levou

a uma massa molar viscosimétrica $\overline{M}_v = 8,1$ kDa. Esse resultado mostra que houve uma degradação parcial da amostra, uma vez que a reação foi realizada em meio levemente alcalino.

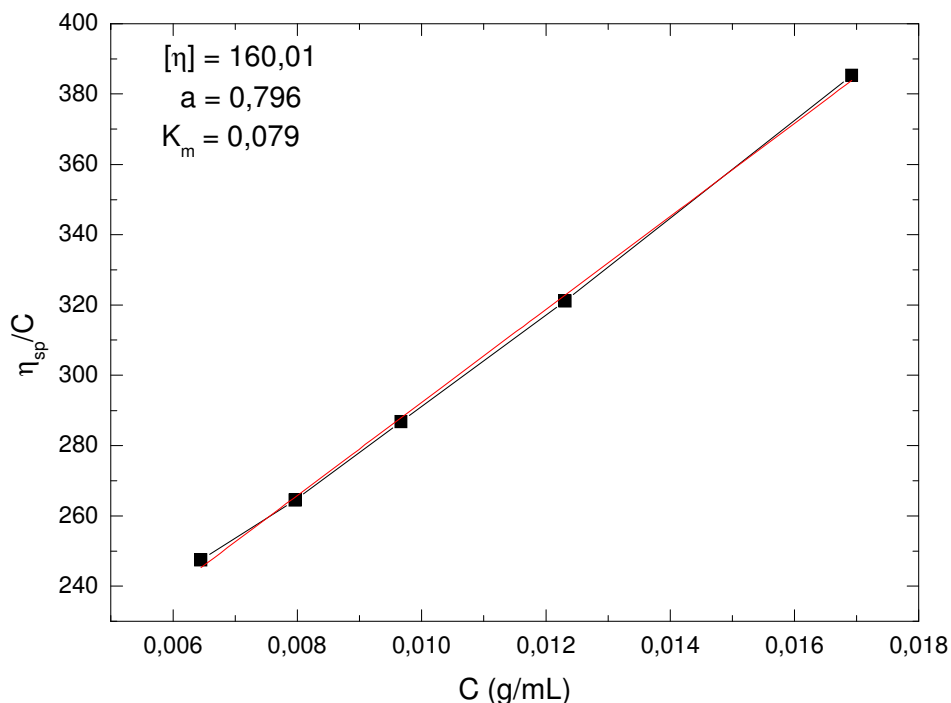


Figura 14. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica do derivado quaternário QPO83.

4.4 Caracterização do derivado dodecilado QPOD.

4.4.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

A porcentagem de grupos dodecil ligados à cadeia do polímero foi determinada por um procedimento similar àquele utilizado para o BPTA, comparando-se a integração em 1,4 ppm, que corresponde ao grupo metila terminal da cadeia hidrocarbônica, com a integração dos prótons ligados aos carbonos anoméricos. Na Figura 15 são apresentados os espectros de RMN¹H para os derivados QPO83D10, QPO83D15 e QPO83D30.

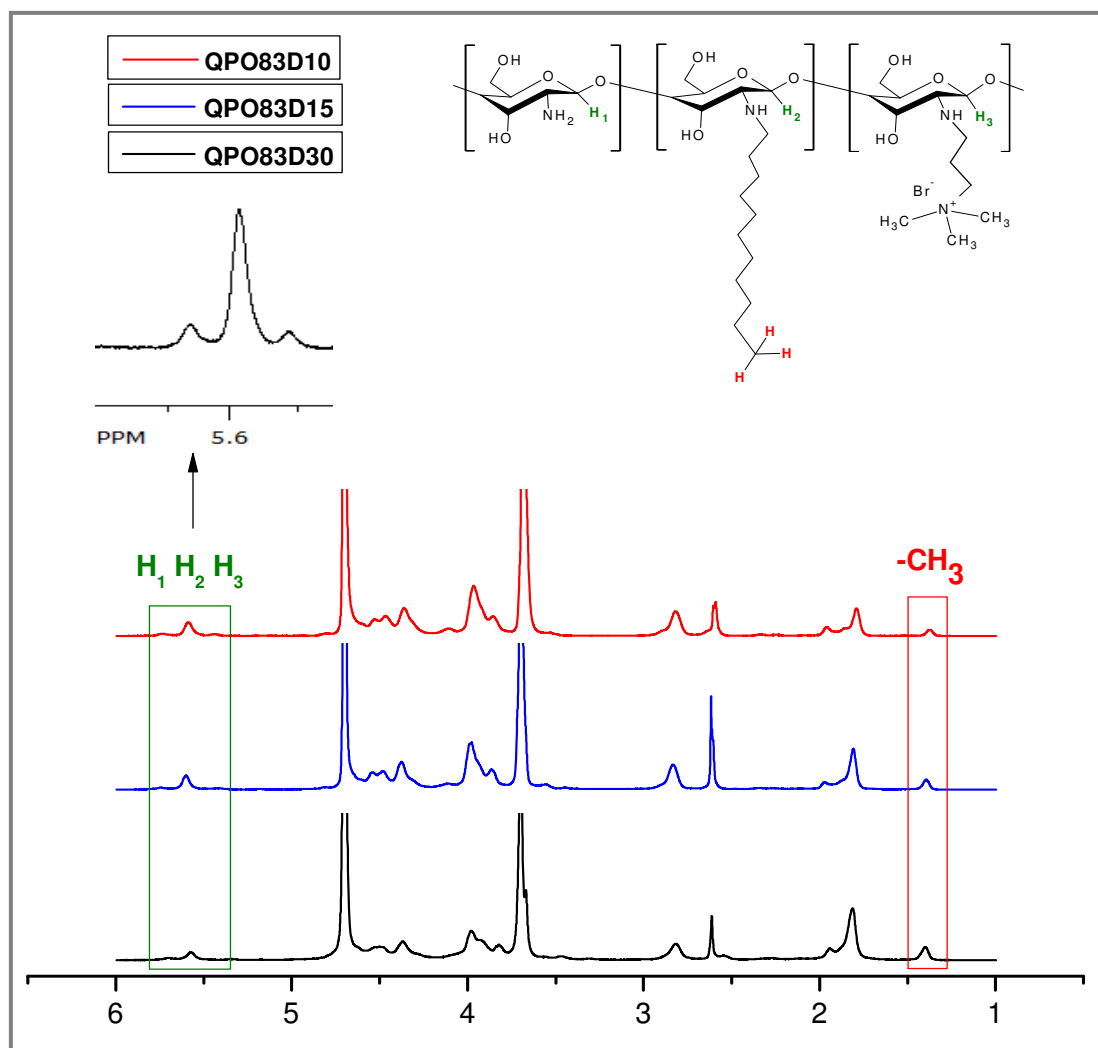


Figura 15. Espectros de RMN^1H dos derivados anfífilos de quitosana QPO83D10, QPO83D15 e QPO83D30. No detalhe os três picos dos hidrogênios dos carbonos anoméricos substituídos e não substituído.

Os picos em 5,4, 5,6 e 5,8 ppm referem-se aos prótons anoméricos das unidades não substituída, substituída com dodecil e substituída com propiltrimetilamônio (H_1 , H_2 e H_3), como mostrado em detalhe ampliado na Figura 15. Os picos em 1,4 ppm referem-se ao grupo $-\text{CH}_3$ do dodecil. Assim, o grau de substituição do dodecil pode ser calculada pela Equação 6:

$$\text{GSD} = \left(\frac{I_{\text{CH}_3}}{3 \times (I_{\text{H}_1} + I_{\text{H}_2} + I_{\text{H}_3})} \right) \times 100$$

(6)

Os graus de substituição, bem como as razões molares nas reações são listados na tabela 4.

Tabela 4. Relação molar, grau de substituição, viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada e seus derivados.

Derivados	Relação Molar BPTA-DA/QD	GS%	$[\eta]$ mL/g	$\overline{M}_v$ (kDa)
QC	-	85,9 ^a	307,42	32,8 ^b
QD	-	98,0 ^a	219,89	21,3 ^c
QPO83	3,86	83,0	160,01	8,1
QPO83D10	0,10	8,3	-	-
QPO83D15	0,15	14,1	-	-
QPO83D30	0,30	29,0	-	-

^a Grau de desacetilação.

^b $K_m = 0,074$ e $a = 0,798$ (Grau de acetilação - GA = 14%).

^c $K_m = 0,079$ e $a = 0,796$ (Grau de acetilação - GA = 2%) .

Comparando-se os graus de substituição dos derivados listados na Tabela 4, nota-se que houve uma substituição de 29% no QPO83D30. Esse resultado mostra que além da reação ocorrer nos grupos amino livres, houve, também, substituição em alguns grupos hidroxila, mais provavelmente no grupo hidroxila do carbono 6.

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Na Figura 16 são mostrados os espectros de IV da quitosana desacetilada, do QPO e do derivado dodecilado (QPO83D10), o qual mostra o aparecimento de bandas características por volta de 2950 cm^{-1} que podem ser atribuídas às deformações axiais da ligação carbono-hidrogênio dos grupos CH_3 assimétrico e simétrico e do grupo CH_2 em 2850 cm^{-1} (SILVERSTEIN E WEBSTER). Essas bandas não aparecem nos outros espectros, o que confirma a ligação do grupo dodecil na cadeia do polímero. Portanto, a caracterização por RMN¹H e IV confirmam o sucesso da síntese.

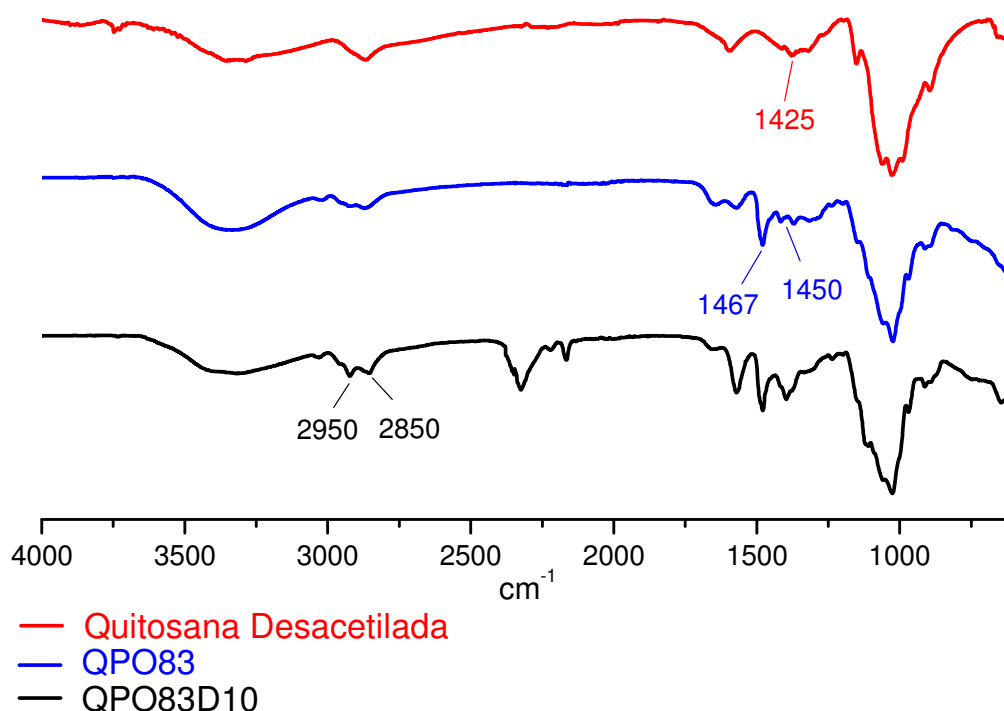


Figura 16. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada, os derivados QPO83 e QPO83D10.

4.5 Atividade fungicida da quitosana e seus derivados contra o fungo *Aspergillus flavus*

Nessa etapa do trabalho foram realizados estudos de avaliação da ação antifúngica da quitosana desacetilada e seus derivados contra o fungo *Aspergillus flavus*. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o proposto no item 3.4.4.

4.5.1 Efeito da quitosana desacetilada.

O efeito fungicida foi avaliado pelo índice de inibição do desenvolvimento e crescimento dos fungos, o qual foi determinado como proposto por Guo *et al.*, (2008). Os dados de inibição, foram tratados estatisticamente como descrito no item 3.4.4 e os resultados são apresentados na forma de tabelas e gráficos.

Os resultados da Tabela 5 mostram os índices de inibição obtidos com quitosana desacetilada. O índice de inibição médio foi de, aproximadamente, 20% e não houve variação significativa na faixa de concentração estudada,

como pode ser observado nas letras associadas as medianas. Os valores que estão identificados com as mesmas letras não são estatisticamente diferentes. Na Figura 17 esses resultados são apresentados na forma de um gráfico de índice de inibição em função da concentração da quitosana. Os valores que não partilham as mesmas letras são estatisticamente diferentes com $P < 0,05$.

Tabela 5. Estatística descritiva dos índices de inibição da quitosana desacetilada – QD.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	16,62 $\pm$ 7,35	19,15 ^B	5,83	22,35	0,012
0,20	4	14,30 $\pm$ 2,97	13,27 ^B	12,03	18,64	
0,30	4	20,50 $\pm$ 3,08	19,77 ^{AB}	17,60	24,83	
0,40	4	17,91 $\pm$ 3,06	18,12 ^B	14,09	21,32	
0,50	4	19,29 $\pm$ 2,83	19,54 ^B	15,74	22,34	
0,60	4	29,70 $\pm$ 4,70	31,47 ^{AB}	22,84	32,99	
0,70	4	18,46 $\pm$ 5,68	17,64 ^{AB}	12,44	26,14	
0,80	4	23,16 $\pm$ 0,84	23,10 ^{AB}	22,34	24,11	
0,90	4	16,43 $\pm$ 4,42	17,01 ^B	10,91	20,81	
1,00	4	20,69 $\pm$ 1,78	20,56 ^{AB}	18,78	22,84	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

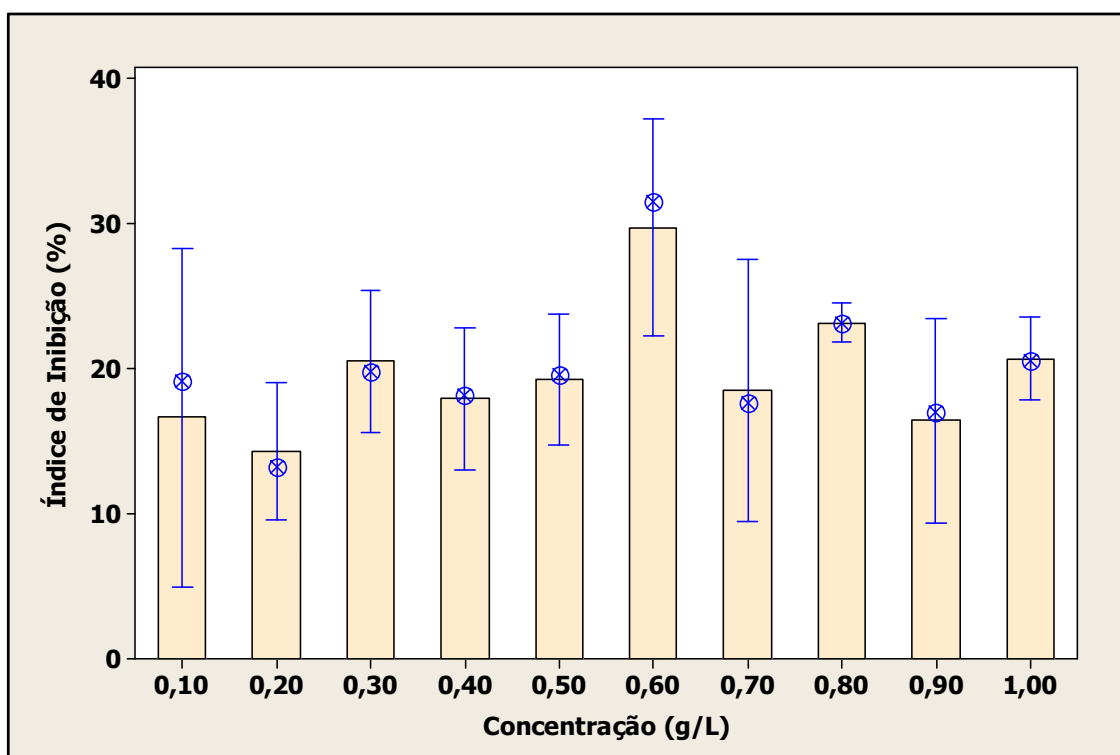


Figura 17. Gráfico de inibição fúngica da quitosana desacetilada.

4.5.2 Efeito fungicida dos derivados quaternários anfifílicos

Os resultados dos ensaios realizados com os derivados obtidos são apresentados nas Tabelas 6 a 9 e na Figura 18 (a, b, c, d). Para o derivado quaternário QPO83 os resultados da Tabela 6 mostram índices de inibição discretos. Quase não há variação significativa nos índices de inibição, o valor de $P=0,041$ ficou próximo do valor limite ($P<0,05$). O pós teste de Dunn revelou que a concentração de 1,00 g/L apresentou o melhor índice de inibição, o que pode ser comprovado pela comparação dos valores individuais de inibição mostrados na Figura 18a.

Entretanto os ensaios realizados com o derivado QPO83D10 mostraram níveis de inibição muito superiores, vide Figura 18b e Tabela 7. A análise estatística mostrou diferenças significativas nos índices de inibição fúngica na faixa de concentração estudada. Algumas concentrações promoveram a inibição completa do crescimento (100%), portanto, QPO83D10 exibe uma atividade fungicida notadamente muito superior aquela obtida com QPO. Estatisticamente, a faixa de concentração na qual se atinge máxima inibição varia de 0,50 g/L, a 0,70 g/L (Figura 18b). Este resultado claramente indica que o conteúdo hidrofóbico desempenha um papel importante na atividade fungicida. A título de exemplo, as imagens mostradas na Figura 19 apresentam o efeito da inibição fúngica obtida pelo polímero anfifílico QPO83D10 no desenvolvimento do fungo *Aspergillus flavus* ao final do primeiro ciclo de crescimento (7º dia).

Os ensaios microbiológicos com os polímeros QPO83D15 e QPO83D30 confirmaram os bons resultados de inibição fúngica obtidos com o derivado QPO83D10. Para QPO83D15 (Tabela 8), acima de 0,60 g/L, um valor máximo de inibição pode ser atingido. A estatística indicou 0,60 g/L, mas o índice de inibição máximo (100%) é repetitivo para concentrações acima de 0,80 g/L (Figura 18c). A Tabela 9 mostra os valores individuais de inibição para QPO83D30. Analisando-se os resultados dos ensaios realizados com esse derivado nota-se que a melhor atividade fungicida contra *Aspergillus flavus* é atingida com esse derivado (QPO83D30). Ele apresentou inibição máxima em concentrações mais baixas que os outros dois derivados anfifílicos. Portanto, o aumento do conteúdo hidrofóbico, aparentemente, favorece a interação com a

parede celular do fungo, podendo causar um bloqueio ou desregulação na entrada e saída de nutrientes ou, possivelmente, lisar a parede celular.

Tabela 6. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário QPO83.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	10,60 ± 1,72	11,19 ^{AB}	8,13	11,88	0,041
0,20	4	12,12 ± 4,11	12,07 ^{AB}	7,15	17,20	
0,30	4	9,66 ± 3,48	10,30 ^{AB}	4,98	13,06	
0,40	4	7,10 ± 2,61	8,23 ^B	3,20	8,72	
0,50	4	8,38 ± 4,15	8,22 ^{AB}	4,08	13,00	
0,60	4	7,48 ± 3,49	8,01 ^B	2,81	11,09	
0,70	4	8,22 ± 1,49	7,48 ^B	7,48	10,45	
0,80	4	5,99 ± 2,28	6,31 ^B	3,02	8,33	
0,90	4	12,41 ± 5,29	10,98 ^{AB}	7,69	20,00	
1,00	4	16,76 ± 5,82	16,71 ^A	11,72	21,91	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

Tabela 7. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D10.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	32,09 ± 1,20	32,88 ^D	27,84	34,77	<0,001
0,20	4	10,13 ± 2,41	9,67 ^E	7,94	13,24	
0,30	4	7,99 ± 1,02	7,84 ^E	6,92	9,37	
0,40	4	42,62 ± 3,10	42,77 ^C	38,70	46,23	
0,50	4	96,48 ± 7,03	100 ^A	85,93	100,00	
0,60	4	70,81 ± 2,07	71,19 ^B	67,97	72,88	
0,70	4	100,00 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,80	4	100,00 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,90	4	100,00 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
1,00	4	100,00 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

Tabela 8. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D15.

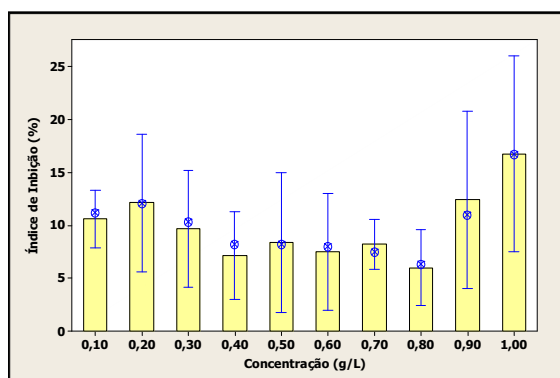
Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	33,61 $\pm$ 3,36	33,82 ^E	29,31	37,49	<0,001
0,20	4	33,15 $\pm$ 2,49	33,71 ^E	29,74	35,44	
0,30	4	41,60 $\pm$ 3,14	41,14 ^D	38,29	45,82	
0,40	4	75,05 $\pm$ 0,54	74,95 ^B	74,54	75,76	
0,50	4	55,69 $\pm$ 15,10	59,73 ^{CDE}	35,40	67,91	
0,60	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,70	4	69,32 $\pm$ 5,34	71,02 ^C	61,69	73,56	
0,80	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,90	4	97,88 $\pm$ 4,24	100 ^A	91,53	100,00	
1,00	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

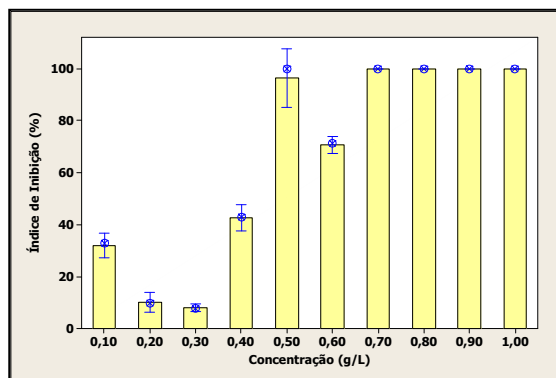
Tabela 9. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO83D30.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	40,74 $\pm$ 3,64	39,91 ^D	37,28	45,88	0,001
0,20	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
0,30	4	66,40 $\pm$ 2,04	66,90 ^C	63,54	68,23	
0,40	4	87,07 $\pm$ 1,55	86,66 ^{AB}	85,74	89,21	
0,50	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
0,60	4	95,04 $\pm$ 9,92	100,00 ^{AB}	80,17	100,00	
0,70	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
0,80	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
0,90	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	
1,00	4	100, $\pm$ 0,00	100,00 ^A	100,00	100,00	

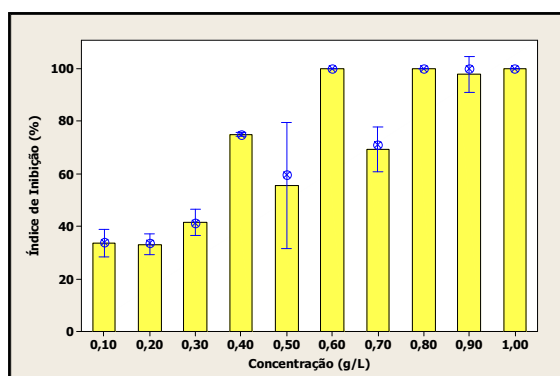
*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.



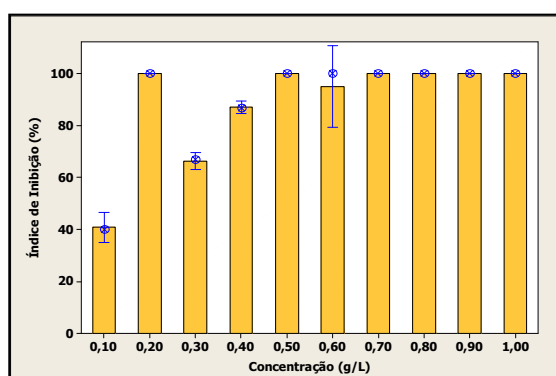
a. QPO



b. QPO83D10



c. QPO83D15



d. QPO83D30

Figura 18. Índices de inibição fúngica em função da concentração para os derivados quaternários anfifílicos.

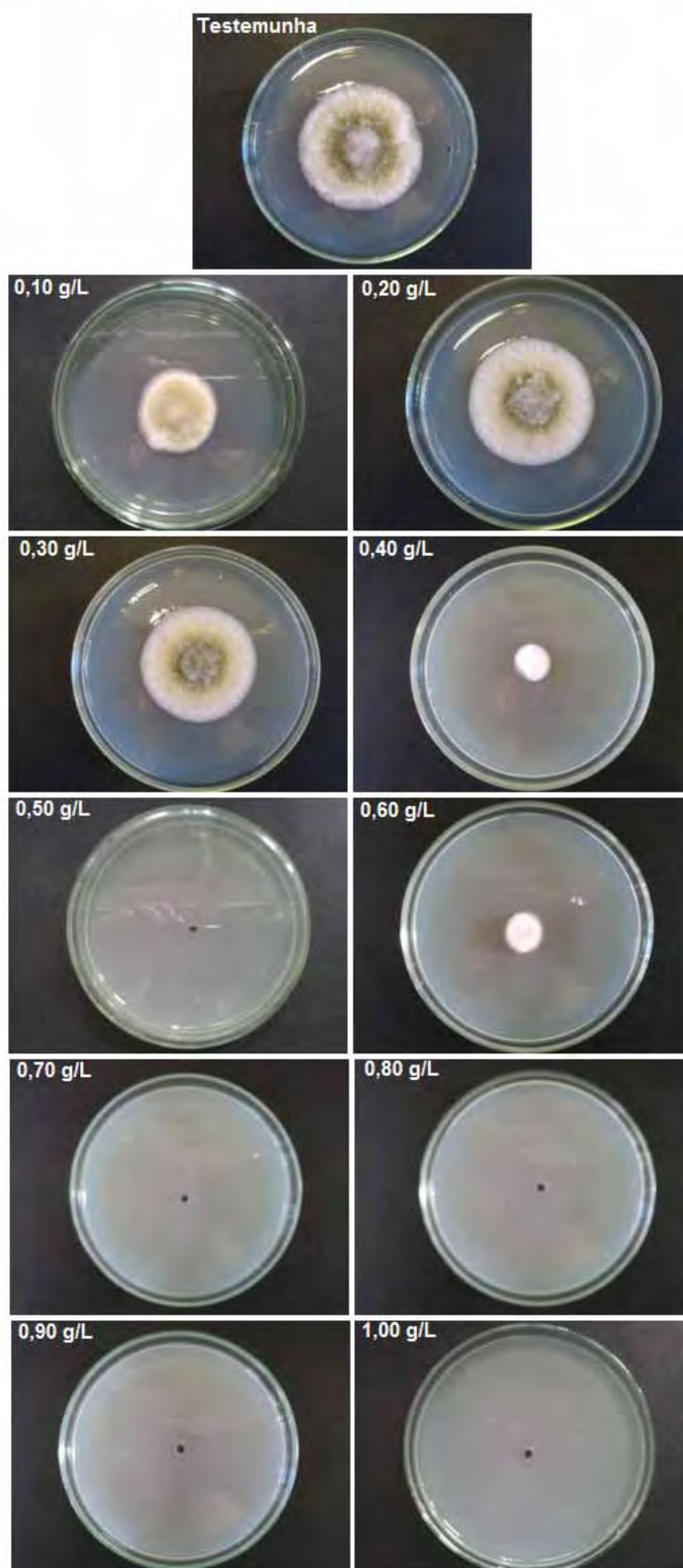


Figura 19. Imagens do ensaio realizado com o derivado QPO83D10 (7º dia).

4.6 Atividade fungicida da quitosana e seus derivados contra o fungo *Aspergillus parasiticus*

Para a realização dos ensaios microbiológicos com o fungo *Aspergillus parasiticus* uma nova série de derivados com composições variáveis foi sintetizada e caracterizada de acordo com as técnicas e procedimentos descritos no item 3. Os resultados da caracterização encontram-se no final desta dissertação em material anexo. Estes derivados também possuem proporções crescentes de grupos dodecil e suas propriedades são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Relação molar, grau de substituição, viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada e seus derivados.

Derivados	Relação Molar BPTA-DA/QD	GS%	[η] g/mL	$\overline{M}_v$ (kDa)
QC	-	85,9 ^a	307,42	32,8 ^b
QD	-	98,0 ^a	267,70	27,2 ^c
QPO50	3,86	48,0	142,56	12,3
QPO50D10	0,10	7,1	-	-
QPO50D15	0,15	9,6	-	-
QPO50D30	0,30	27,1	-	-

^a Grau de desacetilação.

^b $K_m = 0,074$ e $a = 0,798$ (Grau de acetilação - GA = 14%).

^c $K_m = 0,079$ e $a = 0,796$ (Grau de acetilação - GA = 2%) .

Nessa etapa do trabalho foram realizados estudos de avaliação da ação antifúngica da quitosana desacetilada e seus novos derivados contra o fungo *Aspergillus parasiticus*. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o proposto no item 3.4.4.

4.6.1. Efeito da quitosana desacetilada

Os resultados de inibição do crescimento do *Aspergillus parasiticus* são mostrados na Tabela 11 e Figura 20. Os resultados obtidos são similares àqueles obtidos com *A. flavus* e a quitosana desacetilada apresentou inibição média por volta de 10% na faixa de 0,10 a 1,0 g/L. A análise estatística demonstrou variações significativas entre as concentrações ($P=0,001$), conforme podemos observar na Tabela 11. De acordo com a análise estatística, na concentração de 0,60 g/L foi obtido o melhor índice de inibição. Esse

resultado é esperado, uma vez que esse fungo, pertence a mesma família e portanto deve apresentar similaridades quanto à parede celular, além da forma de crescimento e toxicidade. Segundo XU *et al.*, (2007) e GUO *et al.*, (2008), a presença de cargas negativas existentes na parede celular dos microrganismos alvo interagindo com as cargas positivas da quitosana podem lesionar a célula, explicando a ação fungicida da quitosana. Neste mesmo caminho, LIU *et al.*, (2004), explica também a ação fungicida da quitosana pela alteração da permeabilidade da membrana plasmática do fungo, resultado das interações dos grupos amino positivos da quitosana com as cargas negativas dos fosfolipídeos.

Tabela 11. Estatística descritiva dos índices de inibição para a quitosana desacetilada.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	7,26 ± 2,48	7,59 ^B	4,03	9,84	0,001
0,20	4	6,42 ± 0,81	6,19 ^B	5,72	7,59	
0,30	4	7,17 ± 1,58	7,50 ^B	4,97	8,72	
0,40	4	5,76 ± 2,71	6,84 ^B	1,78	7,59	
0,50	4	8,34 ± 2,87	8,90 ^B	4,40	11,15	
0,60	4	14,81 ± 0,47	14,71 ^A	14,34	15,46	
0,70	4	7,22 ± 1,43	7,31 ^B	5,72	8,53	
0,80	4	13,21 ± 3,47	13,50 ^{AB}	8,72	17,15	
0,90	4	15,37 ± 0,99	15,46 ^A	14,34	16,21	
1,00	4	10,26 ± 2,34	10,59 ^B	7,40	12,46	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

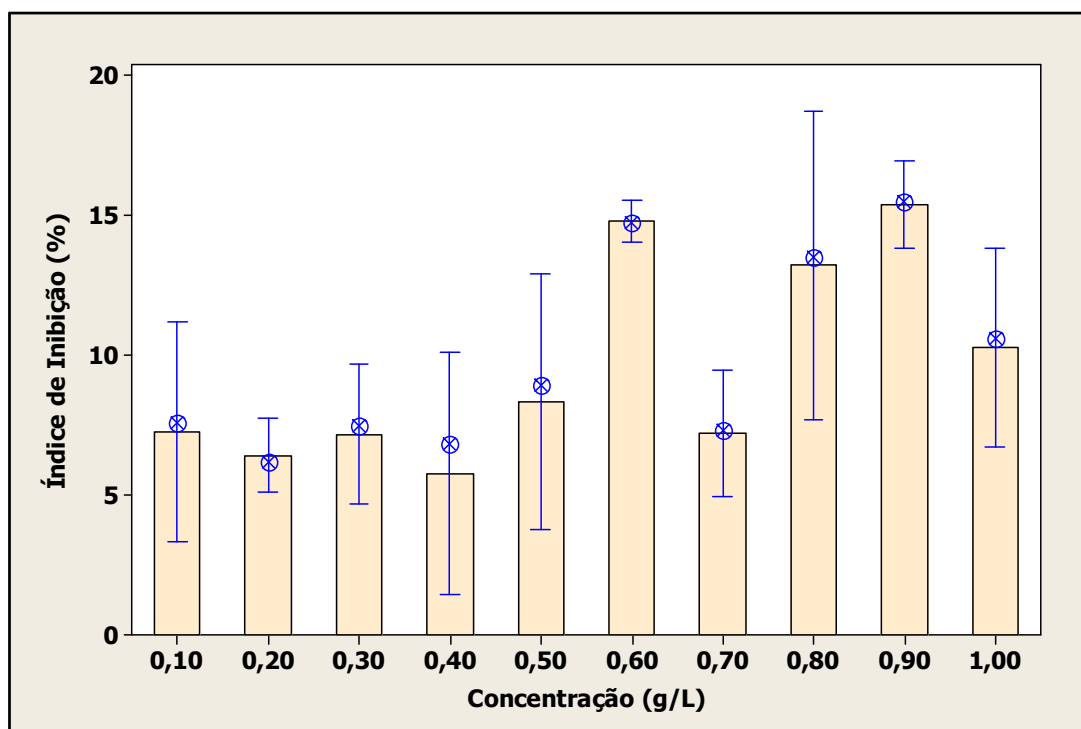


Figura 20. Gráfico com os valores de inibição fúngica para a quitosana desacetilada.

4.6.2 Efeito fungicida dos derivados quaternários anfifílicos

Os resultados dos ensaios realizados com os derivados são apresentados nas Tabelas 12 a 15 e na Figura 21 (a, b, c, d). Para o derivado quaternário QPO50 os resultados da Tabela 12 mostram índices de inibição que em média atingem um valor da ordem de 10%, similar aqueles obtidos com *A. flavus*. Os melhores índices de inibição foram obtidos nas concentrações 0,50 g/L e 0,80 g/L (Figura 20a).

Tabela 12. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário QPO50.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	3,82 ± 1,04	3,60 ^C	2,84	5,24	<0,001
0,20	4	6,33 ± 0,64	6,44 ^B	5,46	6,99	
0,30	4	7,59 ± 1,42	7,21 ^B	6,33	9,61	
0,40	4	6,82 ± 1,09	6,66 ^B	5,68	8,30	
0,50	4	11,24 ± 0,68	11,24 ^A	10,48	12,01	
0,60	4	6,11 ± 0,69	6,00 ^B	5,46	6,99	
0,70	4	10,04 ± 0,53	10,04 ^{AB}	9,39	10,70	
0,80	4	11,35 ± 0,85	11,46 ^A	10,26	12,23	
0,90	4	9,12 ± 1,76	8,73 ^B	7,42	11,57	
1,00	4	8,41 ± 0,63	8,41 ^B	7,64	9,17	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

Tabela 13. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D10.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	25,97 ± 5,17	24,79 ^F	21,03	33,25	<0,001
0,20	4	30,28 ± 4,21	32,0 ^{EF}	26,67	38,19	
0,30	4	39,76 ± 5,77	40,31 ^E	34,20	45,71	
0,40	4	57,87 ± 3,55	57,46 ^D	54,41	62,16	
0,50	4	71,64 ± 4,75	70,15 ^C	64,04	74,62	
0,60	4	73,38 ± 0,89	67,80 ^C	66,86	72,27	
0,70	4	86,55 ± 4,96	88,13 ^B	79,32	90,60	
0,80	4	97,77 ± 4,47	100 ^A	91,07	100,00	
0,90	4	100,0 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
1,00	4	100,0 ± 0,00	100 ^A	100,00	100,00	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

Tabela 14. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D15.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	37,35 $\pm$ 6,66	39,43 ^C	27,74	42,79	<0,001
0,20	4	48,81 $\pm$ 4,05	49,04 ^B	43,72	53,45	
0,30	4	95,83 $\pm$ 8,34	100 ^A	83,32	100,00	
0,40	4	96,99 $\pm$ 6,02	100 ^A	87,96	100,00	
0,50	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,60	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,70	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,80	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
0,90	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	
1,00	4	100,00 $\pm$ 0,00	100 ^A	100,00	100,00	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

Tabela 15. Estatística descritiva dos índices de inibição do derivado quaternário anfifílico QPO50D30.

Concentração g.L ⁻¹	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana*	Mínimo	Máximo	Valor P
0,10	4	13,31 $\pm$ 1,73	13,51 ^D	11,30	14,94	<0,001
0,20	4	22,37 $\pm$ 2,72	22,13 ^C	19,54	25,67	
0,30	4	25,77 $\pm$ 2,79	26,44 ^C	21,84	28,35	
0,40	4	46,89 $\pm$ 2,21	46,65 ^B	44,44	49,81	
0,50	4	56,80 $\pm$ 5,92	56,61 ^B	50,38	63,60	
0,60	4	56,23 $\pm$ 4,84	58,14 ^B	49,04	59,58	
0,70	4	91,86 $\pm$ 6,89	92,15 ^A	83,14	100,00	
0,80	4	55,84 $\pm$ 3,32	55,75 ^B	52,11	59,77	
0,90	4	98,22 $\pm$ 3,54	100 ^A	92,91	100,00	
1,00	4	82,04 $\pm$ 7,31	79,60 ^A	76,25	92,72	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as concentrações do polímero.

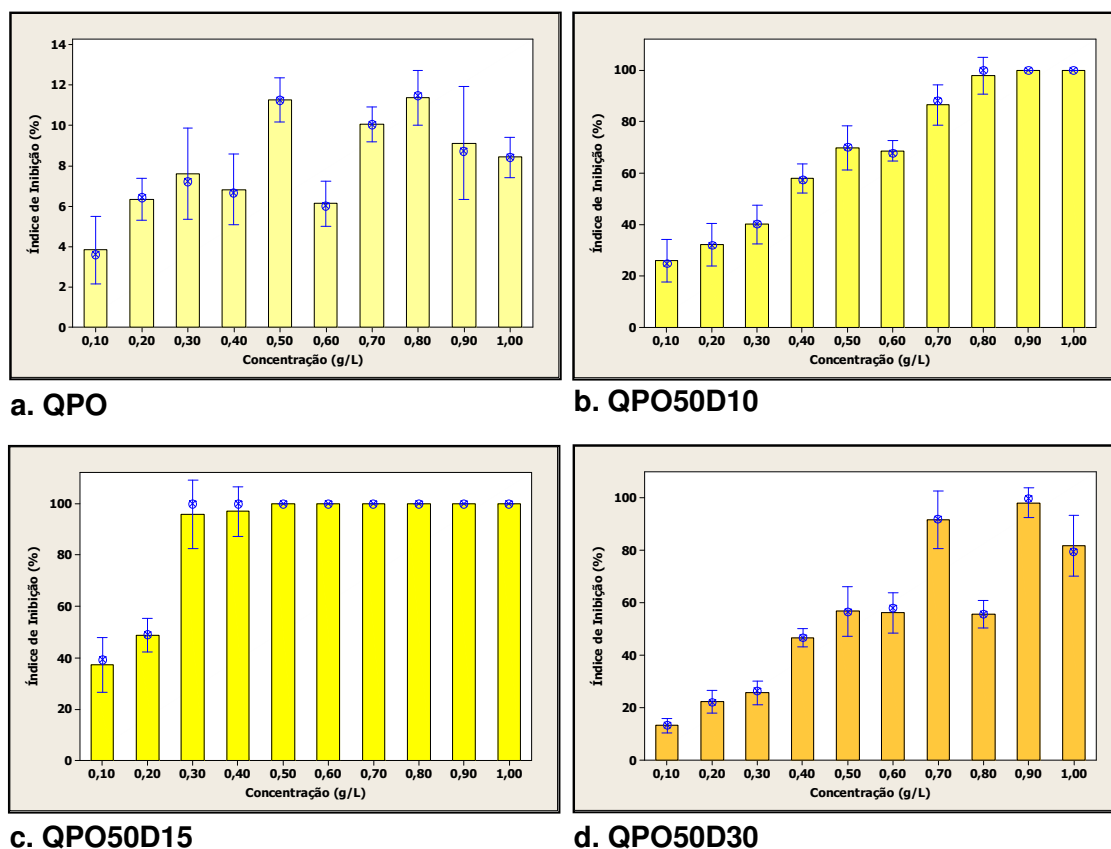


Figura 21. Índices de inibição fúngica em função da concentração para os derivados quaternários anfifílicos.

Similarmente ao observado contra o *A. Flavus*, a atividade dos derivados contendo grupos dodecil mostraram índices de inibição muito maiores na mesma faixa de concentração. A Tabela 13 mostra os dados da inibição com QPO50D10 e pode-se verificar que em 0,80 g/L o crescimento de *A. parasiticus* foi completamente inibido. Através da análise estatística pode-se observar uma diferença significativa para as concentrações estudadas. Isso pode ser verificado pelo valor de $P < 0,001$ e pelas diferentes letras atribuídas às medianas em cada concentração. Esse resultado é também apresentado na Figura 21b na forma de gráfico de barras.

O aumento do conteúdo hidrofóbico do derivado para 9,6% (QPO50D15) proporcionou o alcance do índice de inibição máxima na concentração de 0,30 g/L e pode-se notar que com o aumento da concentração o aumento do índice de inibição é gradual. Na Figura 22 são mostradas imagens do ensaio com QPO50D10 que exemplificam a inibição completa do crescimento do fungo por esse derivado. Entretanto, o aumento do conteúdo hidrofóbico para 27,1% (QPO50D30) não resultou num aumento adicional na eficiência. Os dados da

Tabela 15 mostram que a inibição permanece alta, mas os índices de inibição atingem 100% somente para concentrações da ordem de 0,70 e 0,90 g/L. A análise estatística indicou que a concentração 0,70 g/L é a melhor para este derivado. São apresentados na Figura 21d os bons índices de inibição alcançados com QPO50D30 na faixa de concentração estudada. Esse aparente decréscimo na eficiência pode estar relacionado com as interações do derivado com a parede celular dos fungos. Para este derivado hidrofóbico a auto-associação, ou seja, as interações hidrofóbicas intermoleculares podem desfavorecer a interação com o fungo, diminuindo assim a atividade. Portanto, a análise deste conjunto de resultados mostra claramente que o índice de inibição fúngica cresce com o aumento da concentração dos derivados e que pode ser potencializado com o ajuste da hidrofobicidade.

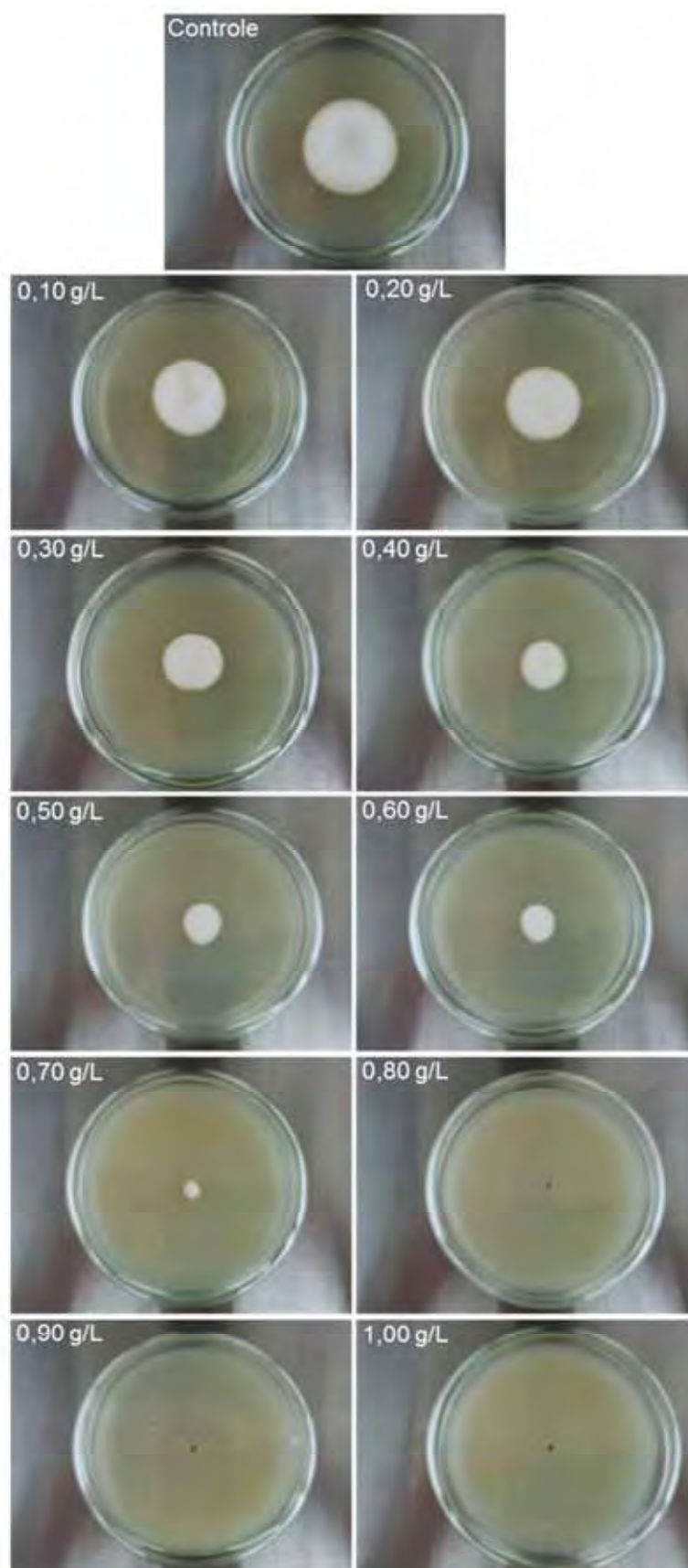


Figura 22. Imagens do ensaio realizado com o derivado QPO50D10 (7º dia).

4.7 Microscopia

Para avaliar a capacidade de interação da quitosana com a parede celular, uma amostra foi marcada com rodamina (QDR) e incubada com a suspensão do fungo. São mostradas na Figura 23 as imagens das hifas dos dois fungos obtidas com microscopia confocal. Claramente se observa que a quitosana interage de forma ampla com as hifas, o que indica que a inibição pode ocorrer por um bloqueio das funções da membrana. A interação deve ocorrer por interação eletrostática resultante da atração da carga positiva do polímero com resíduos de carga negativa de macromoléculas como lipossacarídeos e proteínas (GOY *et al.*, 2009; MARTINEZ-CAMACHO *et al.*, 2010).

Portanto a modificação hidrofóbica potencializa essa interação (TIKHONOV *et al.*, 2006) e embora não haja evidências conclusivas, acredita-se que os derivados podem causar danos maiores às membranas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Embora não seja possível afirmar, pode-se postular que devido à baixa massa molar, os derivados quaternários anfifílicos da quitosana podem atravessar a parede celular, agindo dentro da célula.

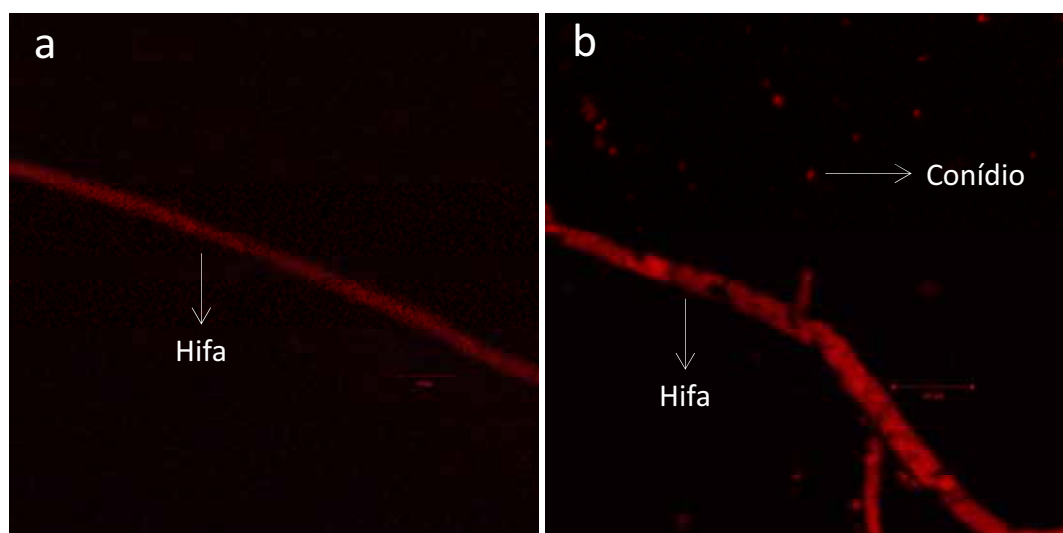


Figura 23. Imagens da interação da QDR com hifas e conídios dos fungos: (a) *Aspergillus flavus* e (b) *Aspergillus parasiticus*.

5. CONCLUSÃO

O caminho de síntese utilizado permite a obtenção de derivados quaternários de quitosana com hidrofobicidade ajustável. A etapa de desacetilação de quitosana foi eficiente e permitiu obter uma amostra com alto grau de desacetilação. A síntese de derivados por meio de duas etapas, variando-se as proporções dos reagentes, permite o controle do conteúdo de grupos quaternários, bem como da hidrofobicidade dos derivados. Durante o processo ocorreu a degradação parcial da cadeia devido às condições de síntese, ou seja, o meio alcalino e o aquecimento por tempo. Os resultados de atividade fungicida avaliados pelo crescimento radial do fungo mostraram que tanto quitosana desacetilada como os derivados quaternários QPO50 e QPO83 inibem de 10 a 20% o crescimento do fungo. Os derivados apresentaram boa solubilidade em solução aquosa, mesmo em pH mais elevados.

Os derivados anfifílicos QPO83D10, QPO83D15 e QPO83D30, utilizados nos ensaios com o fungo *Aspergillus flavus* apresentaram excelentes índices de inibição, mesmo em concentrações baixas (0,50, 0,60 e 0,20 g/L, respectivamente), com destaque para o derivado QPO83D30 que apresentou excelentes índices inibitórios a partir da concentração 0,20 g/L. Os derivados QPO50D10, QPO50D15 e QPO50D30, utilizados nos ensaios com o fungo *Aspergillus parasiticus* apresentaram, também, excelentes índices de inibição em concentrações baixas (0,80, 0,30 e 0,70 g/L, respectivamente), com destaque para o derivado QPO50D15 que inibiu completamente o crescimento do fungo a partir de 0,30 g/L.

Portanto, os resultados obtidos com ambos os fungos demonstraram que o aumento da concentração e o aumento da quantidade de dodecil resultam numa alta atividade antifúngica. Finalmente, acredita-se que haja uma relação ideal entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas nos derivados anfifílicos que potencializa a atividade antifúngica. Novos estudos deverão ser realizados com o objetivo de aperfeiçoar o processo e os índices de inibição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A., FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V., BIKANDI, J., RAMÍREZ, A., MARGARETO, J., SENDINO, J., HERNANDO, F. L., PONTÓN, J., GARAIZAR, J., REMENTERIA, A., What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis, *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4):155–182, **2010**.

ANDRES, Y., GIRAUD, L., GERENTE, C. & LE CLOIREC, P., Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action. *Environment Technology*, 28, p.1357-1363, **2007**.

BAXTER, A., DILLON, M., TAYLOR, K. D. A., ROBERTS, G. A. F., Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14: 166-169, **1992**.

BLOUNT, W. P., Turkey “X” Disease, *Turkeys*, v. 9, n. 2, p. 52-67, **1961**.

BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F.M., ARGUÈELLES-MONAL, W., DESBRIEÁRES, J., RINAUDO, M., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42, 3569-3580, **2001**.

BU’LOCK, J. D., The biosynthesis of natural products, New York: *McGraw-Hill*, **1965**.

CAI, Z., SONG, Z., YANG, C., SHANG, S., YIN, Y., Synthesis, characterization and antibacterial activity of quaternized N,O-(2-carboxyethyl) chitosan, *Polymer Bulletin*, 62, 445– 456, **2009**.

CAMPANA, F. S. P., SIGNINI, R., Efeitos de aditivos na desacetilação da quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 11, nº 4, p. 169-173, **2001**.

CHANG, P. K., MATSUSHIMA, K., TAKAHASHI, T., YU, J., ABE, K., BHATNAGAR, D., YUAN, G. F., KOYAMA, Y., CLEVELAND T. E., Understanding nonaflatoxicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76:977–984, **2007**.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Approved standard second edition*. CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9), USA. **2008**.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, *Task Force Report*, 139, 217p. USA, **2003**.

DEVLIEGHERE, F., VERMEULEN, A. & DEBEVERE, J., Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiology*, 21, p.703-714, **2004**.

DOMSZY, J. G., ROBERTS, G. A. F., Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Die Makromolekulare Chemie*, 186:1671-1677, **1985**.

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

EL-REFAIE, K. F., ABDEL-HAY, I., EL-MAGD, A. A., MAHMOUD, Y., Biologically Active Polymers: Modification and Anti-microbial Activity of Chitosan Derivative, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*; 20; 95, **2005**.

GORAYEB, T. C. C., Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos: Avaliação das condições críticas para o surgimento de aflatoxina na cadeia de processamento de amendoim (*Arachis Hypogaea* L.), IBILCE, UNESP, **2007**.

GOY, R. C., BRITTO, D., ASSIS, O. B. G., A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 3, 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, **2007**.

HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N., BAUTISTA-BANOS, S., VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G., MENDEZ-MONTEALVO, M. G., SANCHEZ-RIVERA, M. M., BELLO-PEREZ, L. A., Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* *Carbohydrate Polymers* 73, 541–547, **2008**.

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 51–63, **2010**.

KUMAR, A. B. V., VARADARAJ, M. C., GOWDA, L. R. & THARANATHAN, R. N., Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *Biochemical Journal*, 391, p.167-175, **2005**.

KUMAR, R., SAHA, A., SAHA, D., A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*, *Fitoterapia* 83, 230–233, **2012**.

LEWIS, L., ONSONGO, M., NJAPAU, H., SCHURS-ROGERS, H., IUBER, G., NYAMONGO, S. J., BAKER, L., DAHIYE, A. M., MISORE, A., KEVIN, D. R., and the Kenya aflatoxin investigating group. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya, *Environmental Health Perspective*, 113: 1763–1767, **2005**.

LINDER, M. B., SZILVAY, G. R., NAKARI-SETALA, T., PENTTILA, M. E., Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi., *FEMS Microbiology Reviews*, 29:877–96, **2005**.

LILLEHOJ, E. B., Aflatoxin: an ecologically elicited genetic/activation signal. In: SMITH, J. E., HENDERSON, R. S., *Mycotoxins and Animal Foods*, Boca Raton: CRC Press, p. 2-30, **1991**.

LIU, H., DU, Y. M., WANG, X. H., SUN, L. P., Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*. 95, 147–155. **2004**.

MAIA, J. T. L. S., SABBAG, S. P., SAKATA, R. A. P., Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades, *Enciclopédia Biosfera*, vol.7, N.13, Pág. 1498, **2011**.

MALHOTRA B. D., E KAUSHIK, A., Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor, *Thin Solid Films*, 518, 614–620, **2009**.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P., CORTEZ-ROCHA, M.O., EZQUERRA-BRAUERA, J. M., GRACIANO-VERDUGO, A. Z., RODRIGUEZ-FÉLIX F., CASTILLO-ORTEGA, M. M., YÉPIZ-GÓMEZ, M. S., PLASCENIA-JATOMEA M., Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, 82, 305–315, **2010**.

MASOKO, P., PICARD, J., ELOFF, J. N., Antifungal activities of six South African Terminalia species (Combretaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 301-308, **2012**.

MILHOME, M. A. L., DE KEUKELEIRE, D., RIBEIRO, J. P., NASCIMENTO, R. F., CARVALHO, T. V., QUEIROZ, D. C., Removal Of Phenol And Conventional Pollutants From Aqueous Effluent By Chitosan And Chitin, *Quimica Nova*, 32, 8, 2122-2127, **2009**.

NO, H. K., MEYERS, S. P., Em *Chitin handbook*; MUZZARELLI, R. A. A., PETER, M. G., eds., *European Chitin Society: Grottammare*, p. 475, **1997**.

PATERSON, R. R. M., LIMA, N., How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43, 1902–1914, **2010**.

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*, **2012**.

PINHEIRO, M. R. R., Estudo de variabilidade genética de *Aspergillus flavus* como base para o desenvolvimento de PCR Multiplex para a detecção de fungos produtores de aflatoxinas em castanha-do-brasil e castanha do caju, *Dissertação de Mestrado*, UCB, p. 24, **2004**.

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

ROBERTS, G., Chitin Chemistry. London, *The Macmillan Press LTD*, p-349, **1992**.

ROLLER, S. & COVILL, N., The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47, p.67-77 **1999**.

SADEGHI, A. M. M., DORKOOSH, F. A., AVADI, M. R., SAADAT, P., RAFIEETEHRAANI, M., JUNGINGER, H. E., Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods, *International Journal of Pharmaceutics*, 355, 299–306, **2008**.

SAJOMSANG, W., GONIL, P., SAESOO, S., OVATLARNPORN, C., Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules* 50, 263– 269, **2012**.

SAJOMSANG, W., GONIL, P., TANTAYANON, S., Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing monoor disaccharide moieties: Preparation and characterization, *International Journal of Biological Macromolecules* 44, 419–427, **2009**.

SEBTI, I., MARTIAL-GROS, A., CARNET-PANTIEZ, A., GRELIER, S. & COMA V., Chitosan as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination - *Journal Food Science*, 70, p.M100 - M104 **2005**.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos, p. 77, LTC, Rio de Janeiro, **2000**.

SUN, X., PENG, B., JI, Y., CHEN, J., LI, D., Chitosan (Chitin)/Cellulose Composite Biosorbents Prepared Using Ionic Liquid for Heavy Metal Ions Adsorption, *Aiche Journal* , 55, 8, 2062-2069, **2009**.

TIKHONOV, V. E., STEPNOVA, E. A., BABAK, V. G., YAMSKOV, I. A., PALMA-GUERRERO, J., JANSSON, H. B., LOPEZ-LLORCA, L. V., SALINAS, J., GEASIMENKO, D. V., AVDIENKO, I. D., VARLAMOV, V. P., Bactericidal and antifungal activities of a lowmolecularweight chitosan and its N-(2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl)-derivatives. *Carbohydrate Polymers* 64, 66–72. **2006**.

TSAI, G. J., SU, W.H., Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 62, 239–243, **2006**.

TSAI, G. J., ZHANG, S. L. & SHIEH, P. L., Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *Journal of Food Protection*, 67: P. 396-398, **2004**.

TYAGI, A. K., MALIK, A., Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms, *Food Control*, 22, 1707-1714, **2011**.

UENO, K., YAMAGUCHI, T., SAKAIRI, N., NISHI, N., TOKURA, S., In: DOMARD, A., ROBERTS, G. A. F., VARUM, K. M. (Eds.), Advances in chitin science. *Jacques Andre, Lyon*, p. 156. **1997**.

WANG, J., OGATA, M., HIRAI, H., KAWAGISHI, H., Detoxication of aflatoxin B₁ by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *FEMS Microbiology Letters*, 314, 164–169, **2011**.

XIE, Y.J., LIU, X.F., CHEN, Q., Synthesis and characterization of water-solublechitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 69,142–147. **2007**.

XU, X., SCOTT-SCHEIERN, T., KEMPKER, L., SIMONS, K., An active avoidance conditioning paradigm in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*. 87(1):72-77. **2007**.

7. ANEXO

Neste item, uma nova série de derivados com composições variáveis que foram sintetizados e caracterizados de acordo com as técnicas e procedimentos descritos no item 3 é apresentada. Esses novos derivados foram utilizados nos ensaios microbiológicos com o fungo *Aspergillus parasiticus* e também possuem proporções crescentes de grupos dodecil. Suas propriedades são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação molar, grau de substituição, viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada e seus derivados.

Derivados	Relação Molar BPTA-DA/QD	GS%	[η] g/mL	$\overline{M}_v$ (kDa)
QC	-	85,9 ^a	307,42	32,8 ^b
QD	-	97,8 ^a	267,70	27,2 ^c
QPO50	3,86	48,0	142,56	12,3
QPO50D10	0,10	7,1	-	-
QPO50D15	0,15	9,6	-	-
QPO50D30	0,30	27,1	-	-

^a Grau de desacetilação.

^b $K_m = 0,074$ e $a = 0,798$ (Grau de acetilação - GA = 14%).

^c $K_m = 0,079$ e $a = 0,796$ (Grau de acetilação - GA = 2%) .

7.1 Quitosana desacetilada - QD

7.1.1 Titulação potenciométrica

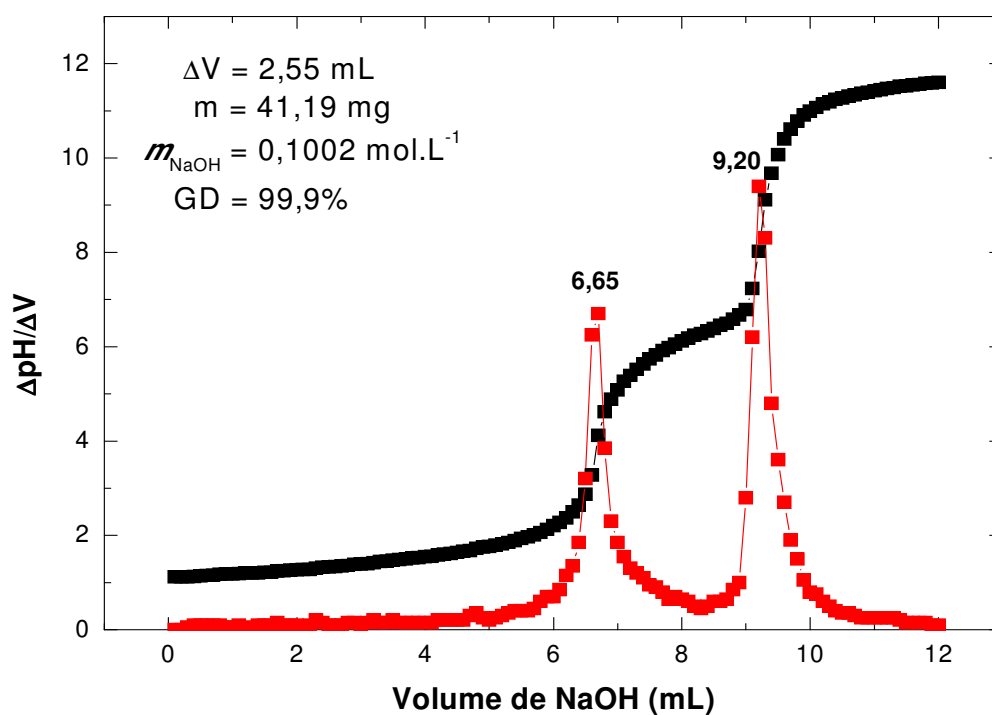


Figura 24. Curva de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada. Em preto: variação de pH em função do volume de NaOH; em vermelho: derivada primeira.

7.1.2 Massa molar viscosimétrica

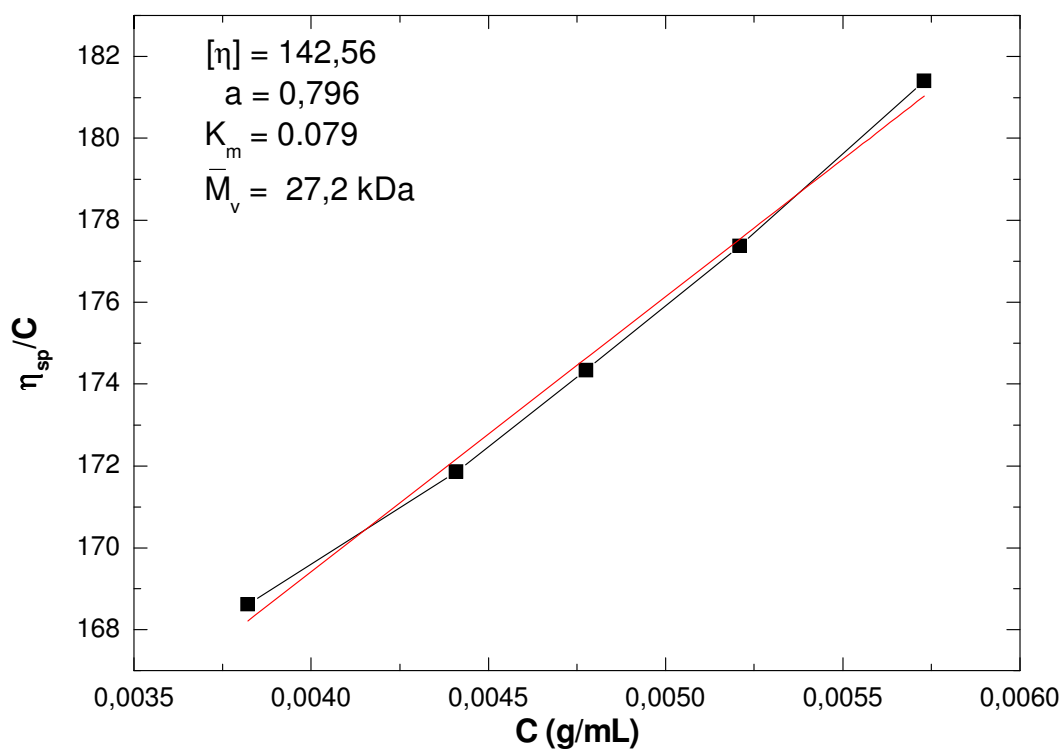


Figura 25. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana desacetilada.

7.1.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN¹H

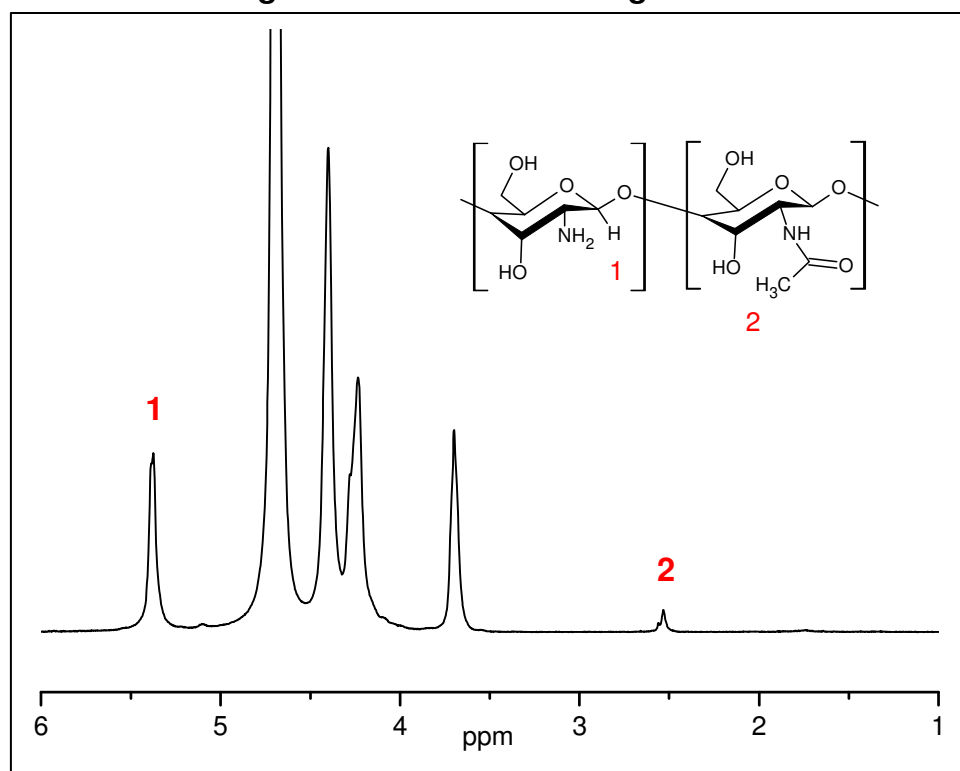


Figura 26. Espectro de RMN¹H para a QD.

7.2 Derivado quaternário – QPO50

7.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio – RMN¹H

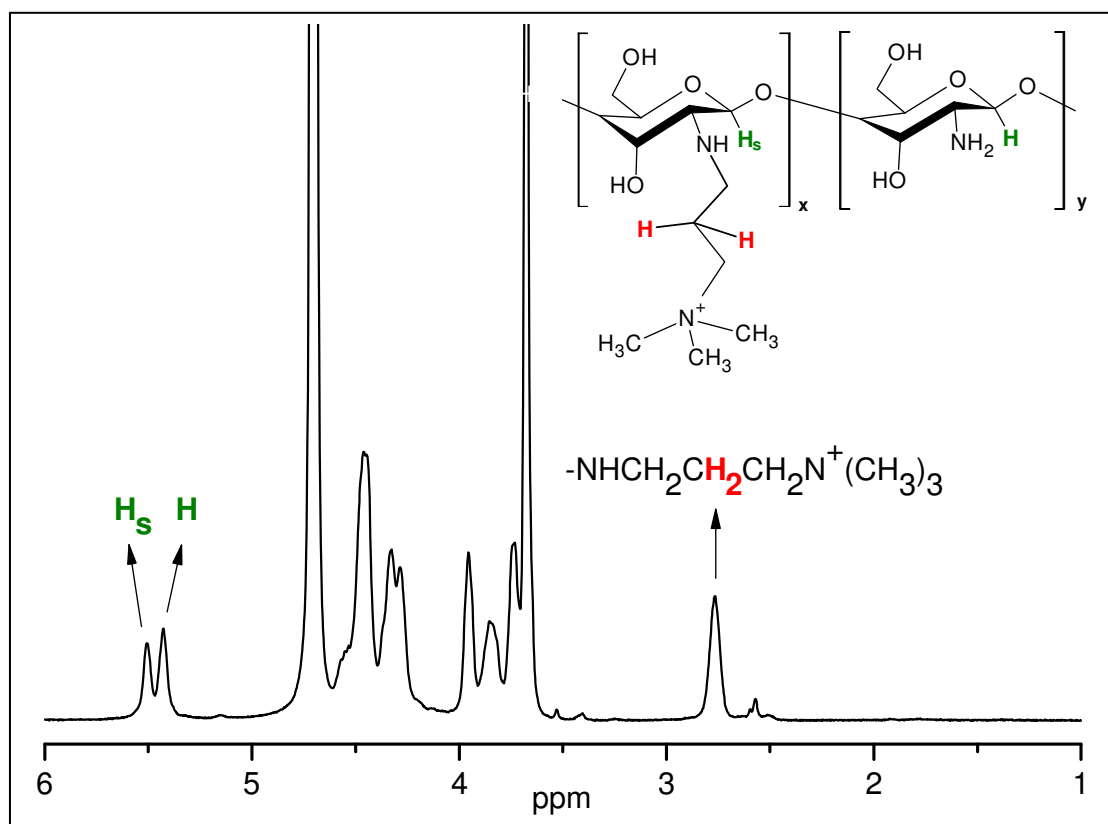


Figura 27. Espectro de RMN¹H para o derivado QPO.

7.2.2 Infravermelho (IV)

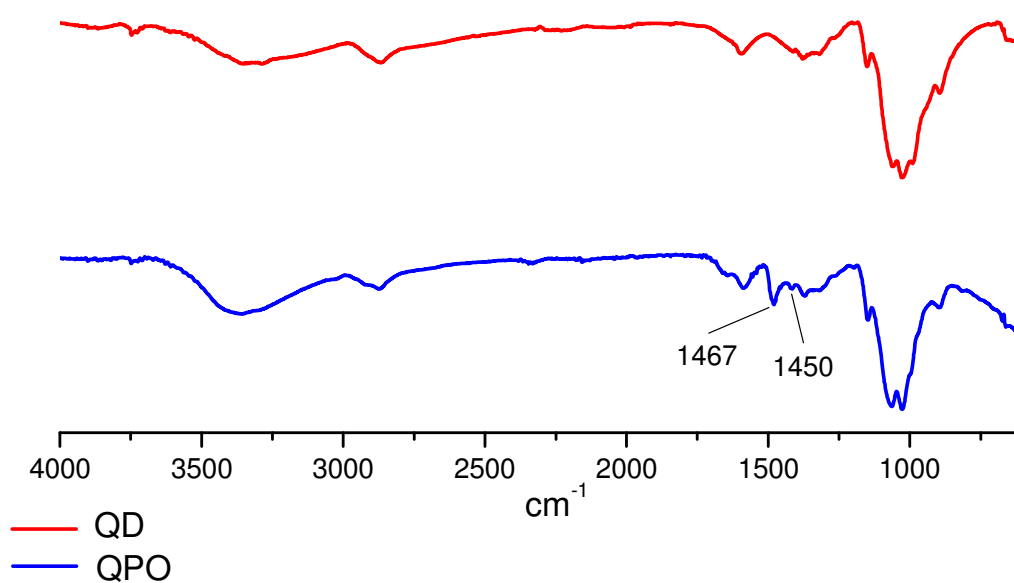


Figura 28. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e o derivado QPO50.

7.2.3 Massa molar viscosimétrica

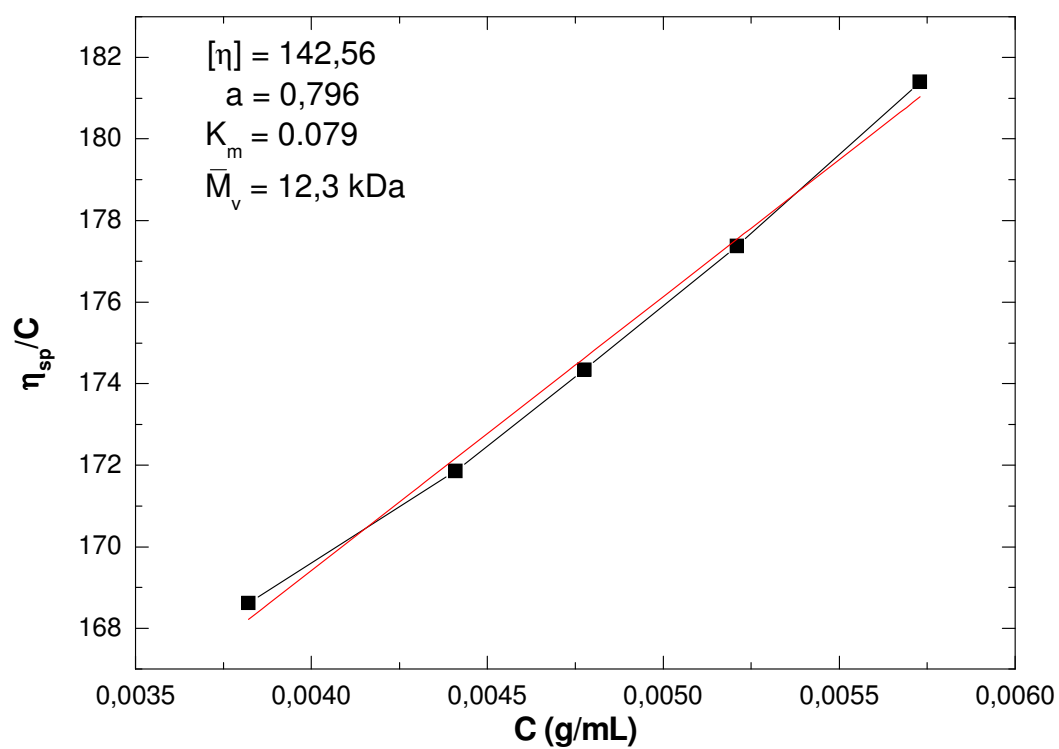


Figura 29. Gráfico para a determinação da massa molar viscosimétrica do derivado QPO50.

7.3 Derivados quaternários anfifílicos

7.3.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênios – RMN¹H

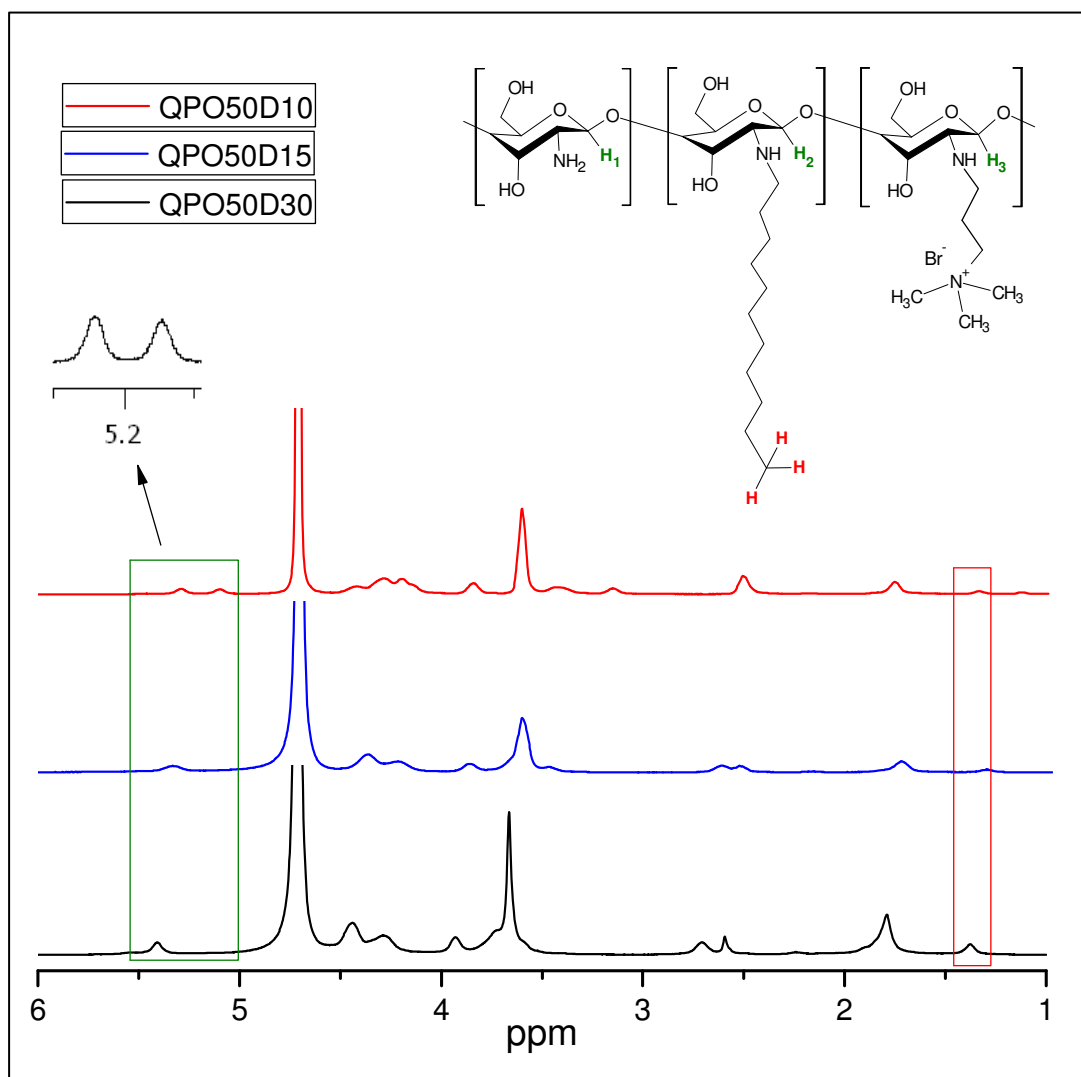


Figura 30. Espectro de RMN¹H para os derivados quaternários anfifílicos.

7.3.2 Infravermelho (IV)

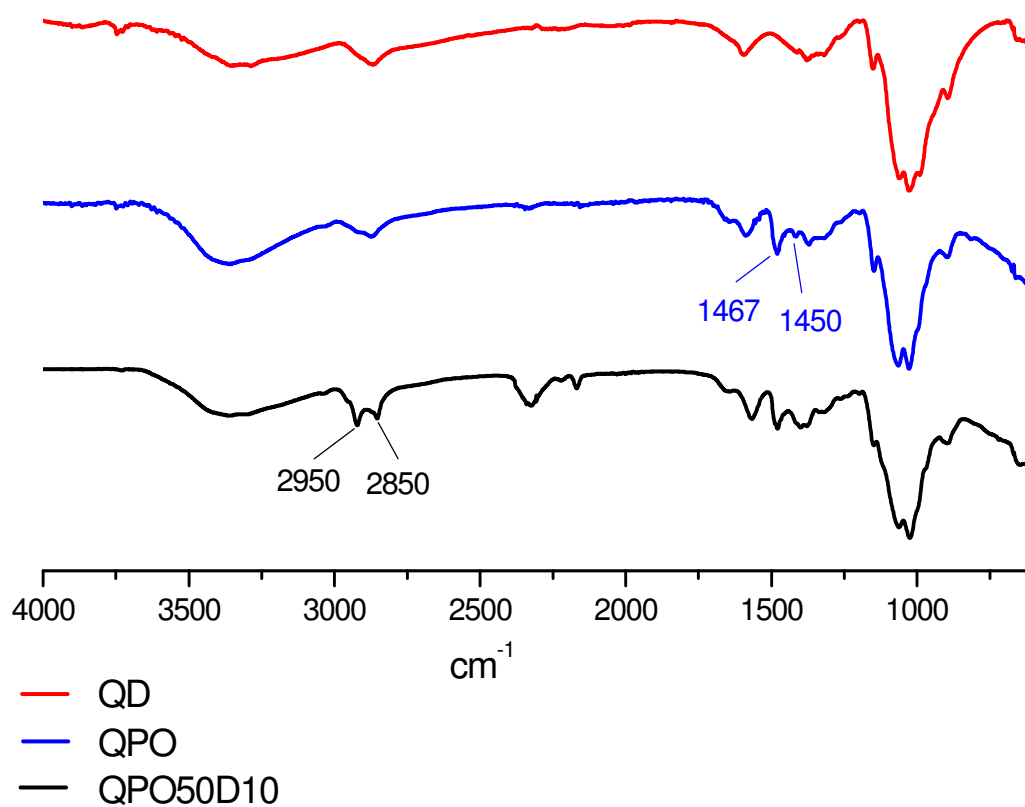


Figura 31. Espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) para a quitosana desacetilada e os derivados QPO50 e QPO50D10.