



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

Renan Surian de Oliveira

Desenvolvimento de um anfifílico de quitosana:
estudo da atividade antimicrobiana e antioxidante

São José do Rio Preto
2021

Renan Surian de Oliveira

Desenvolvimento de um anfifílico de quitosana:
estudo da atividade antimicrobiana e antioxidante

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

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto
2021

O48d

Oliveira, Renan Surian de

Desenvolvimento de um anfifílico de quitosana : estudo da atividade antimicrobiana e antioxidante / Renan Surian de Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2021

92 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

1. Química orgânica. 2. Quitosana. 3. Fungicidas. 4. Candida. 5. Antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Renan Surian de Oliveira

Desenvolvimento de um anfifílico de quitosana:
estudo da atividade antimicrobiana e antioxidante

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal
USP Ribeirão Preto - Faculdade de Farmácia

São José do Rio Preto
08 de julho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Antonia Vilma Surian e Flávio Antonio Alves de Oliveira, por todo o apoio, cuidado, coragem e confiança desde o início e em todos os momentos da minha vida. De maneira especial agradeço a Giovana pelo companheirismo durante todas as etapas desta jornada, por todo amor, motivação, apoio e parceria que tornaram estes e tantos outros sonhos possíveis.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera pelos ensinamentos, pela confiança em desenvolver esse projeto, por todo o apoio, cuidado, carinho e encorajamento durante todas as etapas.

Aos meus colegas de laboratório, Victor Augusto dos Santos Jonas, André Martinez e Leticia Mozaner por todo o apoio, disponibilidade, companheirismo e ideias compartilhadas. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Marcio José Tiera pelos ensinamentos, construção de ideias e pelo suporte oferecido durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço à Instituição UNESP-IBILCE por toda a estrutura disponibilizada.

Ao Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN), DQCA-IBILCE-UNESP.

Ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP.

Ao Laboratório de Química Bio-orgânica Ambiental (LQBoA), DCQA-IBILCE-UNESP

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 à qual agradeço.

RESUMO

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo a síntese, caracterização e avaliação da atividade antifúngica de derivados anfifílicos de quitosana modificados com diferentes conteúdos de vanilina contra espécies do gênero *Candida*, uma classe de fungos responsáveis por infecções que impactam o sistema de saúde e recentemente a sua resistência por antifúngicos comerciais tem dificultado o seu tratamento. Muitos antimicrobianos, como os antifúngicos, pertencem à mesma classe de fármacos, fazendo com que a resistência a um antifúngico específico acarrete na ineficácia de toda uma classe relacionada. Esses fatos culminam na diminuição da eficácia de tratamentos comuns e uma série de problemas na área da saúde, como o aumento da mortalidade, diminuição da proteção à pacientes em procedimentos cirúrgicos e o aumento dos custos com os enfermos. Os polímeros também foram testados para avaliar a atividade antioxidante contra o radical cátion de ABTS. Os radicais livres são compostos químicos derivados de diversas espécies. Essas espécies causam oxidações removendo elétrons de compostos químicos presentes no organismo, tornando-os extremamente reativos. Apesar do combate desses radicais livres ocorrerem de forma natural com antioxidantes endógenos, pode haver um desequilíbrio entre as espécies, o que causaria um aumento dos radicais livres, podendo atingir macromoléculas celulares causando diversos problemas ao organismo. A síntese dos derivados anfifílicos de quitosana de baixa e alta massa molecular (Mw) foi realizada com diferentes porções de vanilina. Identificaram-se os parâmetros estruturais mais importantes para maximizar a atividade fungicida e antioxidante dos derivados. A degradação polimérica foi realizada por meio da reação com nitrito de sódio e confirmada por GPC. O grau de substituição (GS) e o grau de desacetilação (GD) foram analisados por meio da espectroscopia de RMN- ^1H . A citotoxicidade dos polímeros foi avaliada seguindo o método colorimétrico (MTS) com células de fibroblastos NIH3/3T3, cujos resultados apresentaram uma baixa toxicidade para essas células, com a viabilidade celular acima de 70% para todos os polímeros analisados. Os efeitos antimicrobianos foram estudados por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e ensaio fungistático/fungicida. A atividade antioxidante foi analisada por meio da absorbância do radical ABTS em contato com os derivados. A desacetilação dos polímeros foi de 97% de grupos amino livres nos monômeros e a degradação polimérica diminuiu em até 27 vezes as cadeias do polímero ChDD e 23 vezes para o ChCD (polímero desacetilado e acetilado, respectivamente). Destaca-se os resultados obtidos dos polímeros ChCD e ChDDBSV46 que

apresentaram atividade antifúngica para a cepa de *C. albicans* ATCC e os derivados de vanilina-quitosana, ChDDV46 e ChDV52 que demonstraram atividade frente as cepas de isolados clínicos de *Candida tropicalis* (CT 7008 e CT 7015). Por fim, a atividade de eliminação do radical cátion de ABTS apresentou resultados acima de 80% em quase todas as concentrações, com exceção dos polímeros de partida que na maior concentração (1,5 g L⁻¹) não ultrapassaram os 50%. A vanilina demonstrou ser um ótimo antioxidante, sendo o sinergismo dos mecanismos de ação desse fenol aromático com os polissacarídeos o fator principal da atividade antioxidante dos derivados.

Palavras-chave: Quitosana. Vanilina. *Candida* spp. Derivados anfifílicos. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The present research project aimed to synthesize, characterize and evaluate the antifungal activity of amphiphilic derivatives of chitosan modified with different amounts of vanillin against species of the genus *Candida*, a class of fungi caused by infections that impact the health system and recently its resistance by commercial antifungals making their treatment more difficult. Many antimicrobials, such as antifungals, belong to the same class of drugs, which means that resistance to a specific antifungal generates resistance to all related classes. These facts culminate in the decrease in the effectiveness of common treatments and a series of problems in the health area, such as increased mortality, decreased protection for patients in surgical procedures and increased costs for the sick. The polymers were also tested to evaluate a scavenging activity against the cation radical of ABTS. Free radicals are chemical compounds derived from different species. These species cause oxidation by removing electrons from chemical species present in the body, making them extremely reactive. Although the fight against these free radicals occurs naturally with endogenous antioxidants, there may be an imbalance between species, which would cause an increase in free radicals, which could reach cellular macromolecules causing several problems to human health. The synthesis of amphiphilic derivatives of chitosan with low and high molecular weight (Mw) was performed with different portions of vanillin. The most important parameters were identified to maximize the fungicidal and scavenging activity of the derivatives. The polymeric degradation was carried out through the reaction with sodium nitrite and confirmed by GPC. The degree of substitution (DS) and the degree of deacetylation (DD) were evaluated by RMN- ^1H spectroscopy. The cytotoxicity of the polymers was evaluated following the colorimetric method (MTS) with NIH3/3T3 fibroblast cells, results obtained with low toxicity for these cells, with cell viability above 70% for all the polymers. The antimicrobial effects were studied by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and fungistatic/fungicide assay. The antioxidant activity was analyzed by the absorbance of the radical in contact with the derivatives. The deacetylation of the polymers reached 97% of the free amino groups in the monomers and the polymeric degradation decreased by up to 27 times the chains of the ChDD polymer and 23 times for the ChCD (deacetylated and acetylated polymer, respectively). The results obtained from the ChCD and ChDDBSV46 polymers, which demonstrated antifungal activity for the strain of *C. albicans* ATCC and the vanillin-chitosan derivatives (ChDDV46 and ChDV52) which demonstrated activity against

strains of *Candida tropicalis* (CT 7008 and CT 7015). Finally, the capacity of eliminating the cation radical of ABTS presented results above 80% in almost all concentrations, except the starting polymers which in the highest concentration (1.5 g L^{-1}) did not exceed 50%. Vanillin is a great antioxidant and the synergism of this phenol aromatic mechanisms with polysaccharides being the main factor of the derivatives antioxidant activity.

Keywords: Chitosan. Vanillin. *Candida* spp., Amphiphilic derivatives. Antimicrobial activity. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens obtidas de Microscopias Eletrônicas de Transmissão das hifas do fungo <i>A. flavus</i> . A, B e C, D são hifas crescidas na ausência e na presença do polímero (Q 40% DEAE), respectivamente.	19
Figura 2: Principais morfologias das espécies de <i>Candida</i>	23
Figura 3: Taxas relativas de infecções por espécies de <i>Candida</i>	24
Figura 4: Esquema dos três estágios de formação de biofilme da <i>C. albicans</i>	26
Figura 5: Exemplo de um mecanismo de ação de um antifúngico convencional (Mecanismo de ação dos Azóis). (A) Funcionamento pleno da síntese do ergosterol (componente essencial para o bom funcionamento da célula do fungo). (B) Síntese de um esterol tóxico pela intervenção dos compostos azólicos. O alvo específico dos azóis é a enzima Lanesterol 14 α -desmetilase (Erg11) da família do citocromo P450. O azol se liga ao Ferro (III) na região heme de interação, impedindo o substrato enzimático natural de lanesterol, modificando a via biossintética produzindo um esterol tóxico para a membrana celular do fungo.	28
Figura 6: Esquema de desacetilação de quitina com NaOH para a formação da quitosana (elaborado pelo autor, 2020). O grau de desacetilação relativo à quitosana pode ser controlado durante o processo da hidrólise alcalina aplicado à quitina, por meio de uma combinação de altas temperaturas e longo tempo de reação.	30
Figura 7: Protonação dos grupos amina da quitosana em meio ácido e a interação destes com a água.....	31
Figura 8: Possível mecanismo da ação antifúngica da quitosana. Interação eletrostática entre os grupos NH ₃ ⁺ da quitosana com a região polar negativa dos fosfolipídios da membrana celular de uma espécie de <i>Candida</i>	33
Figura 9: Estruturas moleculares 2D e 3D da Vanilina.....	34
Figura 10: Número de artigos publicados sobre bioatividades da vanilina.....	35
Figura 11: Formação do radical superóxido a partir da molécula de oxigênio.	37
Figura 12: Mecanismo de ação da vitamina E (α -tocoferol) com um lipídio idroperóxidos (LOO $\bullet$).	41
Figura 13: Comparação da vanilina e orto-vanilina com a interação intramolecular do aldeído com o grupo hidroxila dessa espécie.	43
Figura 14: Esquema de desacetilação da quitosana em meio básico, atmosfera de N ₂ e altas temperaturas.....	45

Figura 15: Esquemática do processo de síntese dos derivados de quitosana enxertados com vanilina.	47
Figura 16: Esquema da síntese dos derivados anfifílicos de quitosana enxertados com vanilina.	48
Figura 17: Esquema da preparação estoque dos polímeros.....	51
Figura 18: Layout da placa 1 de microdiluição. CIM de da quitosana comercial desacetilada (ChCD), um derivado de quitosana desacetilada degradada com 46% de vanilina como base de Schiff (ChDDBS46), Vanilina pura e um derivado de quitosana comercial desacetilada com 18% de vanilina (ChCDV18) frente cepas ATCC e de isolados clínicos de <i>Candida Albicans</i>	52
Figura 19: Layout da placa 2 de microdiluição. CIM de um derivado de quitosana desacetilada com 52% de vanilina (ChDV52) e um derivado desacetilado degradado com 46% de vanilina (ChDDV46) frente a cepas clínicas e isoladas de <i>Candida Albicans</i>	53
Figura 20: Layout da placa 3 de microdiluição. CIM dos mesmo derivados da placa 2 frente a cepas clínicas e isoladas de <i>Candida Tropicalis</i>	53
Figura 21: Placa de Ágar Sabouraud grande com o mapa do layout das placas de microdiluição utilizadas como gabarito da perfuração.....	54
Figura 22: Esquema da preparação das soluções e análise da atividade antioxidante dos derivados de quitosana.....	56
Figura 23: Mecanismo de reação do processo de desacetilação da quitosana.	57
Figura 24: Espectro de RMN- H^1 em D_2O/DCI a 70 °C da quitosana desacetilada (ChD).	59
Figura 25: Espectro de RMN- H^1 da quitosana comercial (ChC) em D_2O/DCI a 70 °C.	60
Figura 26: Gráfico do GI dos derivados de quitosana enxertados com vanilina e as quitosanas de partida.	61
Figura 27: Mecanismo de reação da quitosana com a vanilina e a redução da base de Schiff com $NaBH_4$	63
Figura 28: Espectro de RMN- H^1 com os valores das integrais dos picos de interesse da ChCDV18 (quitosana comercial degradada enxertada com vanilina, e pH ajustado em pH 5,1)	64
Figura 29: Espectro de RMN- H^1 com os valores das integrais dos picos de interesse da ChDDV46 (quitosana desacetilada degradada enxertada com vanilina, e pH 6,5).	65
Figura 30: Espectro de RMN- H^1 da quitosana desacetilada de alta Mw (ChDV52).	66
Figura 31: Formação de Formazan resultante da redução do MTS por meio da redutase mitocondrial do método colorimétrico.	68

Figura 32: Gráfico da viabilidade celular de cada polímero em diferentes concentrações para células de fibroblastos NIH3/3T3.....	69
Figura 33: Placa de microdiluição do polímero de partida, de dois derivados de vanilina e da vanilina pura.	71
Figura 34: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de <i>Candida albicans</i>	72
Figura 35: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i>	73
Figura 36: CFM do polímero de partida, de dois derivados de vanilina e da vanilina pura. ..	76
Figura 37: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de <i>Candida albicans</i>	77
Figura 38: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de isolados clínicos de <i>Candida tropicalis</i>	78
Figura 39: Atividade de eliminação do radical livre ABTS ^{•+} pelos polímeros de partida, os derivados anfifílicos de quitosana e a vanilina. O ácido L-ascórbico foi utilizado como antioxidante referência, nas diferentes concentrações em 10 minutos de ação de cada composto frente ao radical.....	80
Figura 40: Perfil da atividade antioxidante (em 10 minutos de ação) dos compostos testados nas diferentes concentrações.	81
Figura 41: Cubetas contendo a solução do radical cátion de ABTS antes e depois da atividade antioxidante de um dos derivados de quitosana e da vanilina, ambos na mesma concentração (1 g L ⁻¹).....	82
Figura 42: Decaimento da absorbância do radical ABTS ^{•+} por tempo da atividade antioxidante dos polímeros na concentração de 0,75 g L ⁻¹ por 30 minutos.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes e mecanismos de ação dos principais antifúngicos convencionais.....	27
Tabela 2: Exemplos de fontes endógenas e exógenas de radicais livres	37
Tabela 3: Lista de algumas ERO e ERN produzidas durante o metabolismo	38
Tabela 4: Modos de ação dos antioxidantes e seus mecanismos.....	39
Tabela 5: Preparo dos polímeros nas concentrações desejadas e tempo de análise	55
Tabela 6: Valores de Mw, Mn e polidispersão dos polímeros de quitosana	58
Tabela 7: Porcentagem de grupos aminos livres das quitosanas analisadas.....	61
Tabela 8: Massa molecular ponderal média (Mw), grau de substituição (GS) e grau de desacetilação dos derivados.....	67
Tabela 9: Valores de CIM das cepas estudadas para os derivados de quitosana e vanilina	74
Tabela 10: Valores de CFM das cepas estudadas para os derivados de quitosana e vanilina .	79
Tabela 11: Variação da absorbância de t_{10} e t_{30} das amostras analisadas.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS= 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

BS= Base de Schiff

CFM= Concentração fungicida mínima

ChC= Quitosana comercial

ChCD= Quitosana comercial degradada

ChCDV18= Quitosana comercial degradada com 18% de vanilina

ChD= Quitosana desacetilada

ChDD= Quitosana desacetilada degradada

ChDDV46= Quitosana desacetilada degradada com 46% de vanilina

ChDV52= Quitosana desacetilada com 52% de vanilina

CIM= Concentração inibitória mínima

CNA= *Candida não-albicans*

DD= Dodecil

DEAE= Dietilaminoetil

DMEM= Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ERN= Espécie reativa de nitrogênio

ERO= Espécie reativa de oxigênio

GD= Grau de desacetilação

GPC= Cromatografia de permeação em gel

GS= Grau de substituição

kDa= Quilodalton

Mn= Peso molecular médio em número

MOPS= Ácido morfopropileno sulfônico

MTS= 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

Mw= Peso molecular médio em peso

NAG= N-acetilglicosamina

OMS= Organização mundial da saúde

pH= Potencial hidrogeniônico

RMN- H^1 = Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI= Roswell park memorial institute

UTI= Unidade de tratamento intensivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	<i>Candida spp.</i>	22
2.2	Epidemiologias e patogenicidade das espécies de <i>Candida</i>.	23
2.2.1	Epidemiologia.....	23
2.2.2	Patogenicidade	25
2.3	Antifúngicos convencionais e mecanismos de resistência	26
2.4	Quitosana.....	29
2.5	Efeitos antimicrobianos da quitosana e seus derivados	31
2.6	A Vanilina e a sua possível aplicação como agente antifúngico	33
2.6.1	Vanilina.....	33
2.6.2	Efeitos antimicrobianos da vanilina	35
2.7	Radicais livres	37
2.8	Antioxidantes	39
2.8.1	Mecanismos de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos	40
2.9	Vanilina e Derivados de quitosana como antioxidantes.....	41
2.9.1	Derivados de quitosana.....	41
2.9.2	Vanilina.....	42
3.	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo Geral.....	44
3.2	Objetivos Específicos	44
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Síntese dos derivados anfifílicos	45
4.1.1	Desacetilação da quitosana comercial	45
4.1.2	Degradação polimérica	45
4.1.3	Síntese dos derivados de quitosana enxertados com vanilina	46

4.2	Caracterização dos polímeros.....	49
4.2.1	Determinação do grau de desacetilação da quitosana.....	49
4.2.2	Degradação polimérica	49
4.2.3	Grau de ionização dos derivados em função do pH	49
4.2.4	Determinação do grau de substituição da vanilina nos grupos amino livres	49
4.3	Ensaio de citotoxicidade dos derivados de quitosana	50
4.3.1	Preparação das soluções estoque dos derivados	50
4.3.2	Procedimento dos ensaios de citotoxicidade	50
4.4	Ensaio microbiológico	51
4.4.1	Cepas de <i>Candida</i> spp.	51
4.4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.4.3	Preparo das placas de microdiluição.....	52
4.4.4	Teste da atividade antifúngica	54
4.5	Testes da atividade antioxidante dos derivados anfifílicos frente ao radical cátion ABTS^{•+}	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Síntese dos derivados anfifílicos	57
5.1.1	Reação de desacetilação da quitosana comercial.....	57
5.1.2	Degradação polimérica	58
5.2	Caracterização dos polímeros.....	58
5.2.1	Determinação do grau de desacetilação da quitosana.....	58
5.2.2	Determinação do grau de desacetilação da quitosana comercial.....	60
5.2.3	Grau de ionização	61
5.2.4	Determinação do grau de substituição da vanilina nos grupos amino.....	62
5.3	Ensaio de citotoxicidade dos derivados de quitosana	67
5.4	Ensaio microbiológico	70
5.4.1	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	70
5.4.2	Teste da atividade antifúngica	75

5.5	Testes da atividade antioxidante dos derivados anfífilicos frente ao radical cátion $ABTS^{\bullet+}$	79
6.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é a habilidade de um microrganismo (como bactérias e vírus) de não sofrer efeitos potenciais dos agentes antimicrobianos (tais como antibióticos e antifúngicos). Esse fato culmina na diminuição da eficácia de tratamentos comuns e na persistência das infecções (WHO, 2014). Além do aumento na mortalidade, as médias de permanência, diminuição da proteção à pacientes em procedimentos médicos e aumento dos custos com os enfermos. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015)

Muitos antimicrobianos, como os antifúngicos, pertencem à mesma classe de fármacos (contém um princípio ativo similar e possuem a mesma função), fazendo com que a resistência a um antifúngico específico acarrete na resistência de toda uma classe relacionada. (MARTINEZ, [s.d.]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015)

A candidíase, por exemplo, causada pelo fungo *Candida albicans* foi considerada a infecção oportunista mais comum em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), (MILAN et al., 1998) e também é a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas adquiridas em hospitais, chegando a uma taxa bruta de até 50% (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). A *C. albicans* tem demonstrado resistência a alguns antifúngicos, especialmente a Anfotericina B e aos compostos triazólicos, como o fluconazol, que são os mais administrados. (SANGLARD; ODDS, 2002). Este fungo, diferente das bactérias, é constituído de células eucariontes assim como nos mamíferos, o que os tornam mais semelhantes às células humanas, porém, é possível identificar as diferenças. As células de mamíferos apresentam uma membrana celular, enquanto que as fúngicas além dessa possuem uma parede celular externa, essa que por sua vez se torna um alvo lógico de ação para uma classe de drogas antifúngicas. (LEMKE et al., 2012; MAFFEI, 2002; SUDBERY, 2011)

As membranas acima citadas são constituídas de esteróis, um componente da membrana celular que é indispensável para seu bom funcionamento. A diferença mais amplamente explorada, no entanto, é que são compostas por diferentes esteróis, sendo a dos mamíferos o colesterol e a dos fungos o ergosterol. (LEMKE et al., 2012; MAFFEI, 2002).

Dentro deste contexto, os fungicidas baseados em produtos naturais (BONILLA; SOBRAL, 2016) e óleos essenciais (NOGUEIRA et al., 2010) são opções muito interessantes para a produção de biofungicidas. A busca por compostos não tóxicos para a utilização como inibidores de crescimento de fungos tem recentemente impulsionado a pesquisa neste campo (NOGUEIRA et al., 2010). Neste cenário, a quitosana tem sido considerada um agente antimicrobiano, cuja atividade é principalmente atribuída à interação eletrostática de suas

cadeias policatiônicas com a parede celular e as membranas dos microrganismos. (SAHARIAH; MÁSSON, 2017)

Diversos trabalhos têm abordado a influência da massa molecular (Mw) da quitosana nas propriedades antifúngicas (HERNÁNDEZ-LAUZARDO et al., 2008; SEYFARTH et al., 2008). Entretanto, os resultados encontrados na literatura são muitas vezes contraditórios. Seyfarth (2008) e colaboradores constataram que a atividade antimicrobiana do polímero contra espécies de *Candida* spp. diminuiu com o decréscimo da massa molecular, no entanto, KULIKOV e colaboradores (2014) encontraram que oligoquitosanas de Mw entre 2-20 kDa inibiram com maior eficiência o crescimento da *Candida albicans*. Portanto, a melhor atividade antimicrobiana é resultado da interação da cadeia anfifílica com os fosfolipídios da membrana celular (HUANG; KHOR; LIM, 2004). Sendo assim a análise somente da massa molecular não é o suficiente, portanto a presença de cargas positivas e a natureza anfipática da cadeia polimérica também são importantes para potencializar a atividade antifúngica destes polímeros.

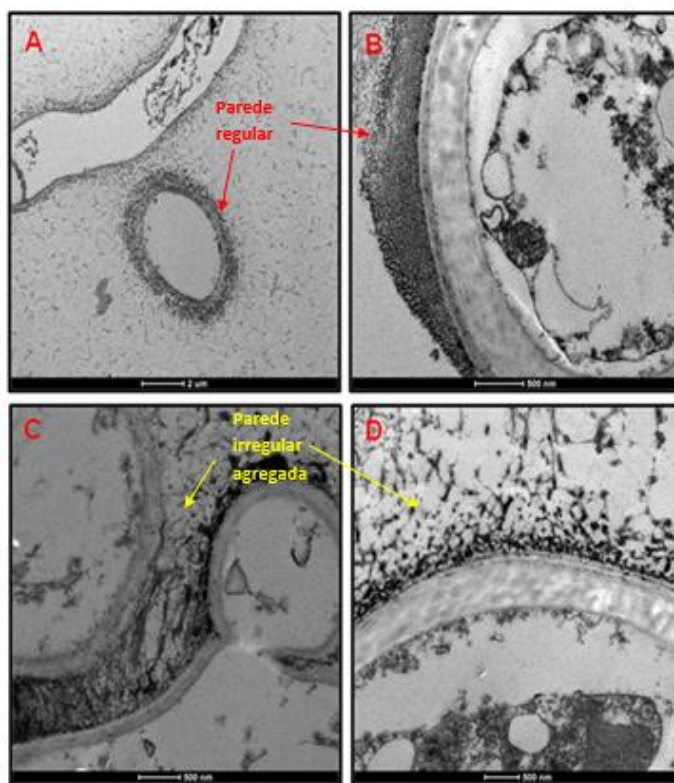
Nesse sentido, estudos realizados pelo grupo de Biomateriais e Nanotecnologia do Ibilce-UNESP, tem demonstrado o efeito da atividade fungicida de derivados de quitosana com diferentes conteúdos de grupos hidrofóbicos contra os fungos do gênero *Aspergillus*. Os resultados desses trabalhos mostraram que os grupos hidrofóbicos ligados à cadeia de quitosana aumentam a atividade antimicrobiana, mas são dependentes da massa molecular do polímero (GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015) confirmando que o balanço hidrofílico/hidrofóbico é extremamente importante para obter uma maior atividade antifúngica (SAJOMSANG et al., 2012).

Utilizando-se derivados quaternários de quitosana modificados com grupos dodecil (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013; TAKAKI, M.; DIAS, A. M.; DOS SANTOS GABRIEL, J. S.; DE OLIVEIRA PEDRO, RAFAEL; SOUZA, R. H. F. V.; TIERA, M. J.; DE OLIVEIRA TIERA, 2014; VIEGAS DE SOUZA et al., 2013) demonstraram inibição crescente com o conteúdo lipofílico e com a concentração de polímero contra os fungos do gênero *Aspergillus*. Observou-se que na concentração de 0,5 g L⁻¹, todos os derivados anfifílicos com graus de substituição de 7,0 a 29% de grupos dodecil, inibiram completamente o crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A concentração inibitória mínima foi diminuída em até 16 vezes àquela apresentada para quitosana não modificada, confirmando a importância do conteúdo hidrofóbico na atividade antimicrobiana.

Em outro estudo, utilizando derivados obtidos pela reação de quitosanas de diferentes massas moleculares com cloreto de 2-cloro-N,N-dietiltilamina (DEAE) foi observado também inibição crescente com o aumento da concentração do polímero contra os fungos do gênero

Aspergillus. Os resultados permitiram concluir que a presença de grupamentos hidrofóbicos na estrutura da quitosana também aumentou a capacidade de inibição do crescimento de *A. flavus* mostrando, em alguns casos, a inibição de 100% do crescimento do fungo (GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015). Em trabalho recente, o mecanismo de inibição foi estudado, sendo concluído que a perturbação da parede tem um papel importante na inibição do crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* (Figura 1) (DIAS et al., 2018). As estruturas das hifas apresentam uma parede regular com seus componentes distribuídos de maneira uniforme ao redor da membrana (Figura 1A), que na presença de quitosana contendo 40% de grupos DEAE (figura 1 C, D) mostraram-se desestruturadas e agregadas. As observações indicaram que além dos pigmentos dos conídios interagirem com a quitosana anfifílica via interações hidrofóbicas, podem também interagir eletrostaticamente, e desta forma, contribuir para a desestruturação de uma barreira de defesa que tem função de proporcionar aos fungos maior resistência em meio ambientes hostis. A consequência da desestruturação desta organização celular é a vulnerabilização da célula, visto a importância desta, para proteção contra desidratação (principalmente nos conídios), adesão e sustentação celular e proteção contra o ataque de patógenos (DIAS et al., 2018).

Figura 1: Imagens obtidas de Microscopias Eletrônicas de Transmissão das hifas do fungo *A. flavus*. A, B e C, D são hifas crescidas na ausência e na presença do polímero (Q 40% DEAE), respectivamente.



Fonte: Adaptado de DIAS et al., 2018

Todos esses resultados evidenciaram que os derivados de quitosana tem uma faixa ótima de valor de Mw e o balanço hidrofílico/hidrofóbico das modificações na cadeia polimérica podem explicar a maior eficiência do polímero contra diferentes microrganismos que apresentam paredes celulares e membranas com propriedades variadas. (GABRIEL et al., 2015; DIAS et al., 2018; A.KULIKOV et al., 2014)

Nesse sentido, baseado em resultados promissores da ação desses polímeros sobre os fungos do gênero *Aspergillus* foi proposto o desenvolvimento de um novo biofungicida com potencial aplicação contra espécies do gênero *Candida*, uma vez que a resistência antimicrobiana desses fungos prejudica todas as áreas da saúde, envolvendo muitos setores e causando impacto considerável no conjunto da sociedade. (DOMÍNGUEZ et al., 1998; MÜLLER; KARA-JOSÉ; DE CASTRO, 2013; WALSH, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Portanto, no presente trabalho foi proposto o estudo de derivados anfifílicos de quitosana modificados com vanilina, a qual em estudos recentes tem sido explorada para inibição de microrganismos indesejáveis. (ANTONIOLLI et al., 2006; CAVARODA et al., 2012; CHENIA, 2015; GARCÍA-RÍOS et al., 2018; MOHAMED; SHARABY, 2007; NGARMSAK et al., 2016; ORHAN-YANIKAN et al., 2019; YADAV; SAINI; YADAV, 2018)

A atividade dos derivados anfifílicos foi testada, buscando-se identificar as melhores composições e os parâmetros estruturais que afetam a sua atividade fungicida.

A quitosana pode ser aplicada em diversas áreas, como na indústria de alimentos, no tratamento de águas residuais, nos cosméticos e, além de um potencial antifúngico, na área farmacêutica também atua como cicatrizante de feridas e ossos, no controle do colesterol, lentes de contato e como agente antioxidante, entre outros. (FENG et al., 2008; HUANG; MENDIS; KIM, 2005; KORMA et al., 2018; PARK; JE; KIM, 2004; SUN et al., 2008)

De maneira análoga, a vanilina também vem sendo estudada como um agente antioxidante. (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002; TAI et al., 2011), desta forma, o projeto visa também testar a atividade antioxidante dos derivados de vanilina-quitosana frente a radicais livres.

Os radicais livres são compostos químicos derivados de diversas espécies e que apresentam elétrons desemparelhados. Isso faz com que as oxidações removam elétrons de espécies químicas presentes no organismo, tornando-as extremamente reativas. Apesar do combate desses radicais livres ocorrerem de forma natural com antioxidantes endógenos, pode haver um desequilíbrio entre as espécies, culminando num aumento dos radicais livres, que atinge as macromoléculas celulares que pode gerar diversos problemas ao organismo.

Alguns dos danos causados por essas espécies ocorrem nas proteínas, ácidos nucleicos e lipídios promovendo alterações dessas moléculas, que resulta no surgimento de algumas doenças, tais como diabetes, doenças cardíacas, aterosclerose, doenças hepáticas e câncer. (ADWAS et al., 2019; DEVASAGAYAM et al., 2004)

Neste sentido foi proposto no presente trabalho uma ampliação da aplicação desses derivados visando como alvo a *Candida albicans*, onde foi possível avaliar um possível sinergismo das propriedades antimicrobiana e antioxidante dos derivados anfifílicos de quitosana enxertados com vanilina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Candida* spp.

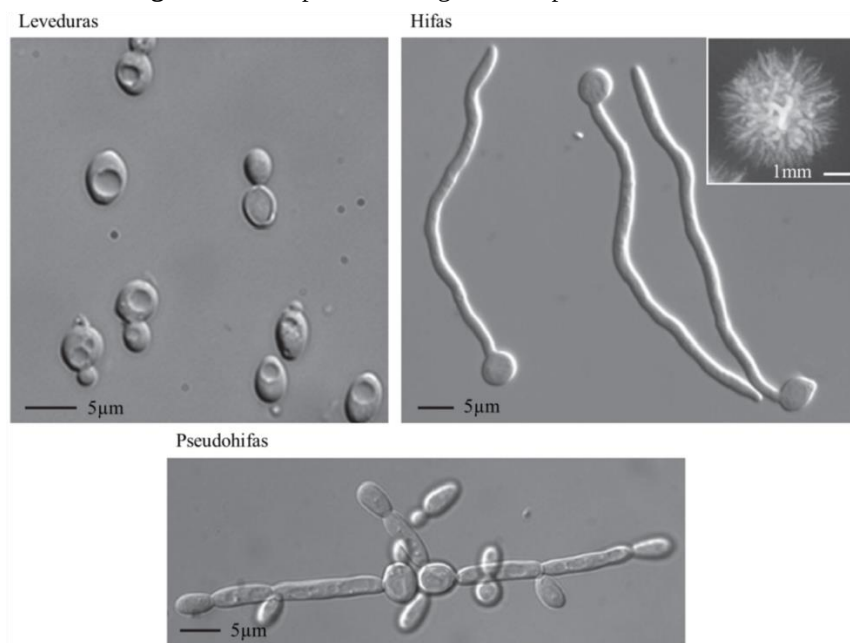
As espécies do gênero *Candida* estão presentes naturalmente na microbiota humana, podendo se alojar na boca, garganta, intestino e vagina, porém, a partir do final do século XX, observou-se que foram capazes, em certas condições favoráveis, se disseminar por todo o hospedeiro causando diferentes tipos de doenças.

Nas últimas décadas, houve um aumento considerável de infecções causadas por *Candida* spp., principalmente nas unidades de terapia intensiva (UTI) dos hospitais. Esse acréscimo nos casos está relacionado diretamente a alguns fatores de risco envolvendo os pacientes, como: o baixo peso, nascimento prematuro, doenças congênitas, deficiência imunológica, uso de cateteres vasculares, longa estadia nas dependências hospitalares, entre outros. (Colombo & Guimarães, 2003; Garcia-Rubio, de Oliveira, Rivera, & Trevijano-Contador, 2020; Kewaunee & Allen, 2007; Ruano et al., 2016; Singh, Tóth, & Gácsér, 2020; Sobel, 2007; Storti et al., 2012; Cowen, Sanglard, Howard, Rogers, & Perlin, 2015)

A *Candida* pertence à classe Ascomycetes e à família Saccharomycetaceae, é um fungo que inclui uma gama extremamente heterogênea de organismos que podem crescer como leveduriforme (Figura 2). Em condições padrões e com os nutrientes ideais, as leveduras crescem de forma exponencial como células em brotamento que podem alterar da forma esférica à oval, porém, espécies como a *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* podem produzir um tipo de crescimento filamentoso tanto como hifas ou como pseudohifas (mais comuns), demonstrados na Figura 2. (SUDBERY, 2011)

A diferença entre hifas e pseudohifas está estritamente relacionada à sua formação, as hifas são formadas por meio de células de leveduras ou por ramos de hifas existentes, já pseudohifas são formadas a partir de células de leveduras ou hifas por brotamento, mas o novo crescimento conserva-se ligado à célula-mãe. Também não há paredes cruzadas internas (septos) relacionadas à pseudohifas.

Sendo assim, pode-se afirmar que as espécies *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* são polimórficas tendo em vista suas possibilidades de formar hifas e pseudohifas. Por outro lado, *C. glabrata* não é uma espécie polimórfica, seu crescimento se dá como blastoconídios (levedura) e a *C. parapsilosis* por sua vez não produz hifas, mas pode gerar pseudohifas que são grandes e curvadas, também conhecidas como “células gigantes”. (SILVA et al., 2012)

Figura 2: Principais morfologias das espécies de *Candida*

Fonte: Adaptado de Sudbery, 2011

Entre as espécies de fungos que já foram isoladas de humanos, a *Candida albicans* é a mais frequente nos casos de infecções invasivas e também em pacientes saudáveis. Esse é o fungo patógeno oportunista mais importante e mais amplamente estudado. (GARCIA-RUBIO et al., 2020; SILVA et al., 2012; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013)

Contudo, a partir do início do século XXI houve um aumento significativo de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) que pode estar relacionado com a melhora no diagnóstico, por meio de novas tecnologias de análises para diferenciar as espécies de *Candida*. Além disso, essa prevalência de espécies de CNA pode estar relacionada à resistência de alguns antifúngicos convencionais, possivelmente por serem utilizados em infecções por esse fungo mesmo quando há espécies mistas presentes no hospedeiro. (SILVA et al., 2012)

2.2 Epidemiologias e patogenicidade das espécies de *Candida*.

2.2.1 Epidemiologia

A epidemiologia é o estudo científico de doenças e como elas são encontradas, disseminadas e controladas em grupos de pessoas.

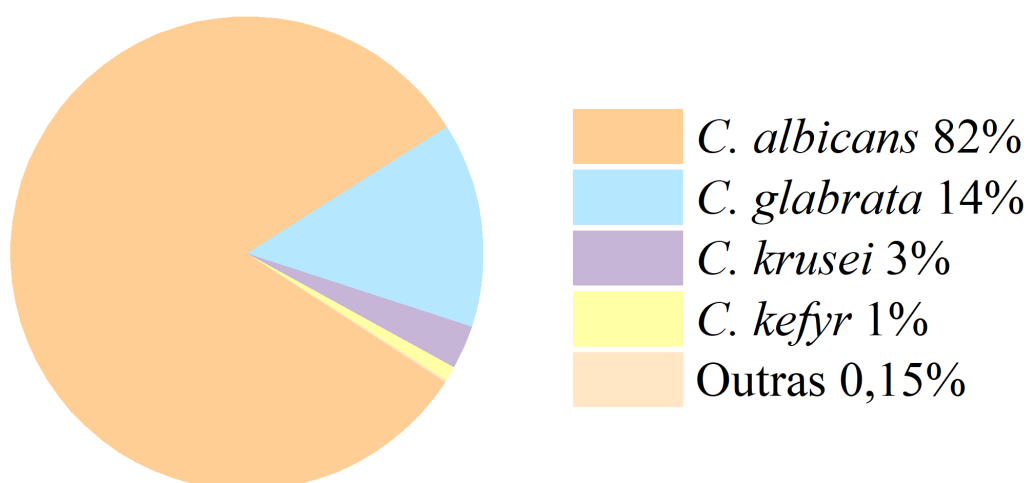
Muitas das espécies de *Candida*, como mencionado anteriormente, são comensais e formam colônias na pele e na mucosa. Pessoas extremamente doentes ou imunocomprometidas (pacientes cujos mecanismos normais de defesa contra infecção estão comprometidos) tem uma maior propensão a desenvolver candidíase superficial e outras

infecções potencialmente fatais. Essas pessoas costumam ser receptores de transplante e de implante, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e indivíduos com câncer. (SARDI et al., 2013; SINGH; TÓTH; GÁCSEK, 2020)

Os pacientes diagnosticados com AIDS são os que mais sofrem com as infecções causadas por *Candida*. Como consequência, eles lidam com a desnutrição e com a baixa absorção de medicamentos devido ao desenvolvimento da candidíase orofaríngea (infecção mais comum entre os pacientes portadores do vírus).

O fungo com o maior índice de infecções fúngicas é *C. albicans* (Figura 3) essa espécie impacta na saúde e na economia culminando em desafios na área da saúde pública mundial devido a suas altas taxas de mortalidade e pelo acréscimo considerável nos custos financeiros de atendimento aos pacientes e suas longas estadias hospitalares. (RUANO et al., 2016; SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012; SINGH; TÓTH; GÁCSEK, 2020)

Figura 3: Taxas relativas de infecções por espécies de *Candida*



Fonte: Adaptado de Ruano et al., 2016

Por mais que a *C. albicans* seja a espécie com maior prevalência nas infecções fúngicas invasivas, o número de infecções por *Candida* não-*albicans* vem crescendo. Em estudos nos Estados Unidos, mais de 2000 pacientes foram constatados com uma prevalência das infecções por espécies não-*albicans*. Uma análise realizada em países na Europa apontou que em 50% dos casos de candidemia (infecção da corrente sanguínea ocasionada por leveduras do gênero *Candida*) eram causados por *C. albicans* e as demais eram por não-*albicans*, sendo 14% para *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, 7% *C. tropicalis* e 2% para *C. krusei*. (SARDI et al., 2013)

Na América Latina também foram observadas mudanças na epidemiologia do fungo. No Chile, por exemplo, um aumento das espécies de CNA, como *C. parapsilosis* (mais frequente), *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi constatado. De acordo com a Rede Brasileira de Estudos de Candidemia, 40,9% dos casos são referentes à *C. albicans* seguida por 20,9% de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) dos casos no Brasil. Essa distribuição é consistente com estudos realizados na Argentina e também no Chile. (NUCCI et al., 2010; SARDI et al., 2013; SINGH; TÓTH; GÁCSEI, 2020)

2.2.2 Patogenicidade

A Patogenicidade refere-se à habilidade de um organismo causar doenças, dessa forma, o fungo do gênero *Candida* pode causar infecções que são comumente classificadas como candidíase ou candidose, essas infecções tem uma gama variada de possibilidades de se manifestarem no hospedeiro, portanto, podem ser classificadas como superficiais que inclui as infecções cutâneas e nas mucosas. As infecções profundas e generalizadas são conhecidas como candidíase invasiva e costumam ser mais severas com o hospedeiro, dificultando ainda mais o tratamento. (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MAKANJUOLA; BONGOMIN; FAYEMIWO, 2018; SARDI et al., 2013; SOBEL, 2007)

Há dois mecanismos de transmissão da candidemia, endógeno (principal) e exógeno. A candidemia endógena se estabelece quando as espécies de *Candida* presentes na microbiota em qualquer sítio anatômico se aproveitam do hospedeiro débil para se tornar um patógeno oportunista. Já a candidemia exógena ocorre por um intermediário, na maioria das vezes por meio dos profissionais de saúde que estão em contato com os pacientes, além de, como já mencionado, via materiais hospitalares, cateteres contaminados e soluções intravenosas. (SARDI et al., 2013)

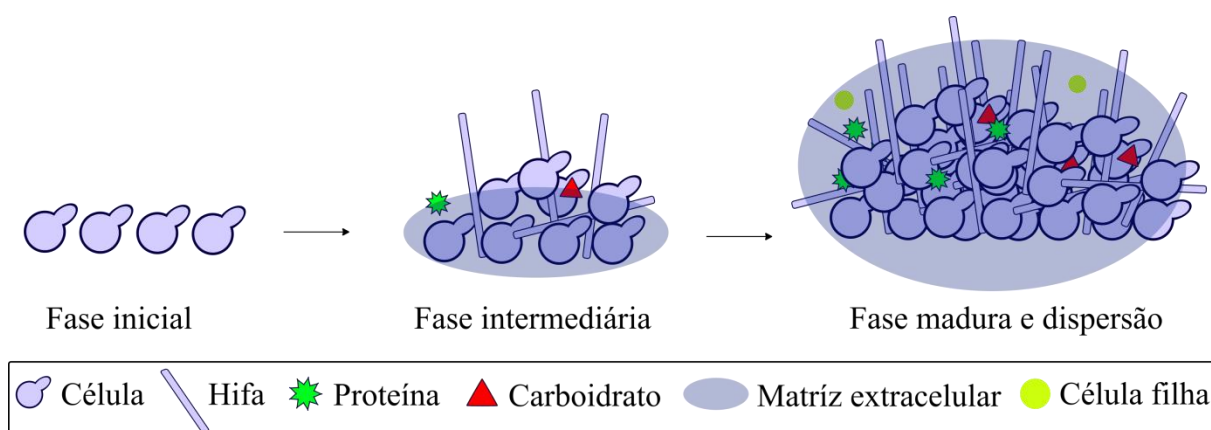
Por isso *Candida* spp. é considerada o principal patógeno, pois apresenta uma versatilidade e habilidade de sobreviver em diversos sítios anatômicos, a sua patogenicidade é maior devido a alguns fatores de virulência, um dos mais importantes é a facilidade da aderência ao tecido do hospedeiro e a equipamentos médicos, formação de biofilmes e secreção de enzimas (hidrolíticas proteases, fosfolipases e hemolisinas).

Essa aderência a superfícies do hospedeiro é o principal fator que permite a colonização dos fungos nos tecidos humanos, porém a ligação inicial entre as células das espécies de *Candida* e os tecidos é intermediada por fatores como hidrofobicidade e forças eletrostáticas entre os envolvidos, além de serem promovidos também por adesinas (complexos proteicos que reconhecem e se ligam a receptores também proteicos na superfície da célula do hospedeiro). (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; SARDI et al., 2013)

Outro desafio ao abordar as infecções fúngicas por *Candida*, é a formação de biofilmes, pois esse processo aumenta ainda mais a resistência a antifúngicos convencionais dificultando ainda mais o tratamento das infecções sistêmicas.

Os biofilmes formados por *C. albicans*, por exemplo (Figura 4), iniciam com a adesão de células de levedura em uma superfície do hospedeiro, em seguida forma-se uma pequena colônia. Na fase intermediária, as células fúngicas se arranjam e começam a produzir e secretar substâncias poliméricas extracelulares, que por sua vez dão origem a uma estrutura tridimensional que na sua forma madura nada mais é que o próprio biofilme. Uma vez que houve a formação do biofilme, há então, a possibilidade da sua propagação em diversos outros nichos dando origem à formação de mais biofilmes. (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018)

Figura 4: Esquema dos três estágios de formação de biofilme da *C. albicans*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020 e adaptado de CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018

2.3 Antifúngicos convencionais e mecanismos de resistência

Em meados da segunda guerra mundial, os poucos agentes farmacológicos presentes no tratamento das infecções fúngicas incluíam ácidos fracos, corantes fenólicos e o ácido undecilênico, a maior descoberta no tratamento daquela época. Até o início dos anos 60 a griseofulvina foi o antibiótico antifúngico oralmente eficaz utilizado. Posteriormente, o antifúngico sintético, tolnaftato e os antibióticos de polienos, foram os primeiros compostos utilizados no tratamento das infecções por *Candida* spp. (SMITH, 1990). Neste cenário acreditava-se que eles seriam diversificados e numerosos, porém, infelizmente hoje em dia existem apenas algumas poucas classes de compostos químicos (

Tabela 1) que se tornaram antifúngicos vigentes no tratamento das infecções comuns e sistêmicas pela *Candida* spp. (COWEN et al., 2015; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

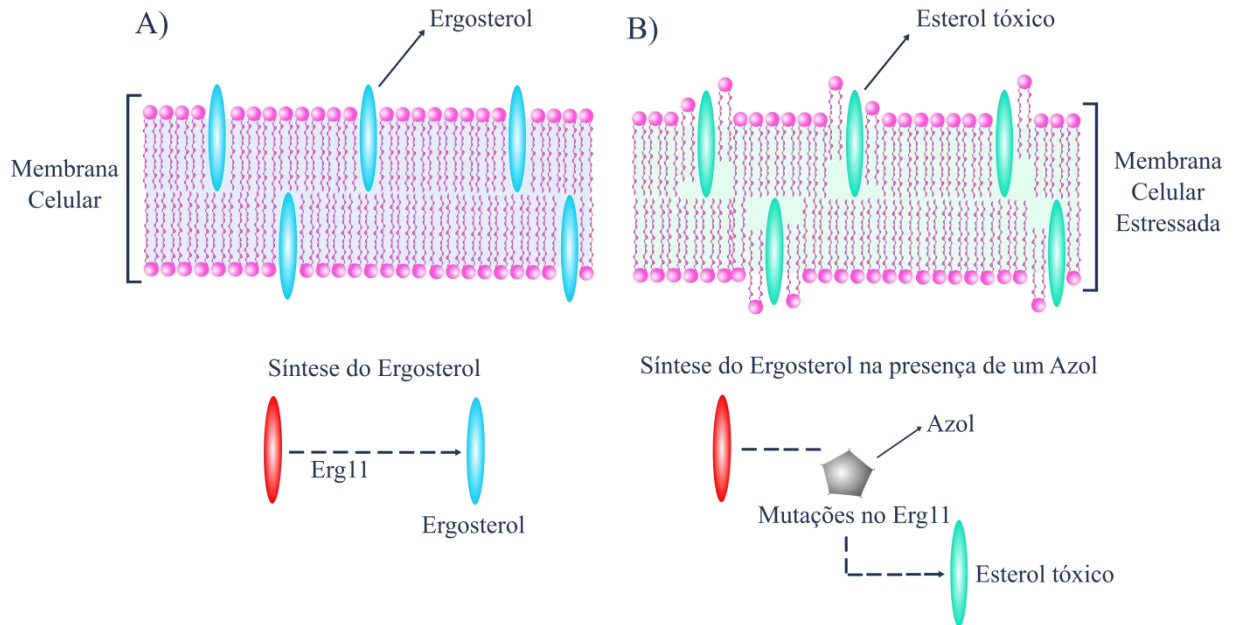
Tabela 1: Classes e mecanismos de ação dos principais antifúngicos convencionais.

Classes de antifúngicos	Ex. de medicamentos	Mecanismo de ação
<i>Polienos</i>	Anfotericina B, Natamicina e Nistatina.	Ligam-se ao ergosterol na membrana plasmática, formando grandes poros que por sua vez interrompem as funções celulares.
<i>Azóis</i>	Fluconazol, Voriconazol e Posaconazol.	Inibição da biossíntese de ergosterol (Figura 5).
<i>Alilaminas</i>	Amorolfina, Butenafina e Naftifina.	Inibição da biossíntese de ergosterol.
<i>Flucitosina</i>	5-fluorocitosina	Inibição do metabolismo da pirimidina e síntese de DNA.
<i>Equinocandinas</i>	Anidulafungina, Caspofungina e Micafungina.	Agentes ativos na parede celular que inibem a biossíntese de β -1,3-Dglucan, um importante componente estrutural da parede celular fúngica.

Fonte: COWEN et al., 2015

Na terapia antifúngica convencional, os compostos químicos são administrados de maneiras distintas dependendo do tipo de infecção podendo atingir o ergosterol (Figura 5). As infecções superficiais podem ser tratadas com antifúngicos de uso tópico de maneira eficiente, por outro lado, as infecções sistêmicas são tratadas com medicamentos administrados via oral ou intravenosa. (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013)

Figura 5: Exemplo de um mecanismo de ação de um antifúngico convencional (Mecanismo de ação dos Azóis). (A) Funcionamento pleno da síntese do ergosterol (componente essencial para o bom funcionamento da célula do fungo). (B) Síntese de um esterol tóxico pela intervenção dos compostos azólicos. O alvo específico dos azóis é a enzima Lanosterol 14 α -desmetilase (Erg11) da família do citocromo P450. O azol se liga ao Ferro (III) na região heme de interação, impedindo o substrato enzimático natural de lanosterol, modificando a via biossintética produzindo um esterol tóxico para a membrana celular do fungo.



Fonte: Adaptado de Cowen et al., 2015

Porém, o uso exacerbado dessas classes de antifúngicos, justamente por não haver uma grande variedade disponível, como mencionado anteriormente, contribuiu ao desenvolvimento da resistência das classes. (COWEN et al., 2015; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013)

A resistência fúngica está relacionada diretamente a falta de resposta positiva de um paciente frente ao tratamento terapêutico com drogas antifúngicas administradas em doses padrões. O desenvolvimento dessa resistência é altamente complexo e depende de diversos fatores relacionados diretamente ao hospedeiro e aos microrganismos. (COWEN et al., 2015)

Por mais que a farmacocinética de diversos antifúngicos já tenha sido estudada, não se sabe ao certo os mecanismos de penetração dos fármacos em todas as regiões infectadas, dessa forma, os fungos podem ser expostos a doses abaixo do necessário para eliminar a infecção. Esse cenário é capaz de produzir células persistentes durante a terapia, formando reservatórios de células que podem culminar em novas infecções.

Todos esses fatores contribuem para uma maior adaptação dos microrganismos, cujas cepas selecionadas se proliferam e geram falhas aos tratamentos dos antifúngicos convencionais.

As cepas exibem duas formas de resistência microbiana, a resistência primária que são aquelas cepas inerentemente menos suscetíveis aos agentes antifúngicos e a resistência secundária, cuja resistência é adquirida frente à exposição aos fármacos. (COWEN et al., 2015)

Os mecanismos moleculares envolvidos são complexos e exibem uma vasta gama de fatores e reações em vários níveis de cepas resistentes.

Um mecanismo comum de resistência das espécies de *Candida* frente aos compostos azólicos é a substituição do aminoácido alvo da droga, impedindo a sua interação. Mais de 140 substituições de aminoácidos já foram registradas em cepas resistentes, tendo efeitos adicionais em muitos dos casos. (COWEN et al., 2015)

A superexpressão da enzima Erg11 (alvo dos azóis) é um mecanismo de resistência presente na *C. albicans* que consiste no aumento exacerbado dessa enzima, o que requer ainda mais do antifúngico, reduzindo a suscetibilidade. Esse mecanismo vem sendo reportado também em cepas isoladas de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Há também outro mecanismo comum nas células fúngicas que consiste na ativação de bombas de efluxo (saída de uma determinada substância para o exterior de uma célula) na membrana celular, o que permite o reconhecimento de diversos compostos químicos nocivos à célula, promovendo a resistência a diversas drogas. (COWEN et al., 2015)

A habilidade de formação de biofilmes é uma das principais características de resistência microbiana, eles protegem os fungos de fatores externos, como defesa do sistema imunológico do hospedeiro e medicamentos antifúngicos. (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018)

Os biofilmes da *Candida* spp. são intrinsicamente resistentes aos azóis, porém seus mecanismos dependem de vários fatores que envolvem o efluxo dos compostos químicos e sequestro de drogas dentro da estrutura da matriz do biofilme, este sendo o maior determinante de multirresistência. (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; COWEN et al., 2015; TAFF et al., 2013)

Além dos mecanismos de resistência já citados, existem também regulação de elementos cis-ativos, elementos trans-ativos, anormalidades cromossômicas, defeitos mitocondriais, entre outros. (COWEN et al., 2015)

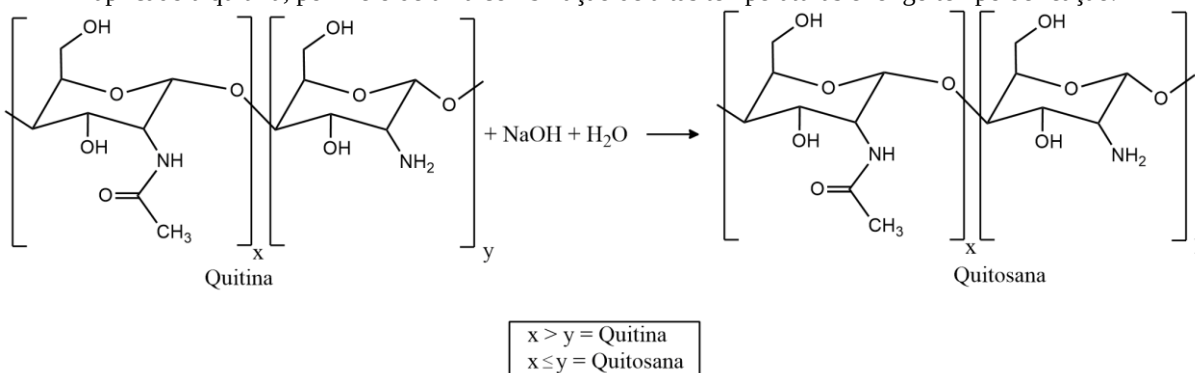
2.4 Quitosana

A quitosana é um copolímero catiônico de origem natural derivado da quitina, isolado pela primeira vez em 1811. É o segundo polissacarídeo mais profuso na natureza, constituinte da parede celular de fungos, carapaça de insetos e exoesqueleto de crustáceos.

Apresenta uma excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade mucoadesiva, propriedades antifúngicas, analgésicas e antitumorais, além de baixa citotoxicidade para humanos. (AMIDI et al., 2010; DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013; HUANG et al., 2005; JAYAKUMAR et al., 2012; YANEVA et al., 2020)

A quitina bem como a quitosana (Figura 6) são formadas por meio de unidades 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amina-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ em frações mutáveis, na qual a quitina é composta em sua maioria por grupos acetamida ao passo que na quitosana prevalecem os grupos amina (YANEVA et al., 2020)

Figura 6: Esquema de desacetilação de quitina com NaOH para a formação da quitosana (elaborado pelo autor, 2020). O grau de desacetilação relativo à quitosana pode ser controlado durante o processo da hidrólise alcalina aplicado à quitina, por meio de uma combinação de altas temperaturas e longo tempo de reação.

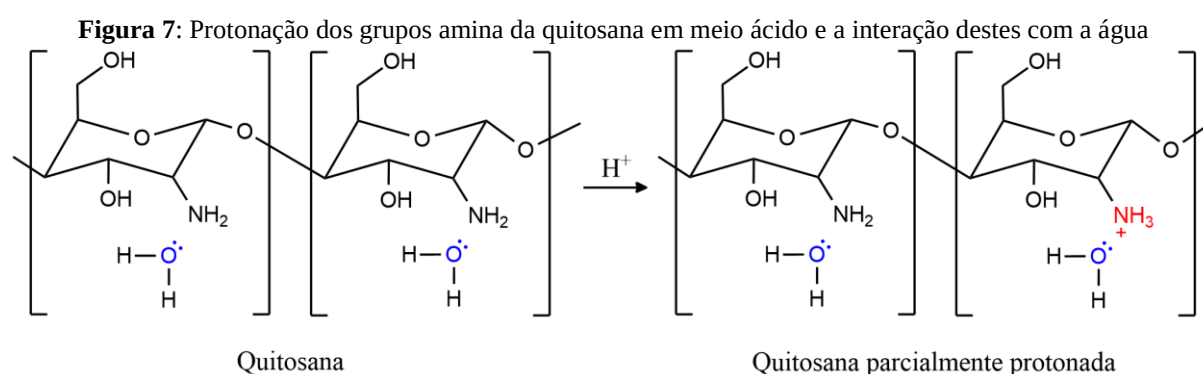


Fonte: Adaptado de YANEVA et al., 2020

Na literatura, os valores mais baixos encontrados para o grau de desacetilação (GD) da quitosana estão por volta de 40-60%, porém a maioria das quitosanas comerciais tem um GD de 70 a 90%. O processo de preparação de quitosana com um GD mais elevado ($\text{GD} > 95\%$) é comumente utilizado para aplicações biológicas específicas.

Por apresentar uma vasta abundância de grupos amina ($-\text{NH}_2$, carbono C2) e hidroxila ($-\text{OH}$, carbonos C3 e C6) em seus monômeros, este polímero proporciona a possibilidade de incorporação de outros compostos em sua cadeia polimérica. Baseado na presença desses grupos reativos (NH_2 e OH), nos últimos anos, tem-se estudado diversos derivados de quitosana que permitem melhorar suas características físico-químicas (tamanho, forma, carga, densidade, solubilidade) e consequentemente suas atividades biológicas (biocompatibilidade, atividade antifúngica e antibacteriana, antioxidante e a biodegradabilidade). (YANEVA et al., 2020)(JUNIOR, 2016)

Devido à presença desses grupos aminos primários, a quitosana pode ser carregada positivamente (Figura 7), a magnitude dessa densidade de carga, por outro lado, depende de fatores como pH, GD e a força iônica do meio. Em meios ácidos, os grupos -NH_2 ficam parcialmente protonados, o que gera repulsão entre as cadeias positivas do polímero, propiciando a interação intermolecular com moléculas de água (aumento da solubilidade), solvatação de macromoléculas, além do aumento da atividade antimicrobiana pela maior interação com a parede celular dos fungos. (YANEVA et al., 2020)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Resultados recentes de pesquisas nas áreas da biomedicina e farmácia sobre *drug delivery*, *gene delivery*, encapsulamento de células, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas, embalagem de alimento antibacterianos, entre outros, baseiam-se nos derivados de quitosana. Essas modificações realizadas são determinantes no desempenho do polímero, por isso, elas são extremamente específicas e dependem diretamente da aplicação desses derivados. (YANEVA et al., 2020)

Nesse contexto, a ação frente às espécies microbianas, como fungos e bactérias, se dá por características individuais e por fatores intrínsecos dos derivados de quitosana, como densidade de cargas positivas, balanço hidrofílico/hidrofóbico, capacidade de quelação, solubilidade em água e alguns fatores físico-químicos tais como a força iônica, pH, temperatura do meio e a massa molecular (KONG et al., 2010).

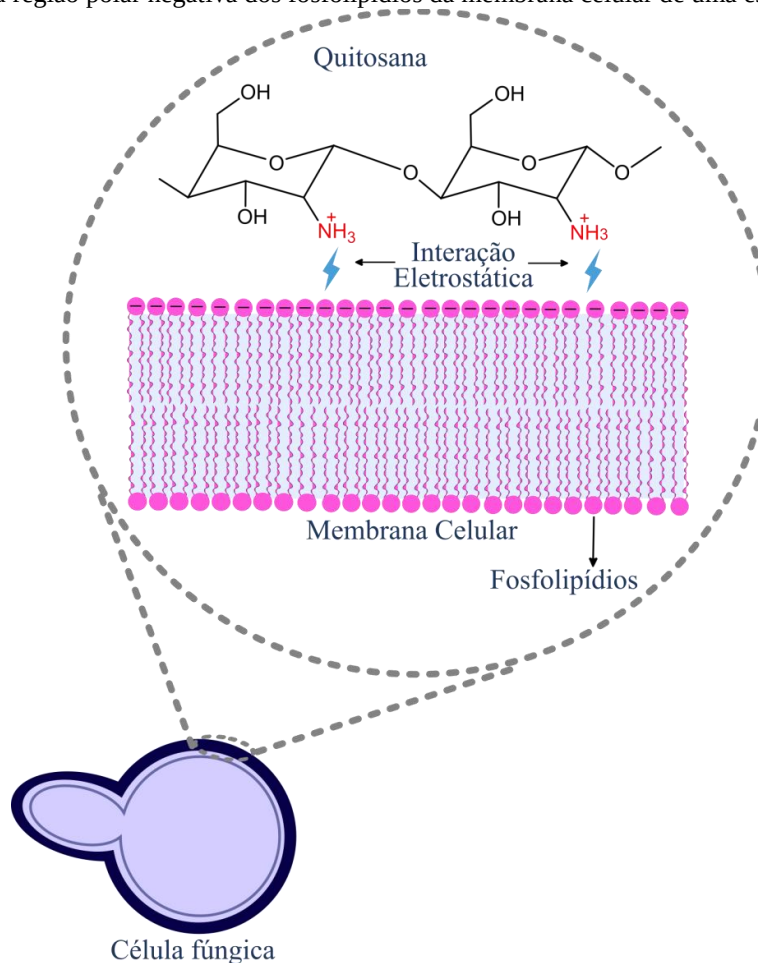
2.5 Efeitos antimicrobianos da quitosana e seus derivados

Encontra-se na literatura um vasto leque de exemplos dos efeitos antifúngicos da quitosana e seus derivados. A forma com que esses polímeros atuam depende de diversos fatores, dentre eles se destaca o tipo do microrganismo. (GANAN et al., 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017)

A atividade antifúngica da quitosana pode ser compreendida por diversos mecanismos. Estudos demonstram que as cargas positivas na cadeia polimérica afetam a membrana celular do fungo por meio de interações eletrostáticas com as cargas negativas dos fosfolipídios presentes na membrana. A massa molecular (Mw) do polissacarídeo também interfere em sua atividade antimicrobiana, dependendo do seu valor, a quitosana pode se inserir na célula após ter ocasionado a perturbação na membrana. Uma vez na dentro da célula, ela pode interferir na síntese de DNA e/ou RNA e proteínas. (MATICA; OSTAFE, 2017)

A composição da parede celular dos fungos desempenha um papel importante nas características antifúngicas da quitosana e quando de fato ocorre a interação quitosana-membrana ela interfere no crescimento do fungo. Resultados obtidos de microscopia apontam que oligoquitosanas (quitosana com tamanho de 2 a 10 monômeros) podem se difundir dentro das hifas, interagindo com as enzimas responsáveis pelo crescimento dos fungos. A deterioração das células fúngicas depende também da concentração dos derivados de quitosana (quanto maior a concentração, a atividade antifúngica também aumenta), GD e do pH (quanto maior o pH, menor é a eficácia dos polímeros). (JUNIOR, 2016; MATICA; OSTAFE, 2017). Estudos mostraram que o aumento do grau de desacetilação (GD), combinado com a diminuição da massa molecular contribui para uma melhor atividade antifúngica. Esse efeito foi observado com várias espécies de fungos como: *C. albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus parasiticus*, *A. fumigatus* e *A. flavus*. Os estudos indicam que o mecanismo de ação da quitosana (Figura 8) está diretamente relacionado com a interação eletrostática das cargas positivas do polímero com as cargas negativas dos fosfolipídios da membrana celular, pois, o aumento de GD, está intrinsecamente relacionado com o aumento dos grupos -NH₂ livres na cadeia polimérica, o que permite uma maior interação com a região polar dos fosfolipídios. (GANAN et al., 2019; JUNIOR, 2016; MATICA; OSTAFE, 2017; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017)

Figura 8: Possível mecanismo da ação antifúngica da quitosana. Interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ da quitosana com a região polar negativa dos fosfolipídios da membrana celular de uma espécie de *Candida*



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

A quitosana também apresenta a possibilidade de formar filmes, essa propriedade pode atuar como uma barreira, até o colapso do crescimento do patógeno. Além disso, a quitosana pode agir como um composto quelante, o que proporciona uma interação seletiva com traços de metais presentes no meio inibindo a produção de toxinas e o crescimento microbiano. (GARCIA et al., 2018; JUNIOR, 2016; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017)

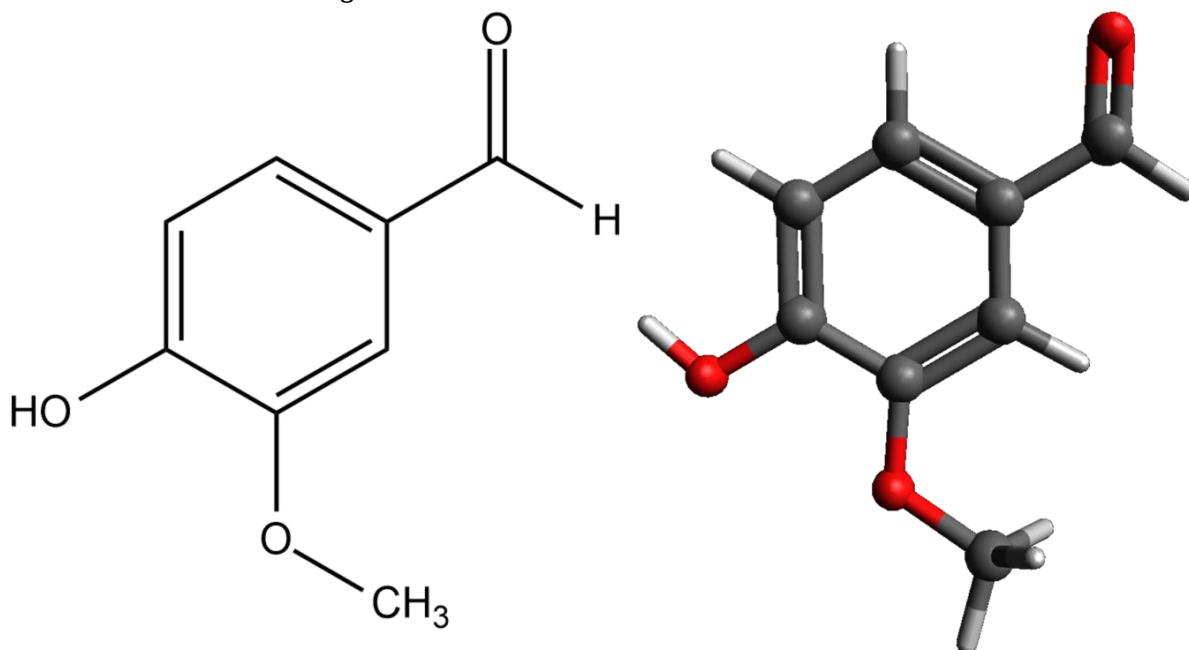
2.6 A Vanilina e a sua possível aplicação como agente antifúngico

2.6.1 Vanilina

A vanilina ou 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (Figura 9) é um aldeído fenólico e seu uso como flavorizante para alimentos e fragrâncias é datado de centenas de anos, é um dos principais flavorizantes do mundo e o componente majoritário presente na baunilha, por isso é conhecido popularmente como aroma da baunilha. Embora seu uso já tenha sido amplamente explorado no ramo alimentício e de aromatizantes, as investigações para avaliar outras possíveis aplicações da vanilina, como um possível composto bioativo, por exemplo, ainda é

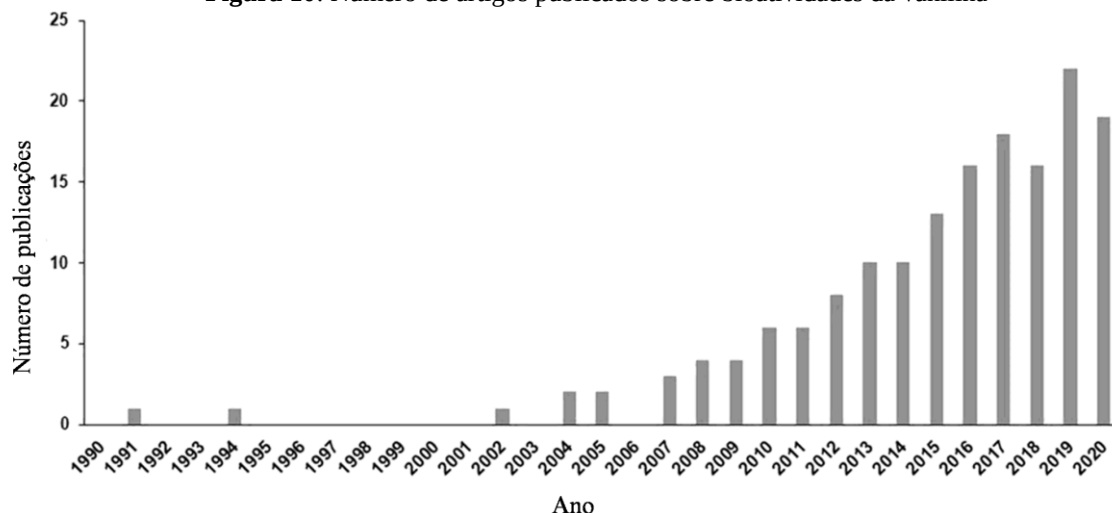
limitado. Entretanto, mais recentemente (Figura 10), alguns estudos buscam avaliar e explorar as atividades biológicas que poderiam ser aplicadas para múltiplos fins terapêuticos, inclusive na ação inibitória de microrganismos indesejáveis (ARYA et al., 2021; CHENIA, 2015; GARCÍA-RÍOS et al., 2018; NGARMSAK et al., 2016; ORHAN-YANIKAN et al., 2019; PACHECO; DAMASIO, 2010; YADAV; SAINI; YADAV, 2018) .

Figura 9: Estruturas moleculares 2D e 3D da Vanilina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Dentre as potenciais bioatividades da vanilina, destacam-se a neuroproteção (mecanismos e estratégias usados para proteger os neurônios contra danos decorrentes de enfermidades que afetam o Sistema Nervoso Central), anticarcinogênica, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. (ARYA et al., 2021)

Figura 10: Número de artigos publicados sobre bioatividades da vanilina

Fonte: Adaptado de ARYA et al., 2021

Tipicamente existem três formas de se obter a vanilina, assim como a quitosana, pode ser extraída de forma natural, nesse caso por meio da vagem da orquídea *Vanilla planifolia*, outra fonte de obtenção é por meio da biotecnologia, porém, a mais comum é a química/sintética por meio de síntese em escala industrial (ARYA et al., 2021; PACHECO; DAMASIO, 2010; PACHECO; MORGADO; JUNIOR, 2013).

Analisando a estrutura da vanilina, podem-se observar três diferentes grupos presentes no anel aromático, no C1 encontra-se o aldeído, no carbono C3 o éter e logo após, em C4 tem-se a hidroxila. Esses grupos conferem características importantes para sua utilização como um composto bioativo, como apontam os estudos recentes. O projeto visa a atuação conjunta da vanilina com a quitosana no desenvolvimento de novos materiais com potencial atividade antifúngica e antioxidante.

2.6.2 Efeitos antimicrobianos da vanilina

Patógenos fúngicos são bem conhecidos por afetar os alimentos, a saúde humana e também a agricultura. Além das qualidades flavorizantes da vanilina, tem-se estudado hoje a característica antimicrobiana e a utilização dela como conservante alimentar natural. Muitos produtos químicos naturais, incluindo os compostos fenólicos derivados das plantas, exibem propriedades com um grande potencial antifúngico, aplicado na indústria alimentícia. (YADAV; SAINI; YADAV, 2018)

A utilização desses compostos no desenvolvimento de novos antifúngicos mostra-se promissor no combate aos mecanismos de resistência dos fármacos convencionais. (KARUPPAYIL, 2012)

Em um estudo realizado por Romero-Cortes e colaboradores, verificou-se que a vanilina na concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ conseguiu impedir o crescimento de cepas do fungo *Alternaria alternata*, o que sugere um comportamento fungistático da vanilina. Ela foi capaz de aumentar o período de latência do ciclo de vida do fungo de 50 horas iniciais para 112 horas, além de ser observado também que a vanilina inibiu o crescimento micelial em até 37,5% (ROMERO-CORTES et al., 2019).

Em estudos realizados por Saibabu e colaboradores, buscou-se explorar a atividade antifúngica e os mecanismos de ação da vanilina frente a cepas resistentes de *C. albicans*.

O mecanismo mais comum de resistência da *C. albicans*, é a bomba de efluxo. Os responsáveis pela ação são as proteínas *Candida* CaCdr1p, CaCdr2p e CaMdr1p que se encontram dentro dos Transportadores ABC (uma superfamília de sistemas de transporte). Ensaios com Rodamina 6G (um corante altamente fluorescente da família da rodamina, é frequentemente usado como um corante traçante em água para determinar a taxa e direção de fluxo e correntes) foram efetuados para analisar o efeito da vanilina na inibição da bomba de efluxo das proteínas.

Observou-se que a vanilina impediu em até 42% o efluxo da Rodamina 6G. Além desse ensaio, outros dois foram realizados a fim de comprovar a eficácia deste composto. (SAIBABU et al., 2020)

Em outro estudo realizado, a atividade antifúngica efetiva da vanilina foi testada frente a *C. albicans* a partir do ensaio da concentração inibitória mínima (CIM). O teste mostrou que o crescimento do fungo foi prejudicado na presença da vanilina, e que essa alteração no desenvolvimento era dependente direto da sua concentração (CIM de 8mM). Além do CIM, o efeito fungicida também foi observado, porém numa concentração maior, a partir de 16mM.

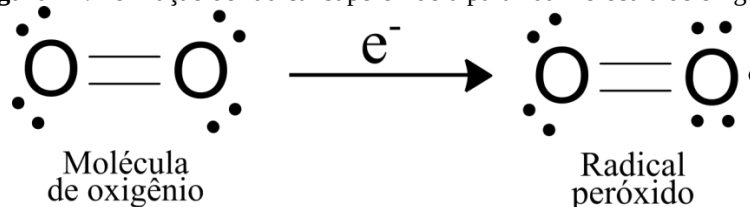
Nesse estudo realizado foi possível aferir a alteração na adesão do fungo em altas concentrações (8-16mM) reduzindo 30% da aderência das cepas às superfícies. (KARUPPAYIL, 2012)

Além dos testes frente a cepas de fungos, a vanilina também foi explorada como um potencial agente antibacteriano. Nesse caso ela foi capaz de afetar o crescimento de bactérias deteriorantes como *Pantoea agglomerans*, *Aeromonas enteropelogenes*, *Micrococcus lylae* e *Sphingobacterium spiritovorun* avaliando o teste da concentração inibitória mínima (MIC) com uma variação na concentração de 10 a 13,3 mM (ARYA et al., 2021).

2.7 Radicais livres

Os radicais livres ganharam relevância na área da saúde devido a sua interação em mecanismos fisiológicos e a relação com o desenvolvimento de diversas doenças. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são as duas grandes classes dos radicais livres e ambas tem origem tanto em fontes endógenas quanto exógenas (**Tabela 2**). Diversas classes de moléculas biológicas importantes no corpo humano podem ser afetadas por esses compostos, tais como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, alterando as reações de oxirredução naturais do sistema, resultando num estresse oxidativo no organismo (ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015)

Figura 11: Formação do radical superóxido a partir da molécula de oxigênio.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

A primeira vez que se especulou a existência de um radical livre orgânico no corpo humano, foi em 1900 pelo professor de química da universidade de Michigan, Moses Gomberg cuja molécula analisada era o radical trifenilmetil ($\text{Ph}_3\text{C}^\bullet$). Desde então, diversos estudos foram realizados e documentados sobre o papel dos radicais livres nas mais variadas condições fisiopatológicas. (ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015)

Tabela 2: Exemplos de fontes endógenas e exógenas de radicais livres

Fontes endógenas	Fontes exógenas
Mitocôndria	Poluição do ar e da água
Peroxisomos	Bebida alcoólica
Retículo endoplasmático	Fumaça do cigarro
	Pesticidas
	Solventes industriais

Elaborado pelo autor, 2020

Os radicais livres pertencem a uma classe comum de compostos presentes no metabolismo celular. Eles podem ser definidos como um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (Figura 11), os radicais livres existem de forma independente, porém, a existência de elétrons desemparelhados dessas

espécies as torna extremamente instáveis, com um curto período de existência e uma alta reatividade. (ABHERI DAS SARMA, 2010; ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015)

Para que ela possa se estabilizar novamente ocorre à abstração de um elétron de outra espécie, essa que por sua vez se torna um radical livre em si, iniciando uma reação em cadeia de formações de variadas espécies de radicais livres, o que fatalmente culmina em danos nas células saudáveis do organismo. (ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015)

Entretanto, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) (**Tabela 3**) podem ser benéficas e estão envolvidas em diversas funções fisiológicas, porém, em altas concentrações elas geram o estresse oxidativo e nitrosativo. Esses estresses são causados quando além das altas concentrações das espécies reativas, há também um déficit de antioxidantes naturais presentes no organismo. A consequência das alterações geradas pelo estresse oxidativo e nitrosativo no corpo humano é o desenvolvimento de doenças, tais como: artrite reumatoide, diabetes, doenças neurodegenerativa, catarata, câncer, doenças cardiovasculares e respiratórias além do auxiliar no processo de envelhecimento. (ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015; LIEN AI PHAM-HUY, HUA HE, 2008)

Tabela 3: Lista de algumas ERO e ERN produzidas durante o metabolismo

Radical Livre	Símbolo químico	Meia vida
<i>Espécies reativas de oxigênio</i>		
<u>Radicais</u>		
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6} s
Hidroxila	$OH^{\bullet}$	10^{-10} s
Radical Alcoxila	$RO^{\bullet}$	10^{-6} s
<u>Não radicais</u>		
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Estável
Oxigênio singleto	1O_2	10^{-6} s
Ozônio	O_3	Minutos
<i>Espécies reativas de nitrogênio</i>		
<u>Radicais</u>		
Óxido nítrico	$NO^{\bullet}$	Minutos*
Dióxido de nitrogênio	$NO_2^{\bullet}$	s
<u>Não radicais</u>		
Peroxinitrito	$ONOO^-$	10^{-3} s
Ácido nítrico	HNO_2	Segundos
Cloreto de Nitrila	NO_2Cl	Segundos

* A meia vida de alguns compostos depende do meio que ele se encontra, no caso do $NO^{\bullet}$, em uma solução saturada de ar, pode levar minutos.

Fonte: Modificado de ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015

Dentre as doenças citadas, ressalta-se o câncer, uma das maiores causas de morte em humanos nos dias atuais. Os radicais livres causam diferentes mudanças no DNA, tais como Hiper e hipo-metilação de DNA, rearranjos cromossômicos, modificações de base, quebra de fita e deleções, tornando-os mutagênicos. As células cancerígenas detêm uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio quando comparado às células saudáveis, essa maior concentração por sua vez acarreta em disfunções mitocondriais devido a maior taxa metabólica (ABHERI DAS SARMA, 2010; ALUGOJU PHANIENDRA; PERIYASAMY, 2015; LIEN AI PHAM-HUY, HUA HE, 2008)

O nível de estresse oxidativo dessas células é extremamente alto por ativar os oncogenes (genes relacionados com o aparecimento e crescimento de tumores, malignos ou benignos) e a perda de supressores de tumor (genes normais que retardam a divisão celular, reparam erros do DNA ou indicam quando as células devem morrer).

2.8 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias cuja sua função principal é a neutralização dos radicais livres ou de seus mecanismos de ação. O corpo humano é capaz de se proteger dos radicais livres com antioxidantes naturais presentes nas células, tais como as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, sistemas tamponantes, entre outros. (ADWAS et al., 2019; DEVASAGAYAM et al., 2004)

As vitaminas “E” e “C” (tocoferol e ácido ascórbico, respectivamente) são moléculas naturais exógenas que estão presentes em alimentos e atuam também como espécies antioxidantes e que protegem o organismo dos radicais livres por meio de mecanismos específicos. A vitamina “E”, por exemplo, atua como um antioxidante que inibe as reações em cadeia de formação de radicais livres na membrana celular do corpo humano.

Existe, de um modo geral, três níveis diferentes de ação no combate aos radicais livres, a prevenção, a interceptação e reparação (**Tabela 4**). (ADWAS et al., 2019; DEVASAGAYAM et al., 2004)

Tabela 4: Modos de ação dos antioxidantes e seus mecanismos

Níveis de ação	Exemplo de antioxidante	Mecanismos
Prevenção	Superóxido dismutase	Impedimento da formação de ERO
Interceptação	Vitamina E	Remoção dos radicais
Reparação	Glutathione peroxidase	Reconstituição de membranas afetadas

Fonte: ADWAS et al., 2019; DEVASAGAYAM et al., 2004

Diversos estudos na literatura apontam para uma relação inversa entre a concentração de antioxidantes presentes no corpo humano e a ocorrência de alguns tipos de doenças já citadas no item 2.7. Estudos de caso e epidemiológicos demonstram que uma dieta que engloba alimentos ricos em antioxidantes como vitamina E, C além de compostos naturais presente em plantas (carotenoides, curcumina, flavonoides, a própria vanilina, entre outros), trabalham concomitantemente com os antioxidantes endógenos no combate dos radicais livres. (DEVASAGAYAM et al., 2004; HOSSEINI; SAEDISOMEOLIA; ALLMAN-FARINELLI, 2017; MOREIRA; BOAS; FERREIRA, 2014; YOUNG; WOODSIDE, 2001)

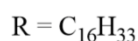
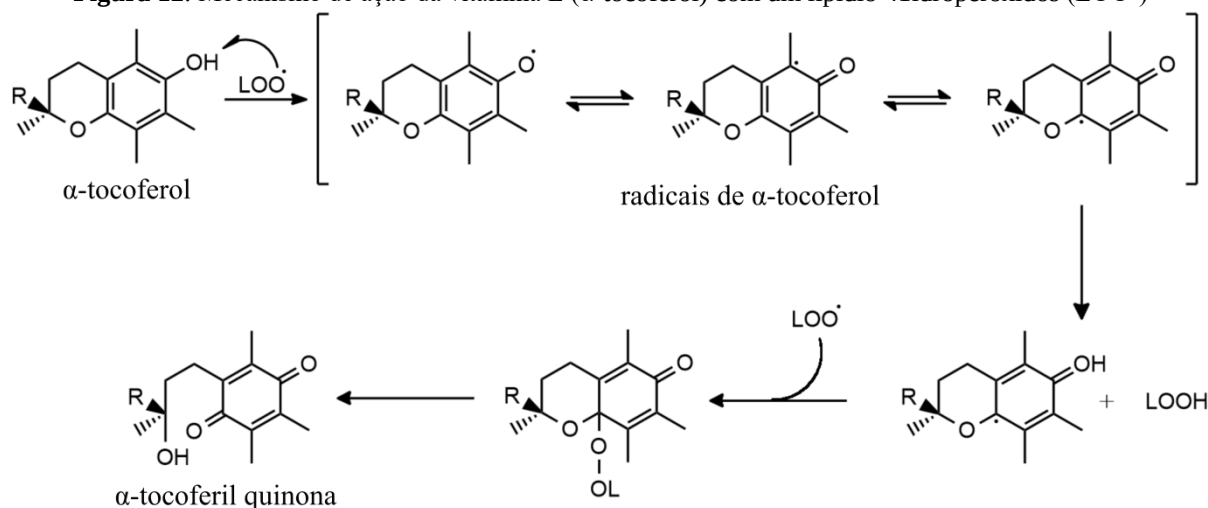
2.8.1 Mecanismos de ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

As enzimas antioxidantes que se encontram nas células do corpo humano estão separadas em três principais classes, são elas a enzima catalase, superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (enzimas cruciais para a homeostase dentro das células). (ADWAS et al., 2019)

No caso da enzima superóxido dismutase mencionada na **Tabela 4**, seu mecanismo de ação está relacionado com o impedimento da formação dos radicais livres convertendo-os em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e O_2 por meio de uma catálise do ânion superóxido. A molécula de oxigênio é removida por meio da catálise de uma reação de dismutação também por essa enzima, na ausência dela, essa eliminação se torna muito lenta. (ADWAS et al., 2019)

Outro exemplo já conhecido na literatura é a atividade catalítica das enzimas glutathione-S-transferase e da glutathione peroxidase na redução dos hidroperóxidos orgânicos em seus respectivos álcoois. (ADWAS et al., 2019)

Na perspectiva dos antioxidantes não enzimáticos, o tocoferol (Vitamina E) atua como um protetor da oxidação da membrana celular removendo os radicais intermediários e reagindo com os radicais lipídicos (Figura 12). (ADWAS et al., 2019)

Figura 12: Mecanismo de ação da vitamina E (α -tocoferol) com um lipídio 4hidroperóxidos ($\text{LOO}^\bullet$)

Fonte: Adaptado de YAMAUCHI, 1997

2.9 Vanilina e Derivados de quitosana como antioxidantes

2.9.1 Derivados de quitosana

Nas últimas décadas alguns estudos foram realizados com o intuito de analisar a atividade antioxidante de uma série de derivados de quitosana. Os mecanismos de ação dependem dos compostos enxertados e do tipo do radical livre, além disso, a atividade antioxidante tende a melhorar com a variação da Mw, ou seja, com o tamanho das cadeias poliméricas dos derivados, do grau de desacetilação e também do grupo enxertado no polissacarídeo. (FENG et al., 2008; LI et al., 2018; SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002; SUN et al., 2008)

Na realização de um estudo com oligossacarídeos de N-carboximetil quitosana, sugeriu-se que o mecanismo de ação está baseado na reação dos ânions superóxidos com os átomos de hidrogênio reativos da quitosana, dando origem a um substrato de uma macromolécula radical mais estável.

Nessa mesma pesquisa foi relatado que a atividade antioxidante dos oligossacarídeos comparada com a quitosana comum são superiores devido a menor interação das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares dos polímeros. (SUN et al., 2008)

Nesse mesmo contexto, Feng e colaboradores (2008) avaliaram a melhora da atividade antioxidante da quitosana utilizando irradiação como uma forma alternativa de diminuir a Mw do polímero. Além da melhora prevista nos resultados, o estudo propôs que a atividade de eliminação dos radicais de hidroxila podem ser atribuídos a habilidade quelante

da quitosana ao cátion metálico Fe^{2+} devido a presença dos grupos amino que podem formar complexos de quitosana- Fe^{2+} por meio do par de elétrons livre presente nesse grupo. (FENG et al., 2008)

2.9.2 Vanilina

A vanilina por ser um flavorizante amplamente utilizado na indústria de alimentos está presente comumente na dieta da população. Além dos efeitos já explorados na área da saúde (antimutagênico, antimicrobiano, conservante natural, etc.) esse composto fenólico também foi alvo de estudos com sua potencial aplicação como antioxidante. (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002; TAI et al., 2011)

Este aldeído fenólico tem sido relatado como um potencial eliminador de ERO frente a radicais livres como ABTS e previne a hemólise oxidativa (hemólise é a alteração, dissolução ou destruição dos glóbulos vermelhos do sangue) operando por meio da auto-dimerização (ARYA et al., 2021).

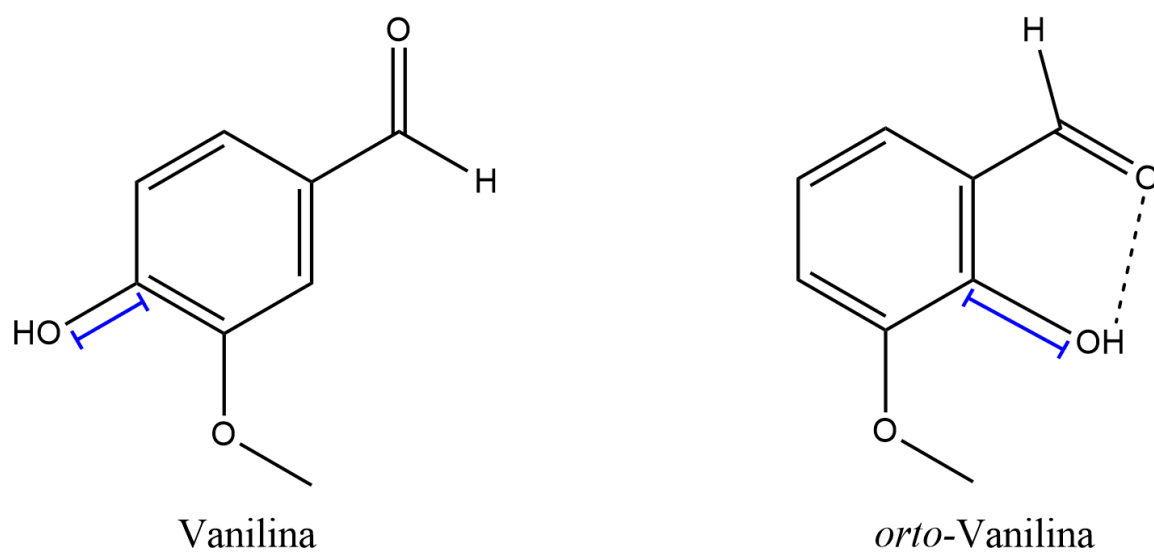
No início dessa década, uma pesquisa avaliou sistematicamente a atividade antioxidante da vanilina usando diversos ensaios com diferentes radicais livres. Em um dos ensaios indicou uma maior atividade em relação ao ácido ascórbico e ao Trolox (antioxidantes de referência) frente ao radical ABTS^{++} , porém ao ser testada com outros radicais como o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), nenhum efeito foi constatado.

No trabalho de Tai e colaboradores, foi proposta a interação da vanilina com os radicais por meio de um mecanismo de autodimerização, esse que contribui para uma alta estequiometria de reação com o radical ABTS^{++} potencializando o seu efeito. (TAI et al., 2011)

Santosh et al (2002) comparou a atividade antioxidante da vanilina e da *orto*-vanilina. A *orto*-vanilina mostrou melhor atividade, porém ambas foram capazes de eliminar os radicais livres com eficiência em concentrações milimolares.

No estudo de Santosh e colaboradores o fator principal da atividade dos compostos fenólicos estava relacionado com o potencial de redução ou da energia necessária para a conversão das espécies estudadas nas suas formas oxidadas, pois, ambas apresentam um grupo fenólico na sua estrutura como demonstrado na Figura 13. A melhor atividade atrelada a espécie *orto* está vinculada com ligações de hidrogênio intramoleculares (**n**) nessa espécie, o que resulta numa ligação mais alongada do grupo $-\text{OH}$, facilitando seu rompimento e diminuindo seu potencial de redução. (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002)

Figura 13: Comparação da vanilina e orto-vanilina com a interação intramolecular do aldeído com o grupo hidroxila dessa espécie.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo geral a síntese, caracterização e estudo da atividade antifúngica de diferentes derivados anfifílicos de quitosana modificados com vanilina contra a *Candida* spp., buscando-se identificar as melhores composições e os parâmetros estruturais que afetam a atividade fungicida destes.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Sintetizar e caracterizar uma série de derivados de quitosana de baixa massa molecular modificados com diferentes conteúdos de vanilina.

3.2.2 Estudar a atividade antifúngica para derivados com diferentes conteúdos de vanilina com quitosanas de baixa e alta massa molecular contra *Candida* spp. *in vitro*.

3.2.3 Avaliar a toxicidade dos polímeros, e correlacionar as atividades e toxicidades aos parâmetros estruturais..

3.2.5 Estudar a atividade antioxidante desses derivados correlacionando-a com os parâmetros estruturais.

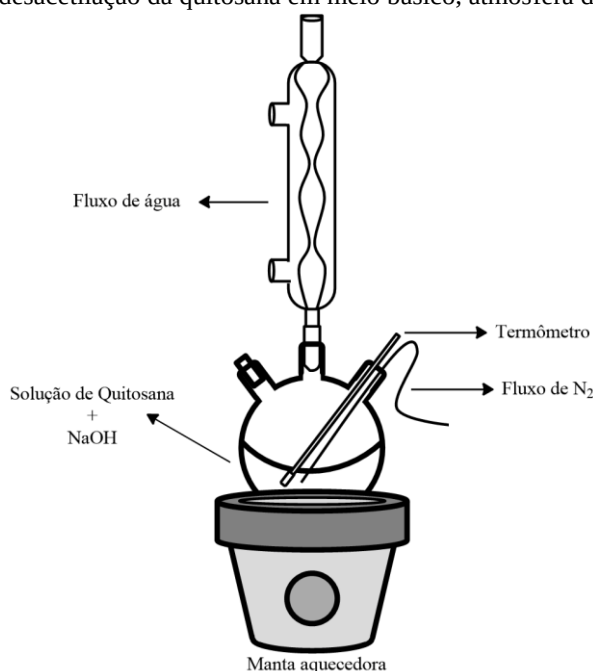
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese dos derivados anfifílicos

4.1.1 Desacetilação da quitosana comercial

As modificações estruturais foram realizadas nos grupos amino da quitosana, portanto, para garantir maior disponibilidade de grupos reativos livres, a primeira etapa das sínteses foi a desacetilação da quitosana comercial (Figura 14). Este procedimento foi realizado utilizando-se metodologias previamente descritas na literatura (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013; DE OLIVEIRA TIERA; WINNIK; TIERA, 2010).

Figura 14: Esquema de desacetilação da quitosana em meio básico, atmosfera de N_2 e altas temperaturas.



Fonte: Elaborado pelo autor. 2021

4.1.2 Degradação polimérica

A segunda etapa refere-se a degradação da quitosana por oxidação em meio ácido utilizando-se nitrito de sódio, tendo como objetivo comparar as atividades antifúngicas e antioxidantes dos polímeros de baixa e alta massa molecular. (HUANG; KHOR; LIM, 2004). Uma massa de 10 g de quitosana de partida foi solubilizada em 720 mL de uma solução de ácido acético 2% v/v. Após 24 horas, a quitosana completamente solúvel foi mantida sob agitação constante em atmosfera de nitrogênio por 1 hora em baixas temperaturas (9 °C). Em seguida, 30 mL de uma solução de 382,0 mg de nitrito de sódio foram adicionados ao meio. A

solução foi mantida sob agitação constante a baixas temperaturas por 24 horas (HUANG; KHOR; LIM, 2004).

A quitosana degradada foi separada do meio reacional por centrifugação à 3.500 RPM por 10 minutos, após precipitação com solução concentrada de hidróxido de sódio. Posteriormente o precipitado foi purificado por diálise em membrana semipermeável (3 kDa) por 4 dias. Em seguida o produto foi congelado e liofilizado com o liofilizador L101 marca Liotop (HUANG; KHOR; LIM, 2004).

4.1.3 Síntese dos derivados de quitosana enxertados com vanilina

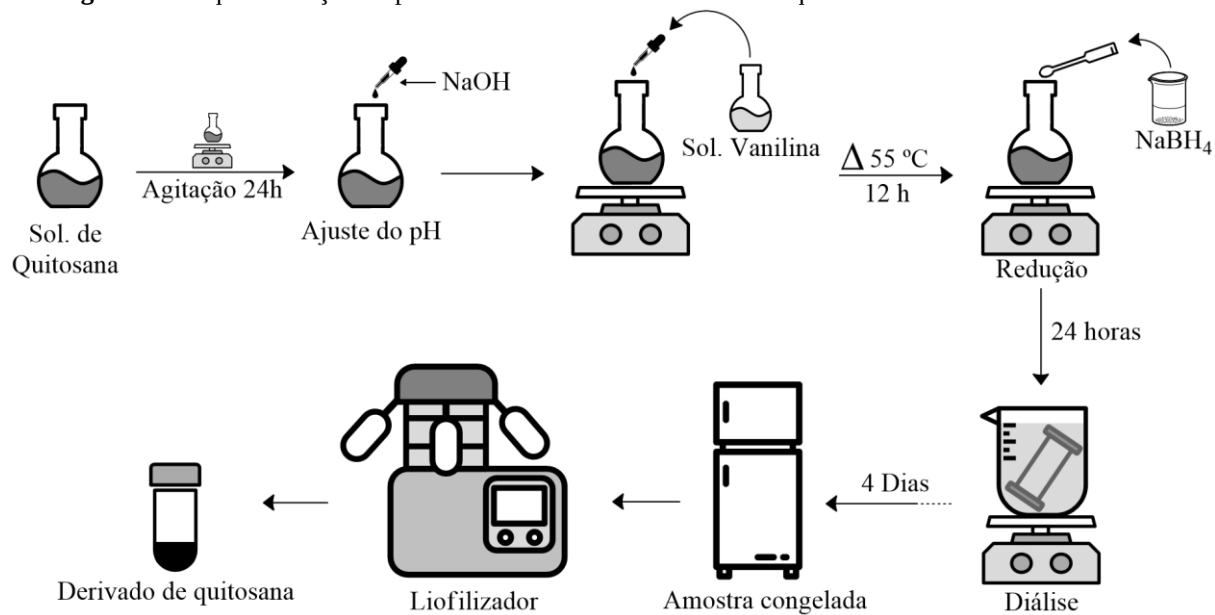
A vanilina foi enxertada na quitosana por meio dos procedimentos descritos a seguir e que estão resumidos na Figura 15. 1g de quitosana foi solubilizada sob agitação constante por 24 horas em 50 mL de uma solução de HAc 2% v/v. Após a completa solubilização o pH da solução de quitosana foi ajustado para pH 5,1 ou 6 (dependendo do grau de substituição (GS) desejado). A mudança no pH teve como objetivo variar o grau de ionização, controlando assim a porcentagem de grupos amino livres no polímero. Portanto, o controle do pH limitou a reação de substituição, uma vez que em pH 5,1 até 20% dos grupos aminos permanecem não protonados enquanto que em pH 6 até 50% (valores esses de substituição considerados adequados para as etapas futuras de aplicação e comparação de resultados).

Em seguida solubilizou-se 943 mg de vanilina em 10 mL de etanol anidro obtendo-se uma razão 1:1 (mol: mol, vanilina:quitosana). A solução de vanilina foi vertida gota a gota, e após a completa adição a solução foi aquecida até 55 °C e mantida sob agitação por 12 horas.

Posteriormente 623 mg de boroidreto de sódio (NaBH_4), quantidade 3 vezes maior que o número de mols de unidades glicosídicas (3:1), foi adicionada em porções à mistura reacional. Após a adição de NaBH_4 a solução foi mantida sob constante agitação à temperatura ambiente por 24 horas.

Os derivados sintetizados foram purificados por diálise em membrana semipermeável por quatro dias e o produto obtido foi congelado e liofilizado com o liofilizador L101 marca Liotop para posteriores aplicações.

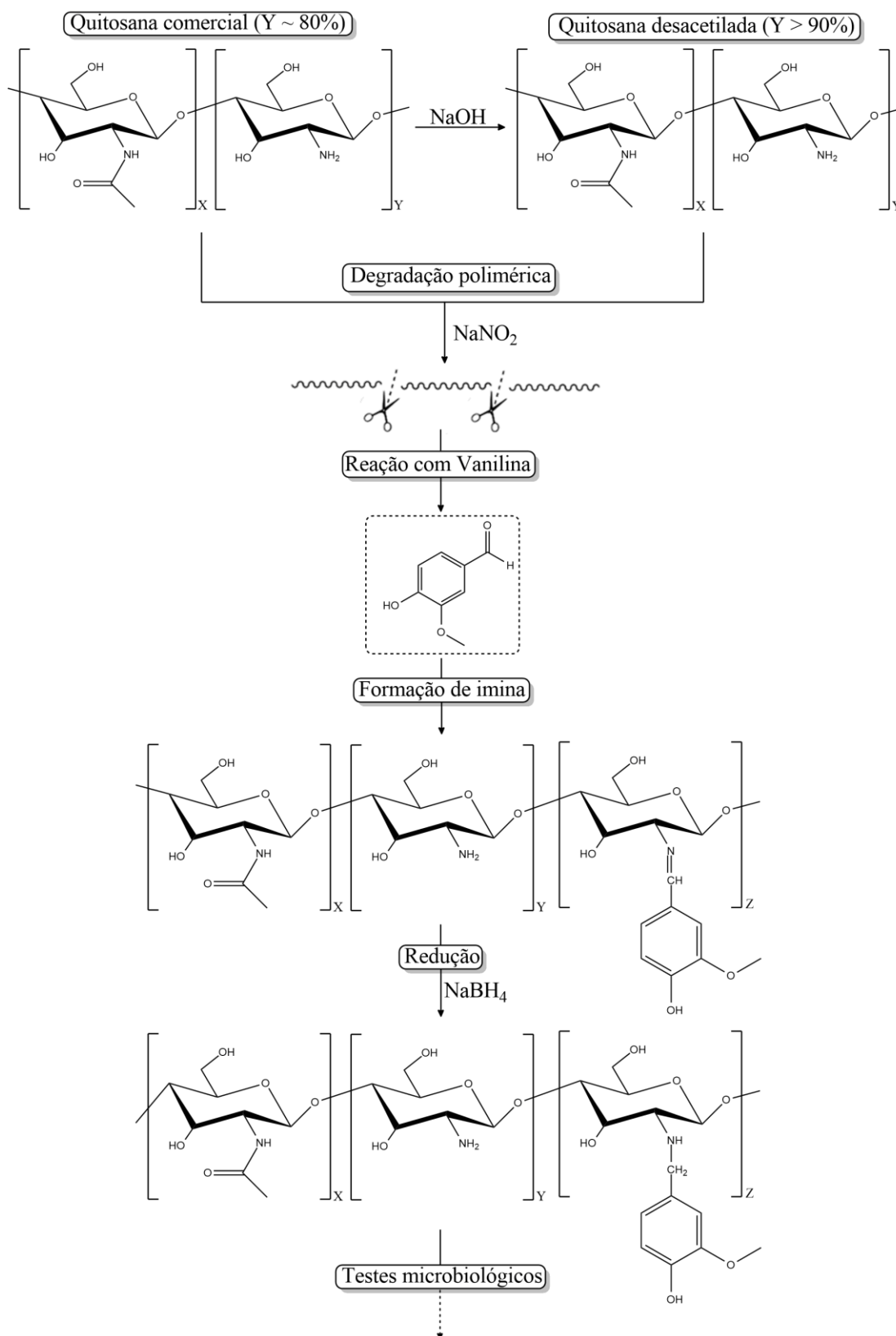
Figura 15: Esquematização do processo de síntese dos derivados de quitosana enxertados com vanilina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

As etapas da preparação dos derivados são ilustradas no fluxograma da Figura 16.

Figura 16: Esquema da síntese dos derivados anfífilos de quitosana enxertados com vanilina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

4.2 Caracterização dos polímeros

4.2.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana.

O grau de desacetilação da quitosana, foi determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- H^1) na Central de Análises Químicas Instrumentais - IQSC – USP, utilizando-se a equação 1.

As soluções foram preparadas pela solubilização de 5mg de quitosana em 700 μ L de D_2O (água deuterada) e 20 μ L de DCl (cloreto de deutério), as quais foram mantidas sob agitação por 24h, após esse período a solução foi transferida para um tubo de RMN- H^1 .

$$\%NAG = \frac{\frac{I_{HNAG}}{3}}{\frac{I_H}{1}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$

Equação 1: Cálculo da porcentagem de grupos N-Acetilglicosamina presentes no polímero, onde I_{HNAG} refere-se a integral do pico dos grupos N-acetilglicosamina e I_H a integral dos picos dos carbonos anoméricos da quitosana.

4.2.2 Degradação polimérica

As massas moleculares, ponderal média (M_w), numérica média (M_n) e o índice de polidispersividade (quociente entre M_w e M_n) foram determinados por Cromatografia de Permeação em Gel em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20), com detecção por índice de refração modelo RID-10^a, no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos – USP.

4.2.3 Grau de ionização dos derivados em função do pH

A densidade de cargas em função do pH foi obtido por meio da titulação potenciométrica, para o cálculo do grau de ionização (GI). Inicialmente pesou-se 40 mg do polímero, previamente seco em estufa à vácuo, e adicionou-se 10 mL de HCl 0,1 mol L^{-1} , a solução permaneceu sob agitação por 24 horas até a solubilização completa. Em seguida, a mistura foi titulada com NaOH também 0,1 mol L^{-1} . O pH foi monitorado constantemente a cada adição de NaOH na solução, que variou entre 50 e 100 μ L dependendo da mudança de pH a fim de obter uma função sigmoide. O GI foi estimado a partir da primeira derivada do gráfico obtido da titulação potenciométrica, utilizando-se os picos indicativos de início e término do processo de desprotonação dos grupos amina dos derivados anfifílicos.

4.2.4 Determinação do grau de substituição da vanilina nos grupos amino livres

Os enxertos de vanilina efetuados nos polímeros também foram determinados por meio da espectroscopia de RMN- H^1 utilizando-se a mesma metodologia descrita no 4.2.1,

porém utilizando a equação 2 que compara a integral correspondente aos hidrogênios aromáticos da vanilina com os hidrogênios anoméricos da quitosana.

$$\% \text{ Vanilina} = \frac{\frac{I_{HV}}{3}}{\frac{I_H}{1}} \times 100 \text{ (equação 2)}$$

Equação 2: Cálculo do GS de vanilina, onde I_{HV} refere-se às integrais dos picos dos hidrogênios da vanilina e I_H as integrais dos picos dos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica.

4.3 Ensaios de citotoxicidade dos derivados de quitosana

4.3.1 Preparação das soluções estoque dos derivados

Pesou-se 5 mg dos polímeros para preparar soluções estoque de 2,5 mg.mL⁻¹, adicionou-se 200 µL de HAc 0,1 mol L⁻¹ e manteve-se sob agitação constante por 24 horas. Após a solubilização completa do polímero adicionou-se o volume necessário de meio Dulnecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Sigma Aldrich) e 1% de penicilina (PS – Sigma Aldrich) para obter 2 mL no volume final na concentração da solução estoque.

As diluições para as concentrações desejadas (0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 0,1 e 1,5 mg.mL⁻¹) foram realizadas na placa de microdiluição utilizando-se do meio como solvente.

4.3.2 Procedimento dos ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade dos polímeros foram realizados a partir do método colorimétrico com MTS para analisar a viabilidade celular, utilizando-se o protocolo do fabricante, com a cultura de células de fibroblastos de camundongo NIH/3T3, uma célula que não indica riscos (nível 1) e atende às necessidades do ensaio.

O ensaio é realizado em 3 dias: no primeiro dia realizou-se a contagem das células na câmara de Neubauer com o intuito de obter 10.000 cel/poço, diluindo até a quantidade necessária para tal, foram cultivadas por 24 horas em 200 µL/poço de DMEM (Sigma Aldrich) suplementado, nas seguintes condições: 37 °C, 95% O₂, 5% CO₂. Durante o segundo dia, o meio DMEM suplementado foi retirado e adicionaram-se as soluções dos derivados de quitosana, solubilizados em ácido acético 2% v/v, em diferentes volumes para obter as concentrações finais desejadas, mantendo nas mesmas condições anteriores por 24 horas. Por fim, no terceiro dia, removeram-se as soluções de polímero da placa e 120 µL/poço de PMS (100 µL DMEM + 20 µL MTS) 25.10-6 mol L⁻¹ foram adicionados. O procedimento foi realizado na ausência de luz.

Em seguida, incubou-se por 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esse período foi realizada a leitura da absorbância em 490 nm no leitor de placas Biotek Elx 808.

A viabilidade celular foi calculada ajustando-se as células sem tratamento (controle) como 100%. O teste foi realizado em triplicata para análise de dados.

4.4 Ensaios microbiológicos

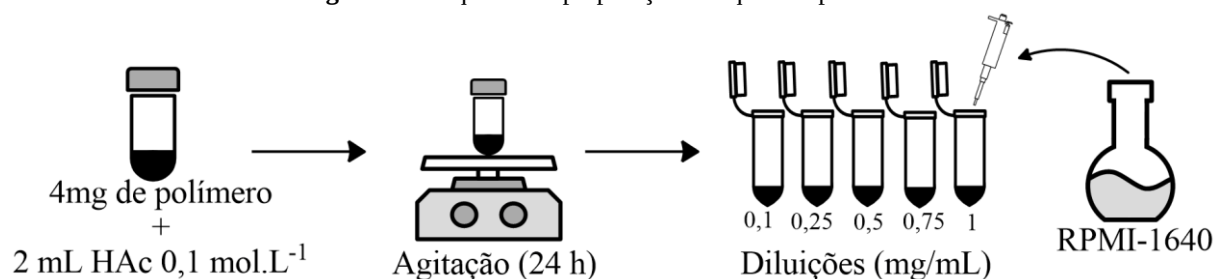
4.4.1 Cepas de *Candida* spp.

As cepas de *Candida* spp. foram disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia (LMIC) da FAMERP, em São José do Rio Preto. Utilizaram-se as seguintes cepas para os ensaios microbiológicos: *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 7051, *Candida tropicalis* 7008 e *Candida tropicalis* 7015.

4.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As soluções estoque dos polímeros foram preparadas na concentração de 2 g L^{-1} em ácido acético 10% (Figura 17), e posteriormente realizou-se as diluições (1 g L^{-1} ; $0,75 \text{ g L}^{-1}$; $0,5 \text{ g L}^{-1}$; $0,25 \text{ g L}^{-1}$; $0,1 \text{ g L}^{-1}$) com o meio de cultura líquido utilizado para o teste (RPMI-1640).

Figura 17: Esquema da preparação estoque dos polímeros



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

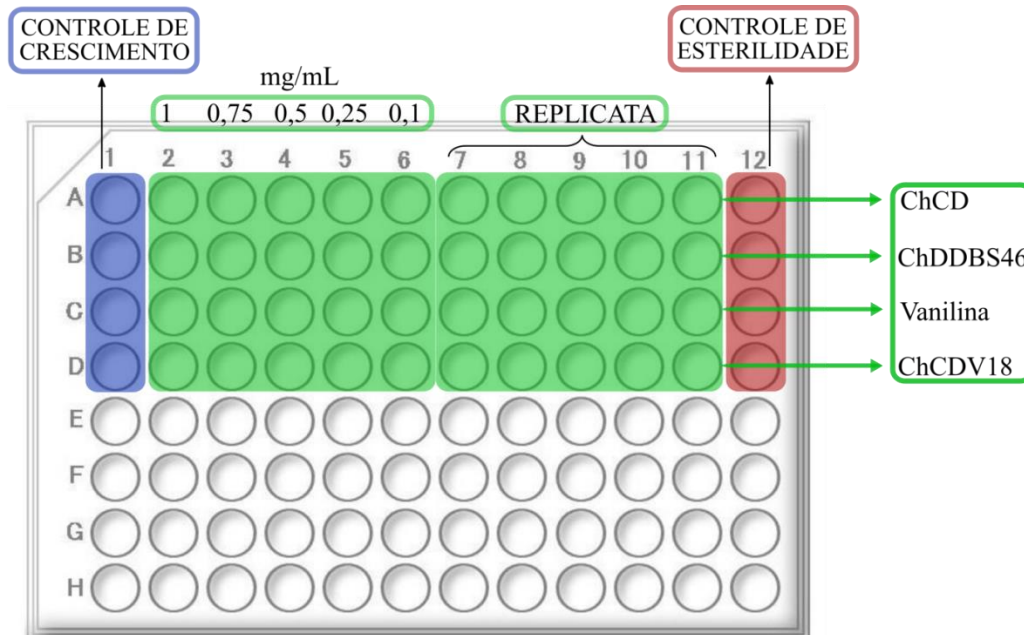
Para preparação dos inóculos foi realizado o repique, com alças estéreis, da levedura desejada para uma placa de ágar Sabouraud-dextrose e incubou-se por 24 horas à 35°C , de acordo com a metodologia CLSI M27-S4E, 2012. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1.10^6 a 5.10^6 células/mL. As placas de microdiluição foram preparadas com diferentes concentrações de derivados de quitosana para realizar o teste. Para a diluição dos polímeros foi utilizado o meio de cultura líquido RPMI-1640 tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) e suplementado com glicose 2% com base no European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST; 2012).

4.4.3 Preparo das placas de microdiluição

Os testes da atividade antifúngica foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento (modificado) M27-A4. As placas de microdiluição foram preparadas em diferentes concentrações de cada polímero (1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,1 g L⁻¹). Utilizou-se uma placa (layout) para cada cepa de microrganismo (Figuras 18, 19 e 20). Para a diluição dos derivados de quitosana foi utilizado o ácido acético 0,1 mol L⁻¹ (10% v/v) e também o meio de cultura líquido RPMI-1640 tamponado a pH 7,0 ± 0,1 com ácido morfolpropileno sulfônico (MOPS) e suplementado com glicose 2%, com o pH

Foi adicionado 100 µL do inóculo padronizado em cada poço contendo o RPMI e os derivados em diferentes concentrações da coluna 2 a 11, a coluna 1 foi utilizada como controle de crescimento até a linha D no layout da placa 1 e a coluna 12 foi utilizada também até a linha D, porém como controle de esterilidade dos polímeros e do RPMI. A placa 1 foi utilizada para os testes de CIM com cepas de *Candida albicans* ATCC e isolados clínicos.

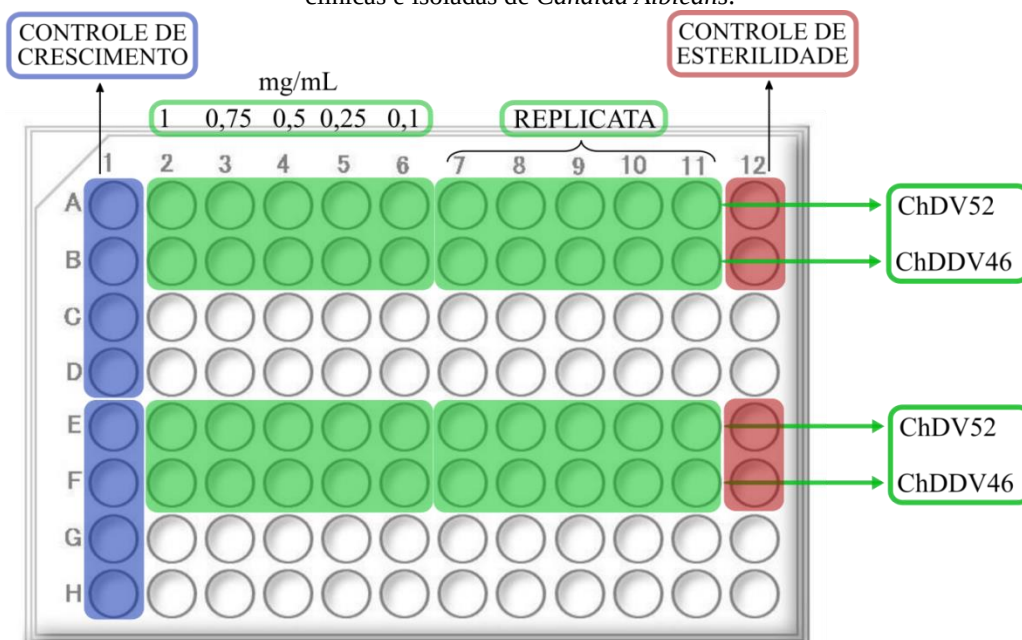
Figura 18: Layout da placa 1 de microdiluição. CIM de da quitosana comercial desacetilada (ChCD), um derivado de quitosana desacetilada degradada com 46% de vanilina como base de Schiff (ChDDBS46), Vanilina pura e um derivado de quitosana comercial desacetilada com 18% de vanilina (ChCDV18) frente cepas ATCC e de isolados clínicos de *Candida Albicans*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

A Figura 19 contempla o layout da placa 2 cujos polímeros testados diferem daqueles da placa 1, porém as cepas utilizadas foram as mesmas.

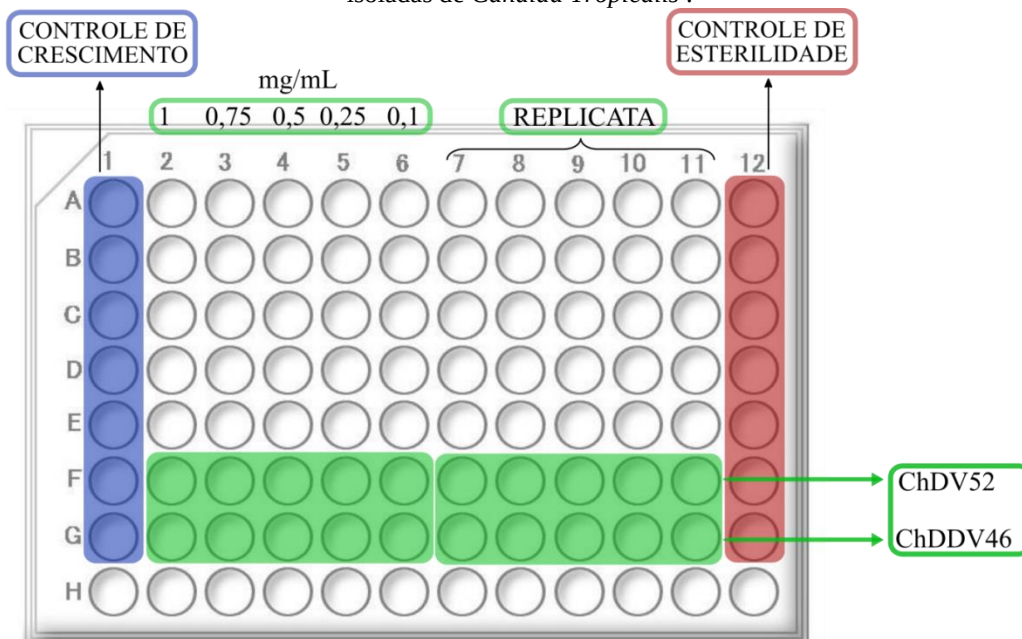
Figura 19: Layout da placa 2 de microdiluição. CIM de um derivado de quitosana desacetilada com 52% de vanilina (ChDV52) e um derivado desacetilado degradado com 46% de vanilina (ChDDV46) frente a cepas clínicas e isoladas de *Candida Albicans*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Na placa 3 tem-se também um layout diferente daqueles utilizados nas placas anteriores, nessa placa, testou-se a atividade dos mesmos derivados da placa 2, porém contra cepas clínicas e isoladas de *Candida tropicalis*.

Figura 20: Layout da placa 3 de microdiluição. CIM dos mesmo derivados da placa 2 frente a cepas clínicas e isoladas de *Candida Tropicalis*.



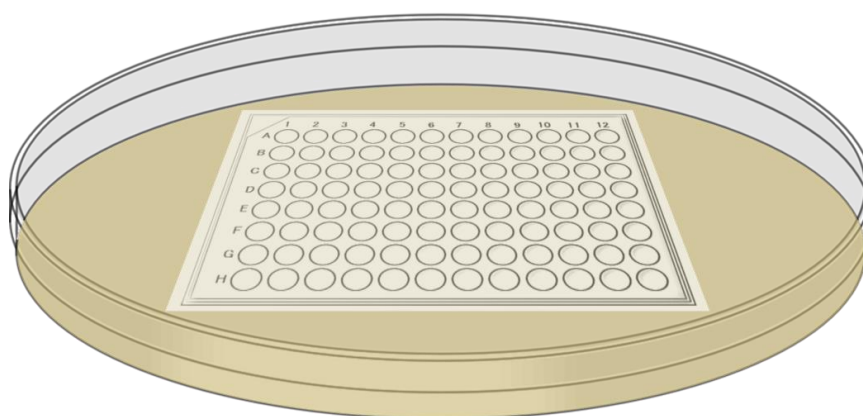
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C e em seguida, realizou-se a leitura em leitor de placas, por densidade ótica, no comprimento de 530 nm. A menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento do fungo em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) do polímero específico para esta amostra. Todas as diluições dos diferentes polímeros e grupos de controle foram testadas em duplicata.

4.4.4 Teste da atividade antifúngica

O teste em questão permite aferir se os derivados utilizados são potenciais antifúngicos fungicidas ou fungistáticos na CIM. Após 24 horas decorridas do ensaio do item 4.4.3 o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa grande de Ágar Sabouraud, seguindo o mesmo layout das placas 1, 2 e 3 (Figura 21). A transferência do conteúdo dos poços da placa de microdiluição para a placa de Ágar Sabouraud foi realizado utilizando-se de palitos esterilizados em autoclave, os poços foram completamente homogeneizados e perfurou-se o ágar na área correspondente ao poço na placa.

Figura 21: Placa de Ágar Sabouraud grande com o mapa do layout das placas de microdiluição utilizadas como gabarito da perfuração.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

4.5 Testes da atividade antioxidante dos derivados anfifílicos frente ao radical cátion ABTS^{•+}.

A formação do radical foi realizada por meio da reação entre as soluções previamente preparadas com água deionizada de 2 mL de 7,4 mM do ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) com uma solução 2 mL de 2,6 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈). A mistura foi mantida na ausência de luz por 16 horas e a temperatura ambiente. Em seguida efetuou-se a diluição de uma alíquota do radical com uma solução de

ácido acético 2% v/v. A técnica utilizada para análise dos resultados obtidos foi à espectrofotometria na região Uv-Vis. Todos os resultados foram obtidos pelo Espectrofotômetro Uv-Vis marca Biochrom Libra, em cubeta de quartzo. A absorbância foi ajustada em 0,7 no comprimento de onda de 734 nm com 1,25 mL da solução do radical diluído e 0,75 mL do tampão na cubeta. (PU et al., 2019)

Uma solução estoque dos polímeros foi preparada a partir de 8,4 mg dos derivados em 2,1 mL de uma solução de ácido acético 2% v/v e deixado sob agitação constante por 24 horas para a total solubilização.

Transferiram-se diferentes alíquotas da solução estoque, para obter os diferentes valores de concentrações desejadas (**Tabela 5**) para a cubeta já contendo 1,25 mL do radical diluído. O volume foi ajustado em 2 mL com a quantidade necessária da solução de ácido (meio reacional), posteriormente efetuou-se a leitura no espectrofotômetro nos tempos pré-estabelecidos, também descritos na **Tabela 5**.

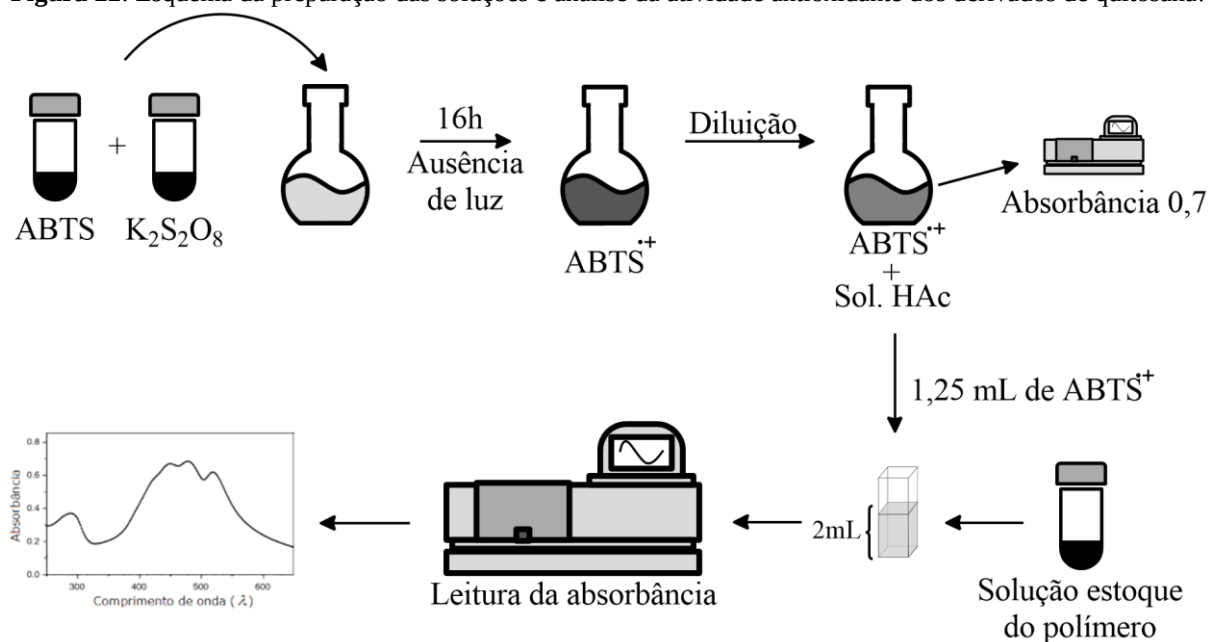
Tabela 5: Preparo dos polímeros nas concentrações desejadas e tempo de análise

Concentrações (g L ⁻¹)	Alíquota do polímero (μL)	Alíquota de ácido (μL)	Tempos (t) (min)
0,1	50	700	0; 5; 10
0,2	100	650	0; 5; 10
0,5	250	500	0; 5; 10
0,75	375	375	0; 5; 10; 15; 20; 25; 30
1	500	250	0; 5; 10
1,5	750	-	0; 5; 10

Elaborado pelo autor, 2020

Todo o processo está esquematizado na Figura 22, a fim de facilitar a visualização dos procedimentos descritos anteriormente.

Figura 22: Esquema da preparação das soluções e análise da atividade antioxidante dos derivados de quitosana.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

A eficiência da atividade antioxidante dos polímeros frente aos radicais livres foi calculada seguindo a equação 3.

$$\text{remoção do ABTS}^{\bullet+} (\%) = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_0} \times 100 \text{ (equação 3)}$$

Equação 3: Cálculo da habilidade dos polímeros de remoção dos radicais livres

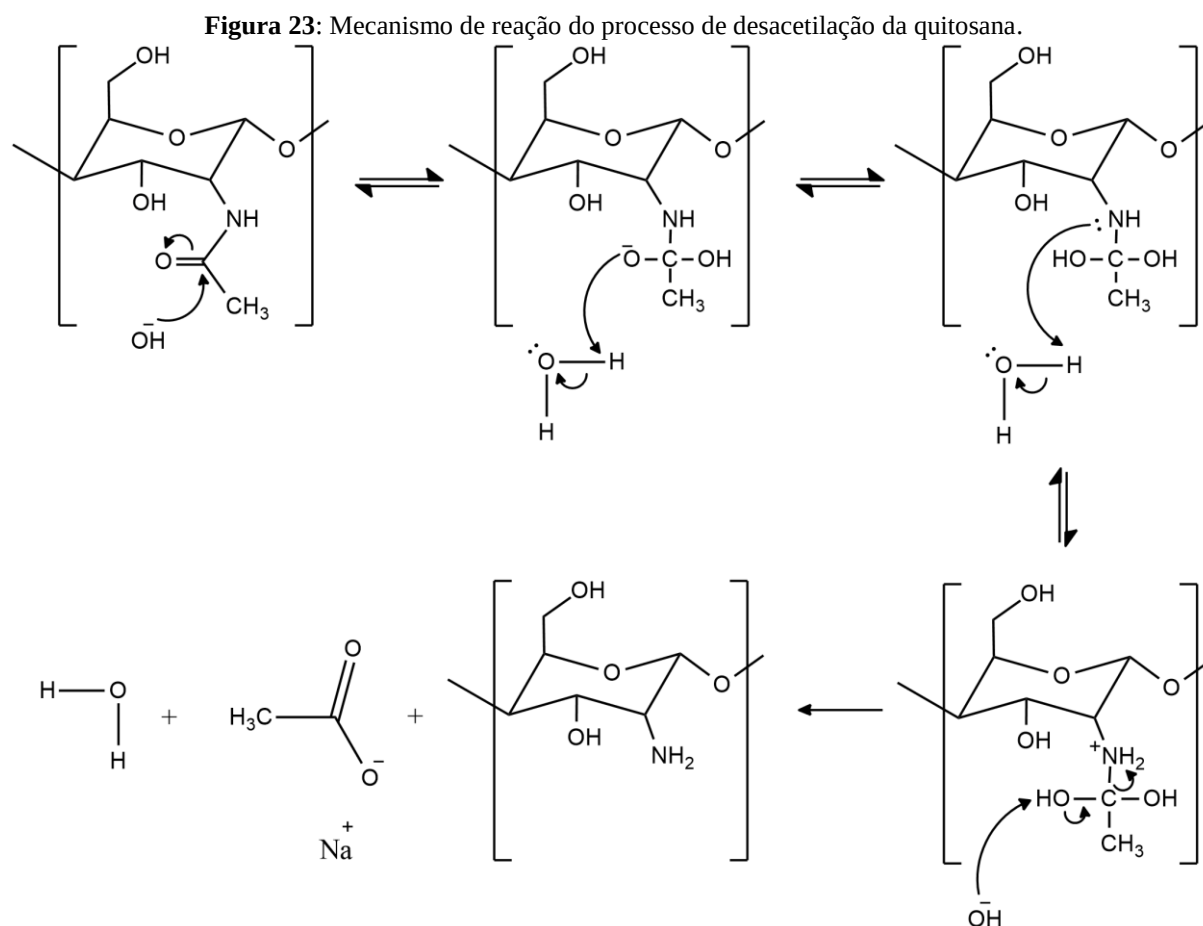
Na qual A_0 se refere à absorbância do controle (ABTS^{•+} e a solução tampão), A_1 é a absorbância da amostra (ABTS^{•+} e o polímero testado) e A_2 é a absorbância do branco (HAc 2% v/v). (PU et al., 2019)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos derivados anfifílicos

5.1.1 Reação de desacetilação da quitosana comercial

A reação de desacetilação da quitosana é obtida pela hidrólise básica do grupo amida, cujo mecanismo de substituição nucleofílico é demonstrado na Figura 23.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Essa reação tem como finalidade o aumento dos grupos amino livres na estrutura do polímero, os quais são mais reativos e passíveis de modificações. O mecanismo da reação ocorre por meio da adição nucleofílica de íons hidróxido no grupo carbonila, da porção N-acetilglicosamina, seguida da transferência de prótons da água do meio reacional para a forma aniônica do intermediário tetraédrico. Posteriormente ocorre a protonação do nitrogênio do grupo amino do intermediário e consequentemente tem-se a dissociação da sua forma protonada, o que resulta na clivagem da ligação entre o carbono e o nitrogênio, dando origem por fim na estrutura da quitosana com maior conteúdo de monômeros contendo o grupo amino livre e acetato de sódio no meio reacional.

5.1.2 Degradação polimérica

A **Tabela 6** abaixo refere-se aos valores de M_w , M_n e polidispersividade das amostras de quitosana .

Tabela 6: Valores de M_w , M_n e polidispersão dos polímeros de quitosana

Polímero	M_w	M_n	Polidispersão
Quitosana Desacetilada (ChD)	357,7 kDa	77,3 kDa	4,6
Quitosana Desacetilada Degradada (ChDD)	13,2 kDa	5,2 kDa	2,5
Quitosana Comercial Degradada (ChCD)	15,5 kDa	5,7 kDa	2,7

Elaborado pelo autor, 2020

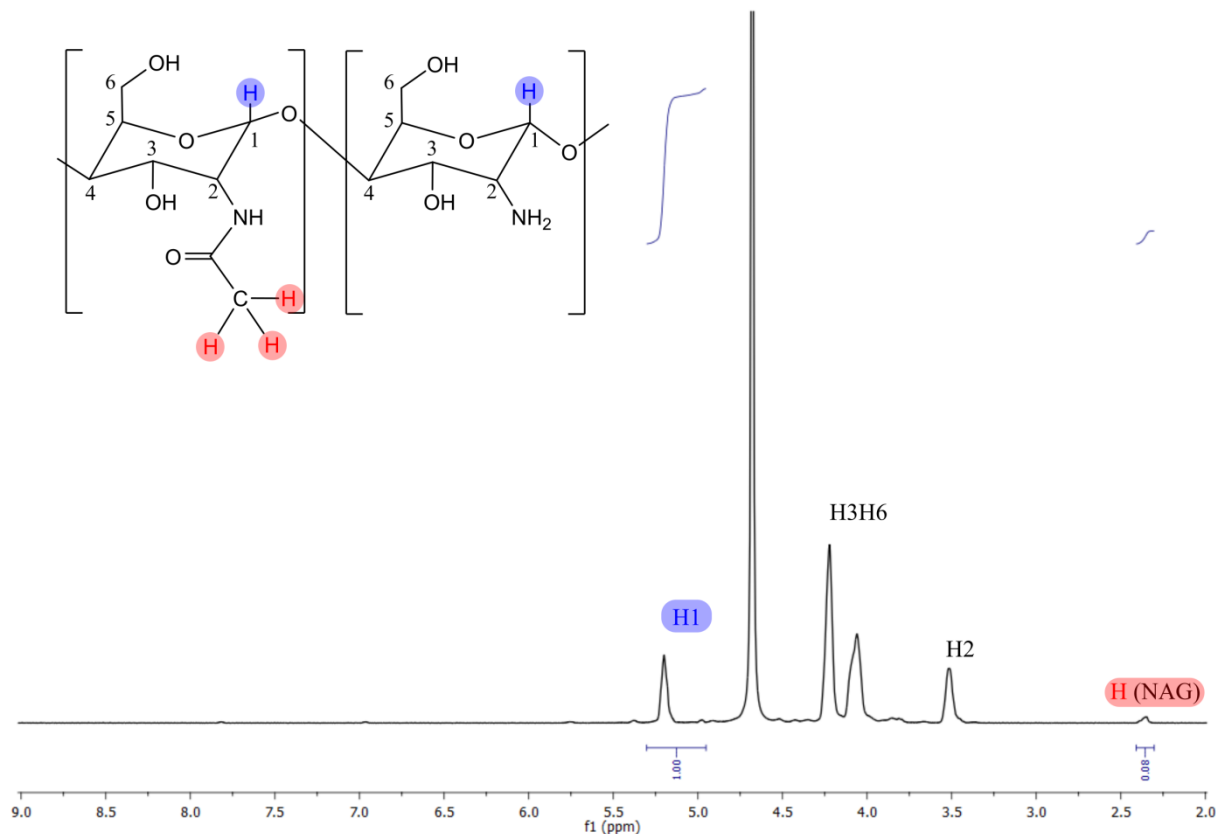
Por meio da técnica de GPC (cromatografia de permeação em gel) foi possível avaliar a extensão da degradação por oxidação com NaNO_2 . O teor de NaNO_2 permitiu reduzir em mais de 20 vezes a massa molecular da quitosana de partida. Especificamente, os valores de M_w da ChDD é 27 vezes menor do que a ChD e a ChCD é cerca de 23 vezes menor do que o M_w da ChD, o que denota que o teor pode ser ajustado para a obtenção de massas molares variadas. Ao comparar os valores entre as amostras degradadas (ChDD e ChCD) é possível notar uma pequena diferença, isso está relacionado possivelmente com o processo de desacetilação que tende a diminuir ligeiramente as cadeias poliméricas.

5.2 Caracterização dos polímeros

5.2.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Com o intuito de avaliar quantitativamente o grau de desacetilação da quitosana, utilizou-se a espectroscopia de RMN- ^1H tendo como objetivo determinar a porcentagem de grupos amino livres. Na Figura 24 é apresentado o espectro da quitosana desacetilada.

Figura 24: Espectro de RMN- H^1 em D_2O/DCI a $70\text{ }^{\circ}C$ da quitosana desacetilada (ChD).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Os picos em aproximadamente 5,2 e 4,9 ppm correspondem aos hidrogênios anoméricos (unidades desacetilada e acetilada, respectivamente) e o sinal em 2,4 ppm refere-se aos hidrogênios do grupo N-acetilglicosamina (NAG). O maior pico do espectro, que se encontra no 4,7 ppm, refere-se a água (presente em todas as amostras). Além das áreas das integrais dos picos relacionados ao cálculo da porcentagem de NAG, há um singlete no 3,5 ppm que é atribuído ao H2 dos grupos da glucosamina e NAG e também multipletos de 4,1 a 4,25 ppm que correspondem aos prótons H2, H3, H4, H5 e H6 dos anéis do polímero. O deslocamento (mais à esquerda) dos sinais dos hidrogênios anoméricos comparados aos dos demais hidrogênios, justifica-se pela “desblindagem” desses por estarem entre dois átomos de oxigênios adjacentes.

Dentre todos os prótons do polímero, os três hidrogênios do grupo metila da N-acetilglicosamina não possuem nenhum oxigênio adjacente (ou qualquer outro átomo que seja mais eletronegativo), portanto, o fato deles estarem mais à direita, ou seja, em um campo mais alto está de acordo com uma maior “blindagem” desses prótons.

A partir das áreas das integrais mostradas na figura 22 e da equação 1, a porcentagem de unidades NAG é de 2,7%, portanto o grau de desacetilação (GD) da quitosana foi estimado em 97,3%. Como resultado, o aumento de grupos amino livres proporciona um aumento da

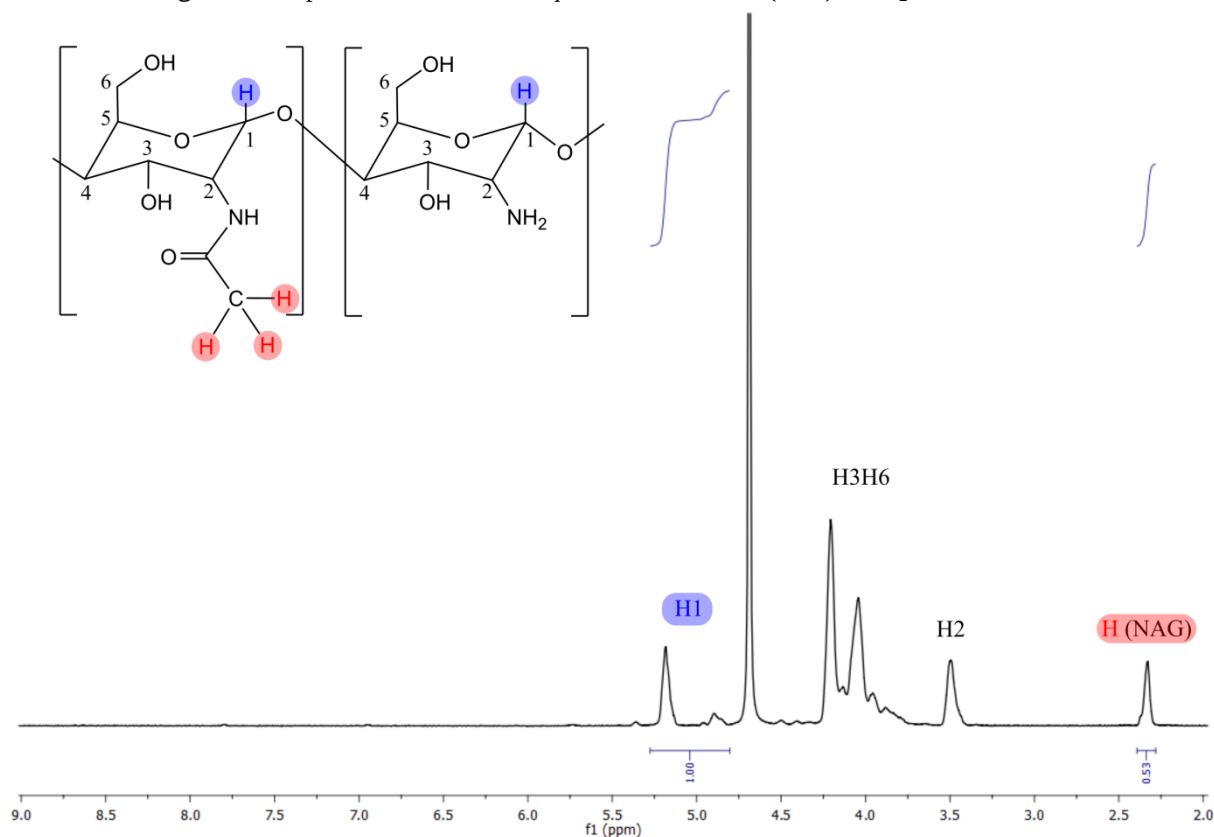
solubilidade do polímero em solventes polares e uma elevação na quantidade de grupos reativos para a realização de enxertos no polímero.

5.2.2 Determinação do grau de desacetilação da quitosana comercial

A partir do espectro de RMN- H^1 da quitosana comercial pode-se determinar, assim como no item 5.2.1, o seu grau de desacetilação com o intuito de avaliar a eficiência da reação.

No espectro da quitosana comercial (Figura 25) nota-se que o sinal dos hidrogênios do NAG (2,4 ppm) é mais pronunciado do que no espectro do derivado desacetilado presente na Figura 24. Além disso, os picos referentes aos hidrogênios dos carbonos anoméricos da porção acetilada também é maior que aquele exibido no espectro da quitosana desacetilada.

Figura 25: Espectro de RMN- H^1 da quitosana comercial (ChC) em D_2O/DCl a 70 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

A partir das áreas das integrais dos picos desejados e utilizando-se da equação 1 foi possível determinar que o grau de acetilação foi de aproximadamente 17,7% (GD de 82,3%), um valor 6,5 vezes maior que aquele presente na quitosana desacetilada. Pode-se comprovar, por meio dos espectros e dos cálculos efetuados, a eficácia no processo de desacetilação proposto para a quitosana comercial de partida.

A **Tabela 7** apresenta os valores de GD das amostras analisadas

Tabela 7: Porcentagem de grupos aminos livres das quitosanas analisadas

Polímero	Grau de desacetilação (GD)
Quitosana Comercial (ChC)	82,3%
Quitosana Desacetilada (ChD)	97,3%

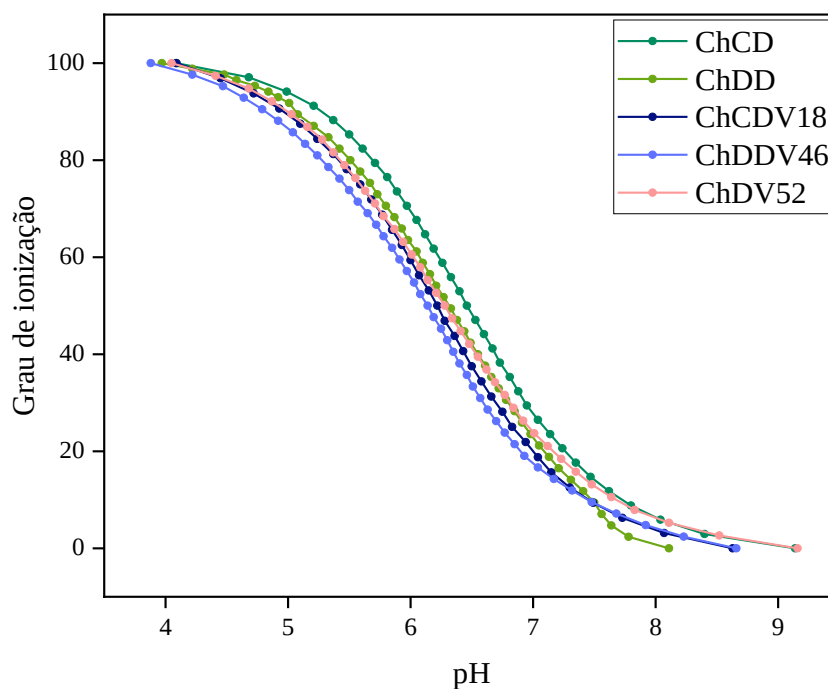
5.2.3 Grau de ionização

Os graus de ionização (GI) dos polímeros foram obtidos a partir de titulação potenciométrica, monitorando-se a variação do valor de pH, o que permite determinar o início e o fim da desprotonação dos grupos ionizáveis, como descrito no item 4.2.3. Os graus de ionização foram obtidos por meio da equação 4 e apresentados na Figura 26. (DE PAULA PANSANI OLIVEIRA et al., 2013)

$$\% G.I = \left[1 - \left(\frac{V_x - V_i}{V_f - V_i} \right) \right] \times 100 \text{ (equação 4)}$$

Equação 4: Cálculo do grau de ionização dos derivados anfifílicos, no qual V_i é o volume inicial (primeiro pico da derivada) onde se inicia a desprotonação dos grupos amina, V_f corresponde ao volume final (segundo pico da derivada) (grupos amina estão desprotonados) e V_x são os volumes intermediários entre os dois picos.

Figura 26: Gráfico do GI dos derivados de quitosana enxertados com vanilina e as quitosanas de partida.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

O grau de ionização é um importante parâmetro dos polímeros, pois, por meio dele, é possível avaliar o grau de protonação dos grupos amina ($-NH_2$) frente a variações de pH. A

protonação, ou desprotonação desses grupos em diferentes valores de pH permite avaliar, por exemplo, a melhor condição do meio reacional na síntese de derivados de quitosana com a vanilina.

Sabe-se também que as cargas positivas oriundas dos grupos NH_3^+ apresentam um papel importante na atividade antimicrobiana de derivados de quitosana, como já mencionado no item 2.5, logo, conhecer o equilíbrio $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ com a variação do pH torna possível avaliar qual a melhor faixa de trabalho, promovendo uma melhora na atividade antimicrobiana dos derivados sintetizados. Além disso, o GI fornece o comportamento da solubilidade dos polímeros, visto que esse parâmetro da quitosana está intimamente ligado com a interação dos grupos NH_3^+ com a água, como apresentado na figura 7.

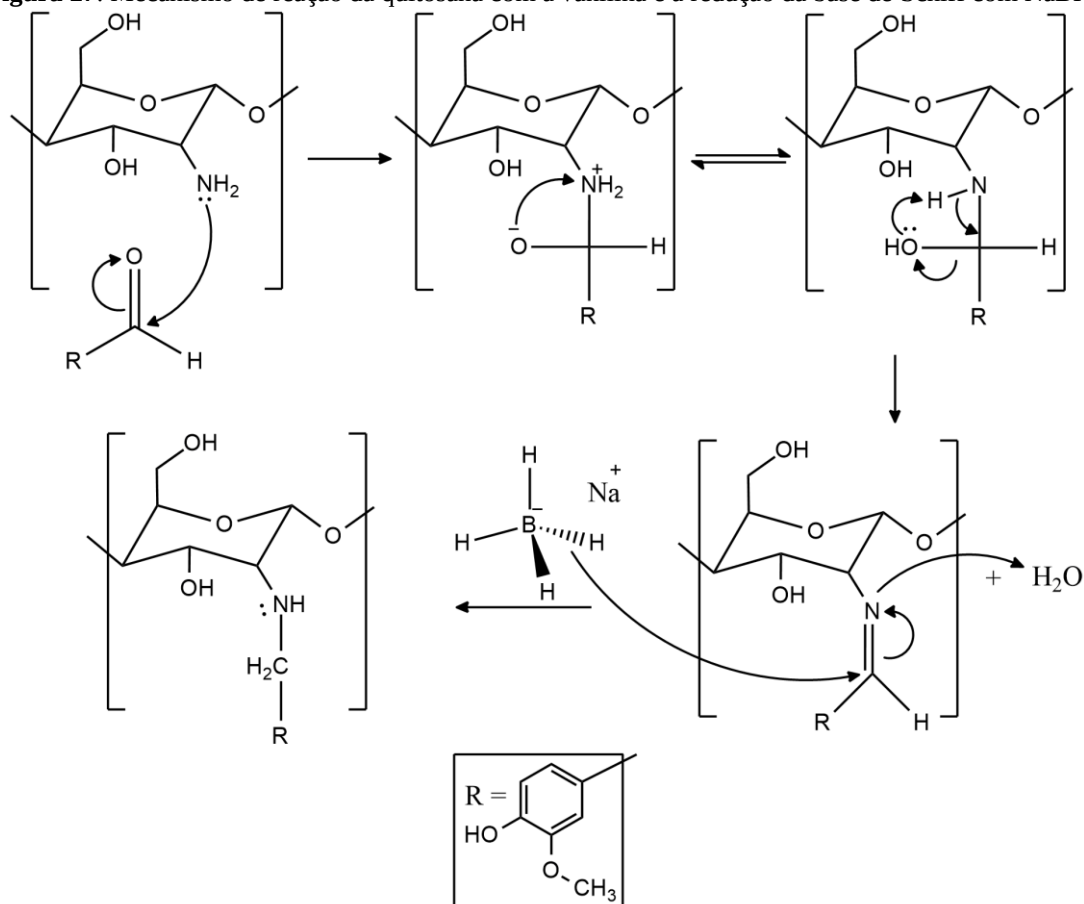
De acordo com De Paula Pansani Oliveira et al., 2013, para a quitosana sem grupos substituintes o grau de ionização é 100% em pH 4,0-5,0 e próximo de zero em pH 7,0. Ao inserir grupos substituintes também ionizáveis, as curvas sigmóides são gradualmente deslocadas para faixas de pH maiores com o aumento do grau de substituição, dessa maneira, tem-se grupos carregados em uma faixa mais ampla de pH.

A Figura 26 demonstra uma pequena variação do grau de ionização dos derivados de vanilina-quitosana (ChCDV18, ChDDV46 e ChDV52) comparados aos de partida, o comportamento das curvas são muito próximos, porém a tendência é de diminuir ligeiramente o GI dos polímeros. Esse comportamento pode estar relacionado com o fato da vanilina ser um grupo mais hidrofóbico, o que em princípio pode alterar o pKa dos grupos amina, ou seja, o fato da inserção de vanilina diminuir ligeiramente o grau de ionização, pode estar relacionado à mudanças na conformação das cadeias poliméricas.

5.2.4 Determinação do grau de substituição da vanilina nos grupos amino

A inserção da molécula de vanilina foi realizada seguindo os procedimentos descritos no item 4.1.3 por meio da reação dos grupos amino da cadeia do polímero com o aldeído da vanilina, resultando na formação da base de Schiff (BS). Em seguida, a BS formada foi reduzida utilizando-se boroidreto de sódio, a Figura 27 demonstra os mecanismos das reações envolvidas na síntese dos derivados (DESBRIÈRES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996).

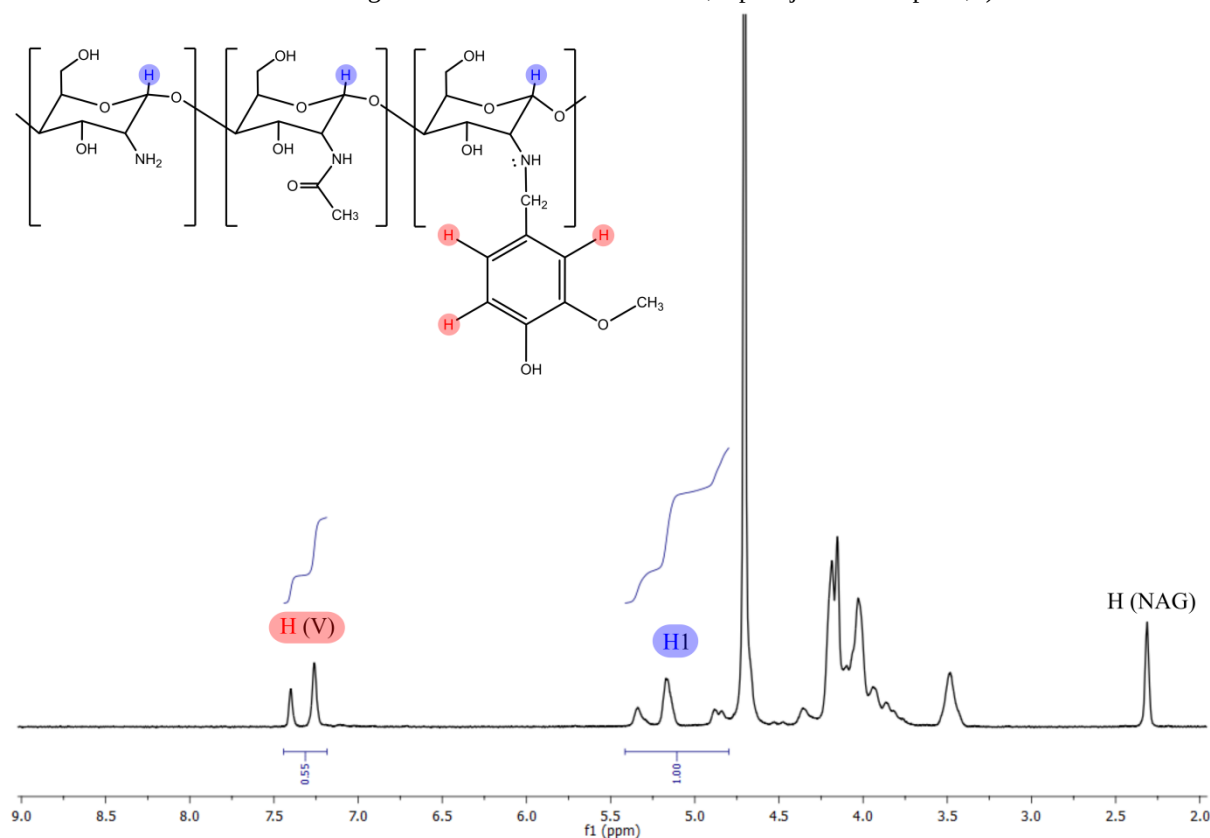
Figura 27: Mecanismo de reação da quitosana com a vanilina e a redução da base de Schiff com NaBH_4 .



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Para confirmar quantitativamente a eficiência das reações com vanilina, o RMN- ^1H respectivo dos polímeros sintetizados é apresentado nas Figuras 28, 29 e 30. Destaca-se no espectro da Figura 28 principalmente o duplete de 7,25 a 7,4 ppm que se refere aos hidrogênios do anel aromático da vanilina, e os três picos de 4,9 a 5,3 ppm que corresponde aos hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados e desacetilados.

Figura 28: Espectro de RMN- H^1 com os valores das integrais dos picos de interesse da ChCDV18 (quitosana comercial degradada enxertada com vanilina, e pH ajustado em pH 5,1)

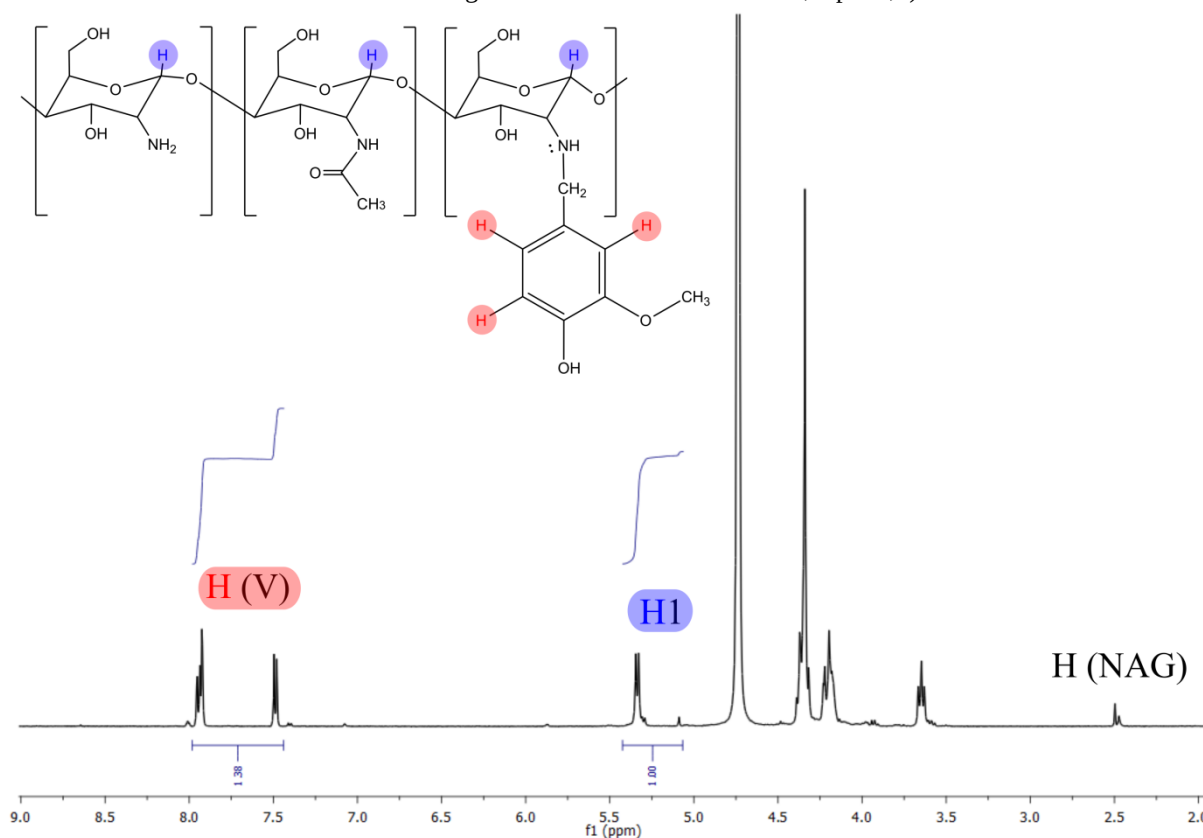


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Nota-se também que há nesse espectro da Figura 28 um novo sinal do carbono anomérico em 5,3 ppm. Esse novo pico trata-se dos hidrogênios anoméricos das unidades agora substituídas com a vanilina. Dessa forma, o cálculo do GS deve considerar a área das integrais dos três sinais e a área das integrais referentes aos hidrogênios do anel da vanilina. Para o cálculo da porcentagem relativa de vanilina presente nos derivados utilizou-se a equação 2 e obteve-se uma porcentagem de 18% de substituição no polissacarídeo, um valor relativamente baixo, porém esperado, visto que o pH 5,1 do meio reacional dessa síntese mantém protonado a maioria dos grupos amino ($-NH_2$), como visto no grau de ionização no item 5.1 ou seja, o mecanismo presente na figura 28 ocorre em cerca de 20% dos grupos da quitosana.

Baseando-se nos dados obtidos do grau de ionização, mudou-se o pH do meio reacional a fim de obter outros derivados com maior grau de substituição, porém, além de ter como objetivo avaliar nos testes microbiológicos e antioxidantes a variação do GS, a massa molecular e o grau de desacetilação também foram alvos do estudo. Os espectros de RMN- H^1 das amostras contendo essas modificações estão presentes na Figura 29 e na Figura 30.

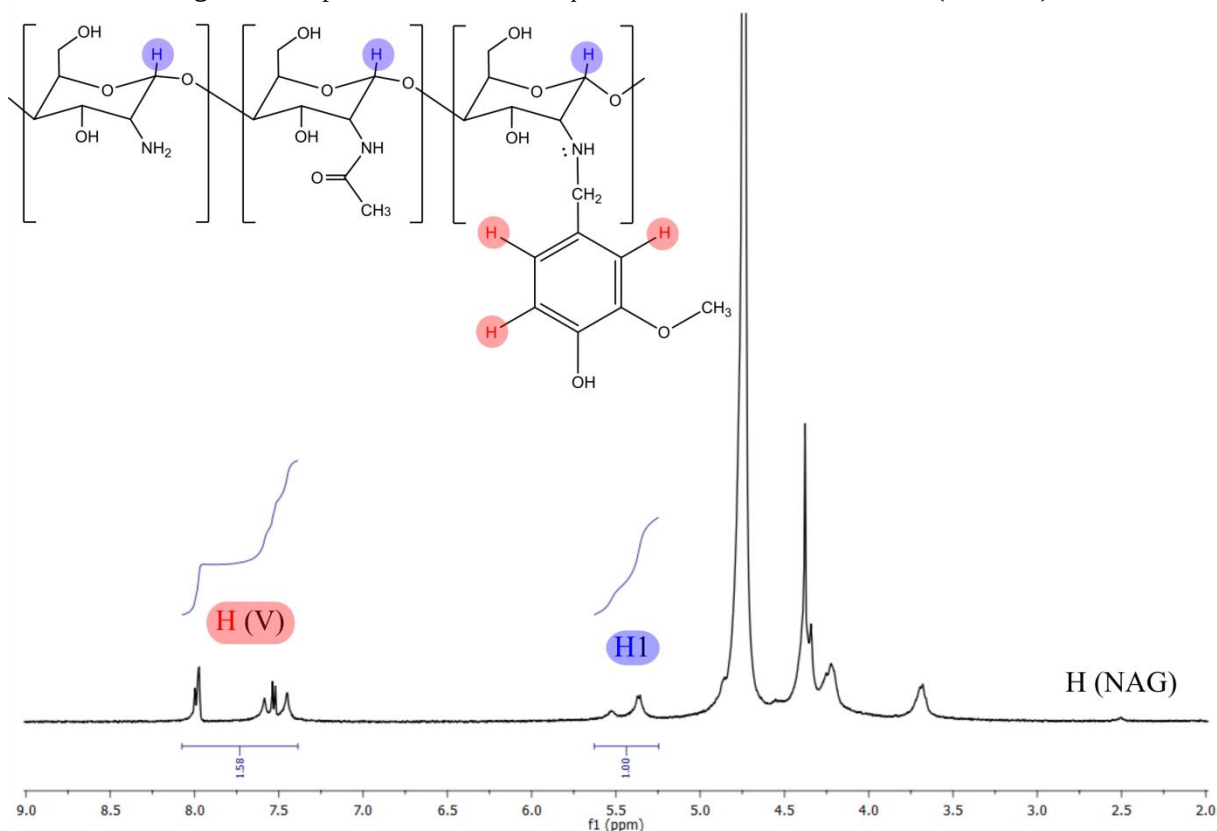
Figura 29: Espectro de RMN- H^1 com os valores das integrais dos picos de interesse da ChDDV46 (quitosana desacetilada degradada enxertada com vanilina, e pH 6,5).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Os cálculos das áreas das integrais foram efetuados por meio da equação 2 e notou-se um aumento significativo do GS (46%) confirmando a eficácia no aumento do pH do meio reacional da síntese. Outro derivado anfifílico foi sintetizado seguindo os mesmos procedimentos do derivado ChDDV46, com uma quitosana também desacetilada, porém de alta massa molecular (ChD) para comparar o efeito da degradação polimérica nos derivados. A Figura 30 a seguir exibe o espectro de RMN- H^1 do derivado em questão.

Figura 30: Espectro de RMN- H^1 da quitosana desacetilada de alta Mw (ChDV52).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Assim como no polímero anterior, os procedimentos e os cálculos descritos no item 4.2.3 foram realizados e foi obtido um valor de 52% de substituição de vanilina nesse derivado, um valor relativamente próximo ao encontrado no polímero ChDDV46. Pode-se também confirmar que a alteração do pH é um fator importante para controlar o grau de substituição no polímero. Vale ressaltar que a grande diferença entre o polímero com 52% de substituição e o ChDDV46 é a massa molecular. Esse fato permite avaliar também a influência desse aspecto estrutural dos polímeros nos testes das atividades antifúngica e antioxidante.

A **Tabela 8** foi elaborada com o intuito de contemplar todos os polímeros sintetizados com suas respectivas massas moleculares (Mw), graus de desacetilação (GD) e grau de substituição (GS) de vanilina.

Tabela 8: Massa molecular ponderal média (Mw), grau de substituição (GS) e grau de desacetilação dos derivados

Polímero	Mw (kDa)	GS (%)	GD (%)
ChCDV18	15,5	18	82,3
ChDDV46	13,2	46	97,3
ChDV52	357,7	52	97,3

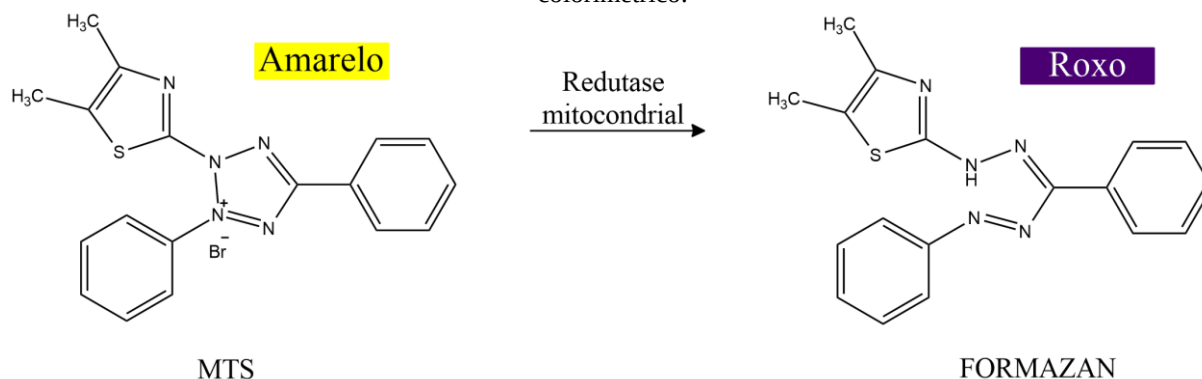
N-vanilina-quitosana

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

5.3 Ensaios de citotoxicidade dos derivados de quitosana

O estudo da citotoxicidade utilizando MTS é um método colorimétrico quantitativo baseado na quebra do sal de tetrazólio (MTS) por células biologicamente ativas. As células vivas são capazes de reduzir o MTS para formar um complexo colorido. Essa redução possivelmente ocorre por meio das enzimas desidrogenases NADH dependentes. O composto formado pode ser determinado quantitativamente na absorvância de 490-500 nm (MTS ASSAY KIT (CELL PROLIFERATION) (COLORIMETRIC) (AB197010) (HUANG; KHOR; LIM, 2004)).

Figura 31: Formação de Formazan resultante da redução do MTS por meio da redutase mitocondrial do método colorimétrico.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

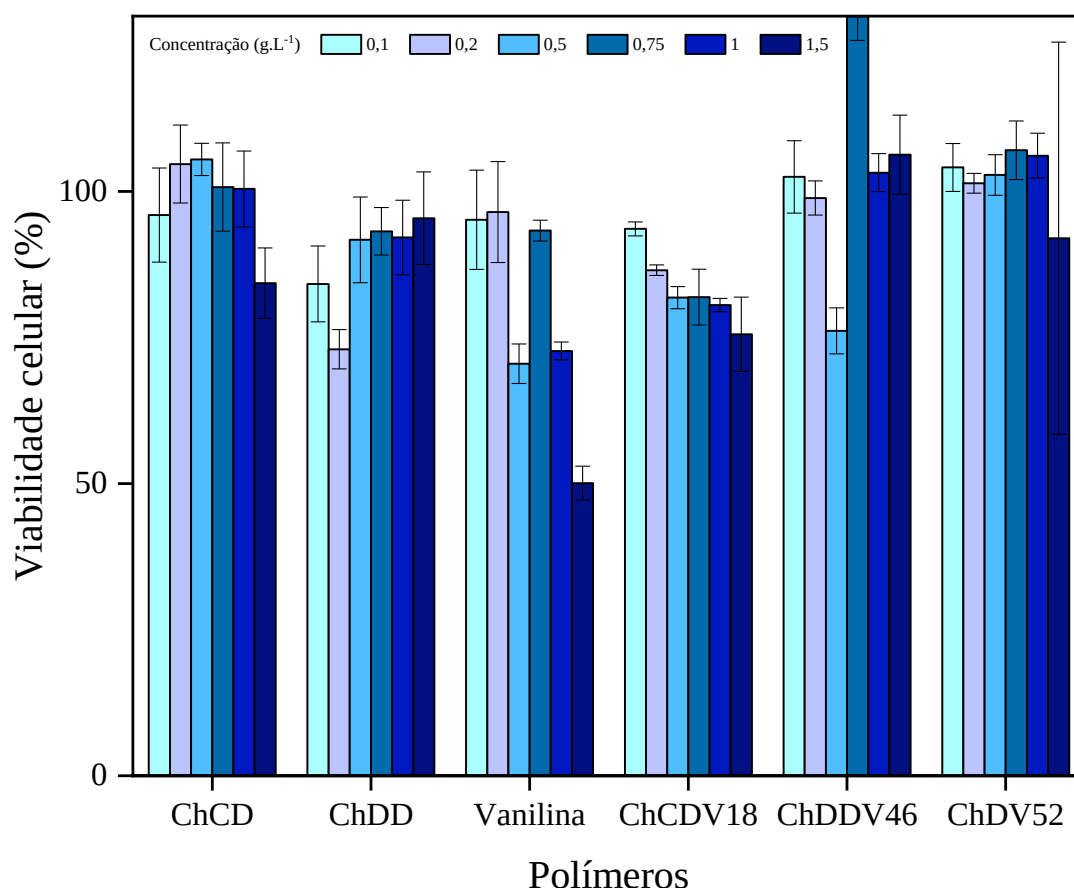
A nova coloração obtida pela reação exemplificada na Figura 31 foi quantificada por meio da leitura de absorbância em 490 nm das placas de microdiluição. As células na ausência de polímero (grupo controle) foram consideradas como 100% viáveis, e então, a viabilidade celular das demais (na presença dos polímeros) foi calculada a partir da equação 5.

$$\% = \frac{A_{\text{poço}} \times 100}{\bar{x} A_{\text{controle}}} \text{ equação 5}$$

Equação 5: Cálculo em porcentagem da viabilidade celular das células de fibroblastos NIH3/3T3 na presença dos polímeros em diferentes concentrações, na qual “A poço” refere-se à absorbância de um polímero em uma concentração específica e “ $\bar{x}$ A controle” é a média dos poços com as células controle.

Com os resultados obtidos foi possível construir o gráfico da viabilidade celular de derivados de quitosana em diferentes concentrações, a fim de criar um perfil da toxicidade de cada polímero testado.

Figura 32: Gráfico da viabilidade celular de cada polímero em diferentes concentrações para células de fibroblastos NIH3/3T3.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

A Figura 32 permite constatar que os derivados testados não apresentam toxicidade importante contra as células de fibroblastos NIH3/3T3 em nenhuma das concentrações estudadas, todos os derivados em todas as concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 80%, com exceção da ChDD 0,2 g L⁻¹ e ChCDV18 na sua maior concentração que apresentaram viabilidade de 73 e 75% respectivamente. Realizou-se também o teste com o controle ácido (ácido acético utilizado para solubilizar as amostras) nas mesmas concentrações estudadas dos polímeros, em todos os casos a viabilidade celular ficou acima de 95%, exceto na de 1,5 g L⁻¹ que ficou em 84%. Portanto, parte da citotoxicidade pode ser atribuída ao ácido acético.

Esses resultados possibilitam induzir que todos os polímeros detêm potencial de aplicação nos testes microbiológicos frente aos fungos do gênero *Candida*. Em estudos já realizados que testaram a citotoxicidade de derivados de quitosana, esses tiveram resultados promissores, nos quais os polímeros apresentaram baixa toxicidade, o que propicia maior segurança ao se realizar os testes microbiológicos com os polímeros sintetizados. (ANITHA et al., 2009; DE ASSIS et al., 2012; FELICE et al., 2015)

5.4 Ensaios microbiológicos

5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação das CIM pelo método de microdiluição, descrito no item 4.4.2., foi o utilizado por ser um método preciso, quantitativo e mais sensível que o método de disco difusão (método qualitativo). O método de microdiluição é amplamente utilizado para determinação dos índices de inibição de fármacos convencionais por ser uma técnica mais prática e econômica, visto que a quantidade de material utilizado é baixa e a atividade de vários antifúngicos pode ser testada em uma só placa (LEITE, 2016).

As porcentagens de inibição foram calculadas em relação ao controle de crescimento, de acordo com a equação 6:

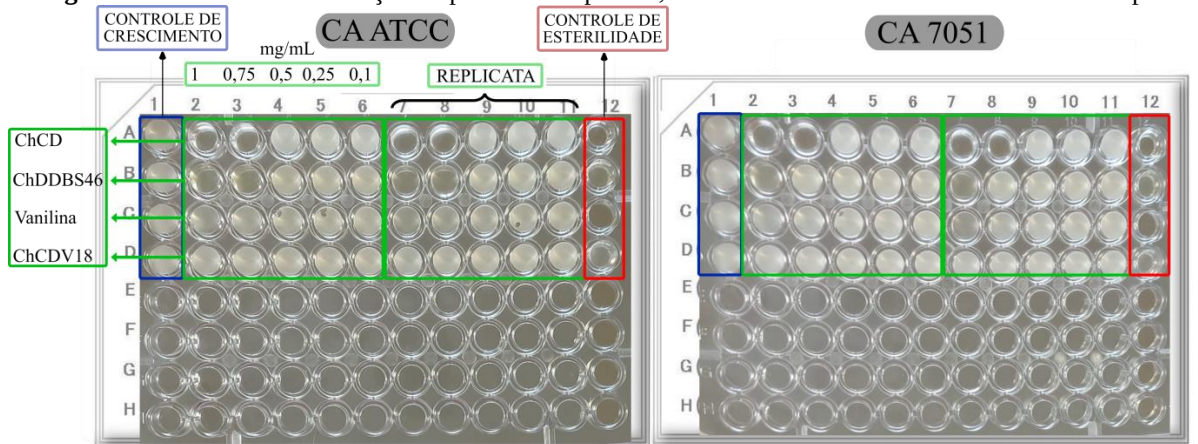
$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{100 \times A}{AC} \text{ (equação 6)}$$

Equação 6: Cálculo das porcentagens de inibição, sendo que A representa a absorbância do poço selecionado e AC as médias das absorbâncias dos poços do controle de crescimento.

A fim de confirmar a eficácia dos polímeros, realizou-se a absorbância do solvente das soluções e os resultados foram semelhantes aos valores do grupo controle de crescimento, ou seja, a inibição correspondente de cada cepa refere-se à atividade antifúngica dos derivados de quitosana.

As figuras a seguir (Figuras 33-35) são referentes aos ensaios de CIM realizados com diferentes cepas ATTC (American Type Culture Collection, um centro de recursos biológicos de aquisição, autenticação, produção, preservação, desenvolvimento e distribuição de microrganismos padrão de referência, linhagens celulares e outros materiais para pesquisa médica e biológica) e isolados clínicos dos fungos do gênero *Candida*.

Figura 33: Placa de microdiluição do polímero de partida, de dois derivados de vanilina e da vanilina pura.

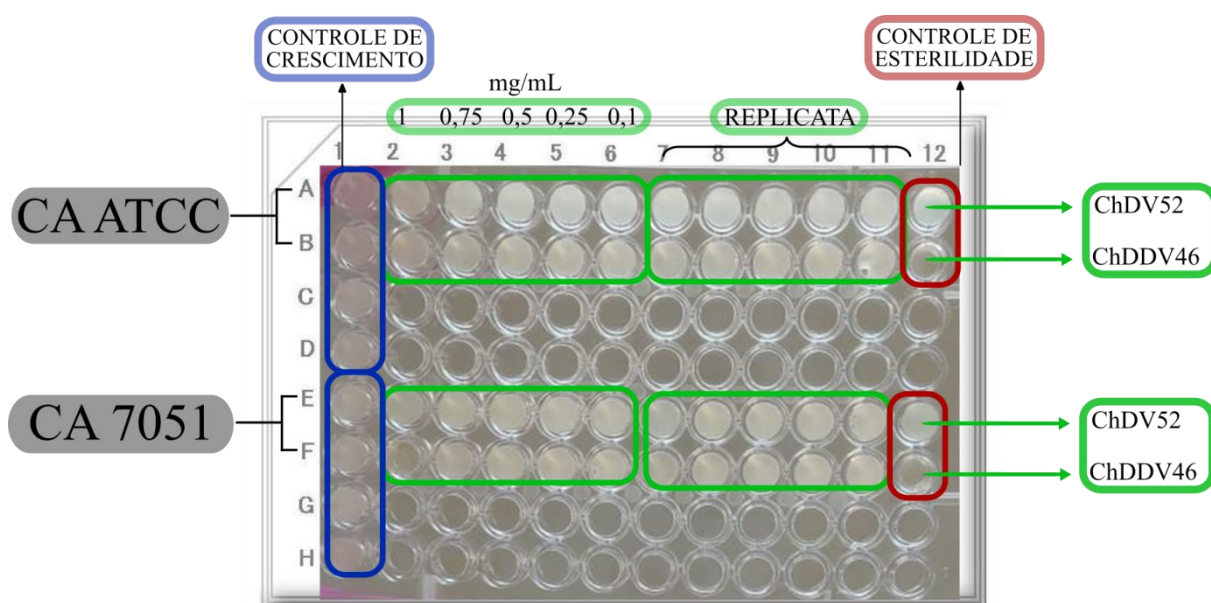


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Os polímeros testados com a cepa de *C. albicans* ATCC de modo geral apresentaram bons resultados. O polímero ChCD inibiu cerca de 85% nas duas maiores concentrações e o derivado ainda na forma de base de Schiff (ChDDBSV46) inibiu cerca de 73% também nas duas maiores concentrações. Além desses polímeros, a vanilina também apresentou inibição de aproximadamente 54% em sua maior concentração testada, já o derivado ChCDV18 não apresentou atividade inibitória em nenhuma das concentrações estudadas.

O comportamento foi semelhante para a cepa de isolado clínico de *C. albicans* (CA 7051), o polímero de quitosana sem grupo substituinte (ChCD) nas duas maiores concentrações obteve um grau de inibição de cerca de 88%, um valor ligeiramente maior quando comparado com a outra cepa. Já o derivado substituído com base de Schiff apresentou resultado positivo apenas na concentração de 1 g L^{-1} , 72% de inibição e nas demais não houve alteração no crescimento do fungo. A vanilina assim como no caso anterior também inibiu cerca de 55% do crescimento da cepa na concentração de 1 g L^{-1} e o derivado ChCDV18 não inibiu o crescimento em nenhuma concentração testada.

Figura 34: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de *Candida albicans*.

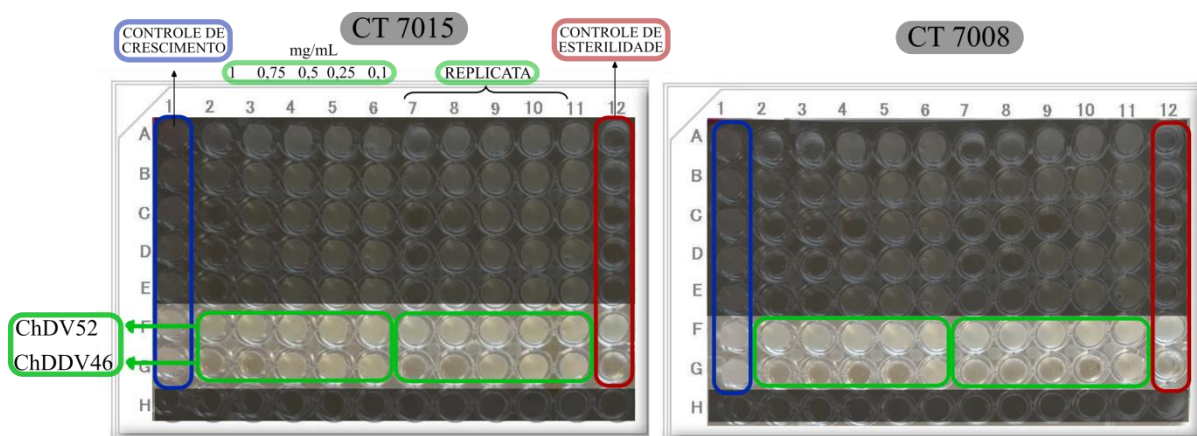


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Nesse segundo ensaio (Figura 34) foi testada a inibição por dois polímeros, um deles, o ChDDV46 ($M_w \sim 15$ kDa), é o mesmo polímero das placas anteriores (ChDDBSV46), porém com a base de Schiff reduzida e o ChDV52 ($M_w \sim 357$ kDa) que possui alta massa molecular. Portanto, ambos os polímeros nessa bateria de testes apresentam o mesmo grau de desacetilação e valores de substituição relativamente próximos. O objetivo foi testar a influência das massas moleculares na inibição das cepas de *C. albicans*.

Os resultados obtidos por meio da equação 6 mostraram como melhor resultado o polímero ChDDV46 na concentração de 1 g L^{-1} inibindo 38% a cepa CA 7051. Nota-se que, em comparação com o polímero ChDDBSV46, seu derivado ChDDV46 não foi tão eficiente, indicando que a base de Schiff também apresenta atividade de inibição dos fungos mais pronunciáveis que a sua forma reduzida.

Figura 35: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de isolados clínicos de *Candida tropicalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Para a CT 7015 o derivado ChDDV46 apresentou inibição de cerca de 70% nas suas duas maiores concentrações. Por outro lado o derivado ChDV52 (com maior valor de massa molecular) não demonstrou resultados promissores nessa cepa. Destaca-se na cepa CT 7008 também o derivado ChDDV46 que apresentou sua melhor atividade na concentração de 0,25 g L⁻¹. Nessa cepa assim como na anterior, o derivado de alta massa molecular não inibiu significativamente em nenhuma das concentrações.

Tabela 9: Valores de CIM das cepas estudadas para os derivados de quitosana e vanilina

Cepa	CIM (g L ⁻¹)					
	ChCD	ChDDBSV46	ChCDV18	Vanilina	ChDDV46	ChDV52
<i>Candida albicans</i>						
<i>C. albicans</i> ATCC	0,75	0,75	-	-	-	-
CA 7051	0,75	1	-	1	-	-
<i>Candida tropicalis</i>						
CT 7015	*	*	*	*	0,75	-
CT 7008	*	*	*	*	0,25	-

* A CIM desses derivados não foram testadas com essas cepas

Elaborado pelo autor, 2020

Um estudo recente testou oligoquitosanas contra 52 cepas de *Candida* spp. avaliando-se os valores de CIM, e as concentrações ficaram entre 9,8 e 5000 µg mL⁻¹, valores dentro das concentrações determinadas no presente trabalho. (GANAN et al., 2019)

Silvia e colaboradores mostraram que a quitosana com baixa massa molecular (50 kDa), em uma concentração de 1.10⁴ mg L⁻¹ foi capaz de reduzir biofilme, biomassa e a atividade metabólica para espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* investigadas em valores até 90%. Esse estudo corrobora com os resultados obtidos principalmente para as cepas de isolados clínicos de *C. tropicalis* do presente projeto, visto que para essas cepas o derivado de baixa massa molecular apresentou resultados superiores comparado com o polímero de alta massa. (SILVA-DIAS et al., 2014)

Marin e colaboradores em um estudo realizado com filmes derivados de Vanilina-quitosana reportaram que seus polímeros tiveram uma boa atividade de inibição de crescimento da cepa de *C. albicans*. Nesse estudo também foi mencionado uma boa atividade antifúngica de soluções de quitosana de baixa massa molecular (32 – 38 kDa) (MARIN et al., 2013).

A capacidade antibacteriana de derivados de base de Schiff de quitosana também já foram relatados na literatura, as amostras eliminaram 98.8% das células vegetativas de *B.*

cereus o que culmina com os resultados obtidos do derivado ChDDBSV46 frente as espécies testadas de *C. albicans*. (G. E. KHACHATRYAN, 2018)

Sabe-se que as cepas da *C. albicans* são as mais resistentes dentro do gênero *Candida*, portanto, era esperado que os derivados apresentassem uma menor eficiência na atividade antimicrobiana frente a essa espécie, em contra partida esperava-se melhores resultados com as espécies não-*albicans*, visto que a resistência antifúngica dessas é menos persistente. (MILAN et al., 1998; REX et al., 1995; SINGH; TÓTH; GÁCSER, 2020; WILHEIM et al., 2009)

5.4.2 Teste da atividade antifúngica

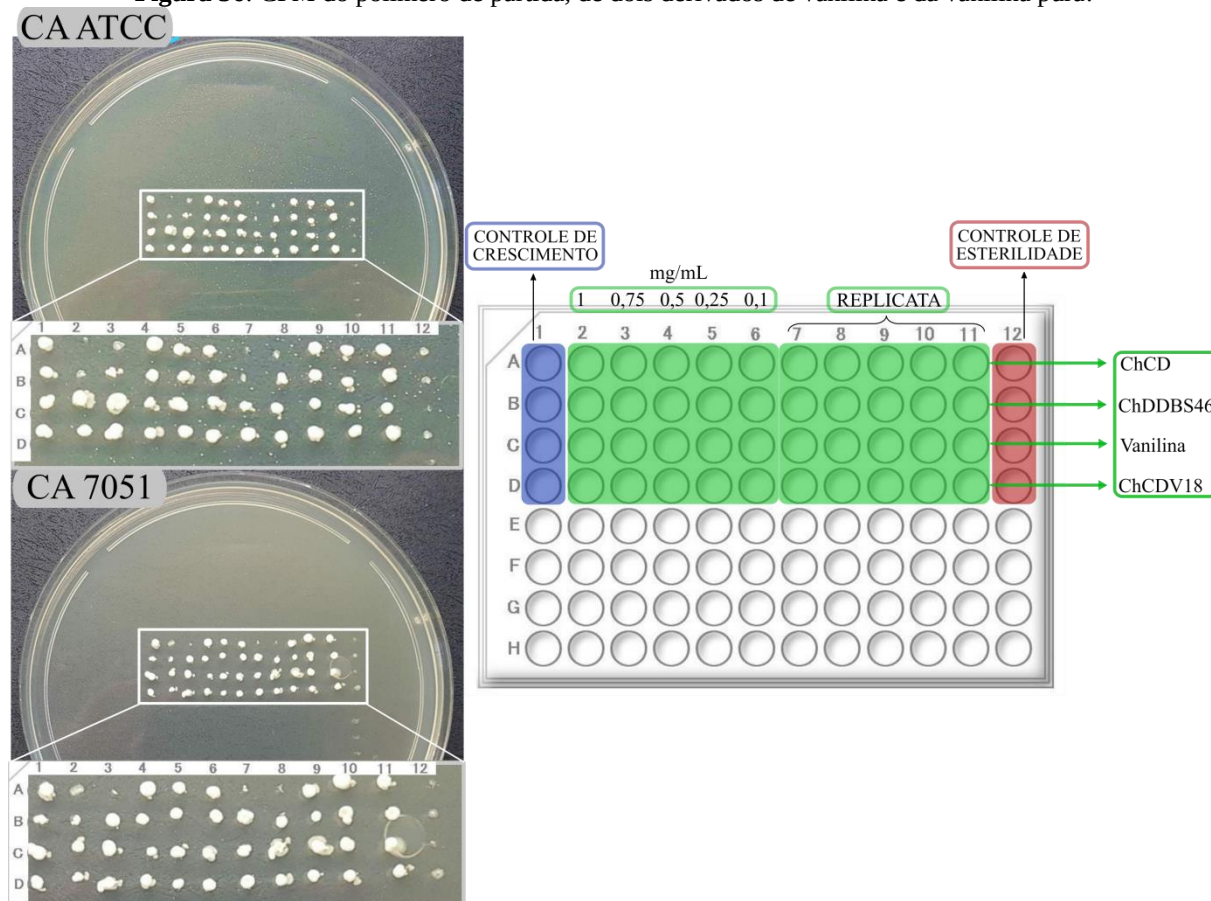
O teste da atividade antifúngica tem como objetivo avaliar se ocorre ou não o crescimento de colônias em placa de Ágar Sabouraud com os mesmos valores de CIM encontrados para os polímeros utilizados no item 5.4.1 (**Tabela 9**).

É possível constatar por meio desse teste se os derivados são fungicidas ou fungistáticos, pois ao transferir o conteúdo da placa de microdiluição para a placa de Ágar Sabouraud não há mais a ação fungistática dos polímeros nas cepas, já que não está mais presente na solução. Ou seja, se a ação nessa concentração for apenas fungistática a colônia da levedura tornará a se desenvolver, enquanto se a ação for fungicida não haverá crescimento de colônias. Dessa forma, é possível determinar a concentração fungicida mínima (CFM), que pode ser igual ou menor a CIM.

Após 24 horas de incubação foi possível observar nas placas de Ágar Sabouraud (Figuras 36-38) se houve crescimento de colônias no local onde se perfurou, segundo os mesmos layouts das placas de microdiluição.

Observaram-se, para todas as cepas, resultados muito similares aos encontrados na CIM, evidenciando que aqueles derivados que possuem ação fungistática, demonstraram a mesma CFM ou muito próxima. Vale salientar que para os polímeros que não possuem CIM também não apresentaram ação fungicida para nenhuma cepa.

Figura 36: CFM do polímero de partida, de dois derivados de vanilina e da vanilina pura.

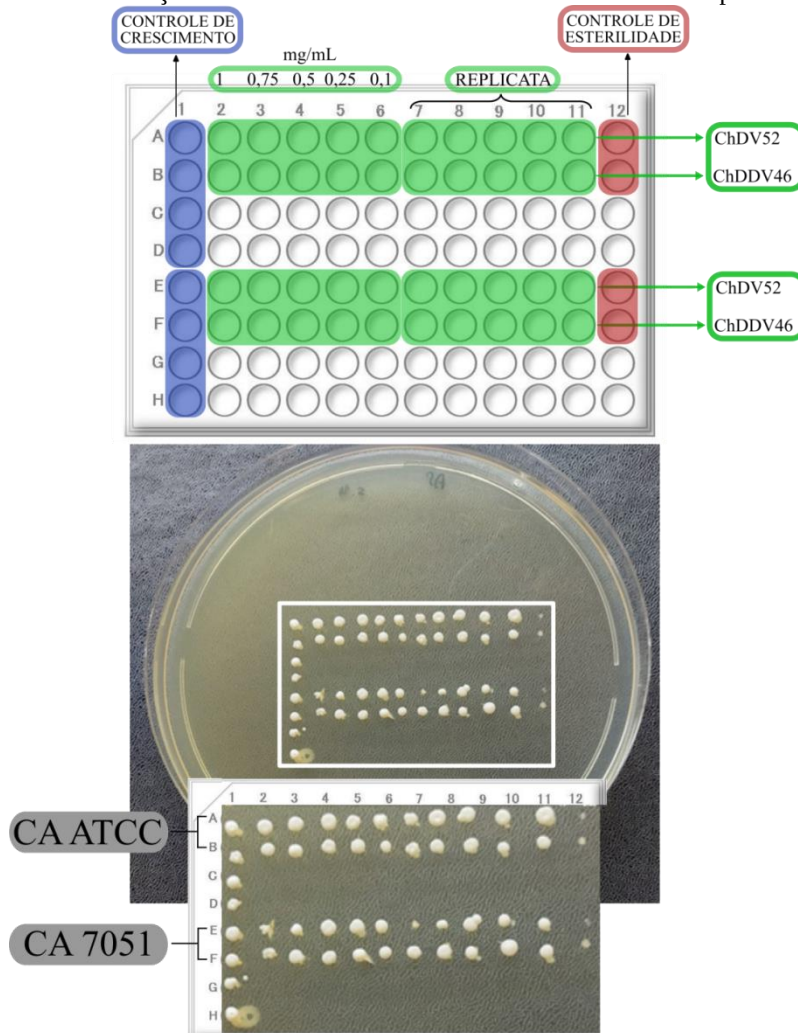


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Para essa primeira bateria de testes, os valores de CFM encontrados para ChCD foram iguais ou muito próximos aos valores de CIM e ChDDBS46 mostrou CFM de 1 g L^{-1} , um valor maior que a CIM encontrada para o mesmo derivado frente a cepa de CA ATCC, os demais não apresentaram CIM e por isso não seria possível que esses impedissem o desenvolvimento dos fungos nas placas de Ágar Sabouraud.

Os resultados obtidos na cepa de isolado clínico da *C. albicans* (CA 7051) demonstraram que o derivado ChDDBS46 que apresentou CIM de 1 g L^{-1} , não impediu o crescimento do fungo na mesma concentração. O polímero de partida ChCD comprovou sua ação fungicida no mesmo valor de CIM e a vanilina pura que inibiu o crescimento da cepa em sua maior concentração, assim como o derivado ChDDBS46 e os demais derivados também não apresentaram CFM.

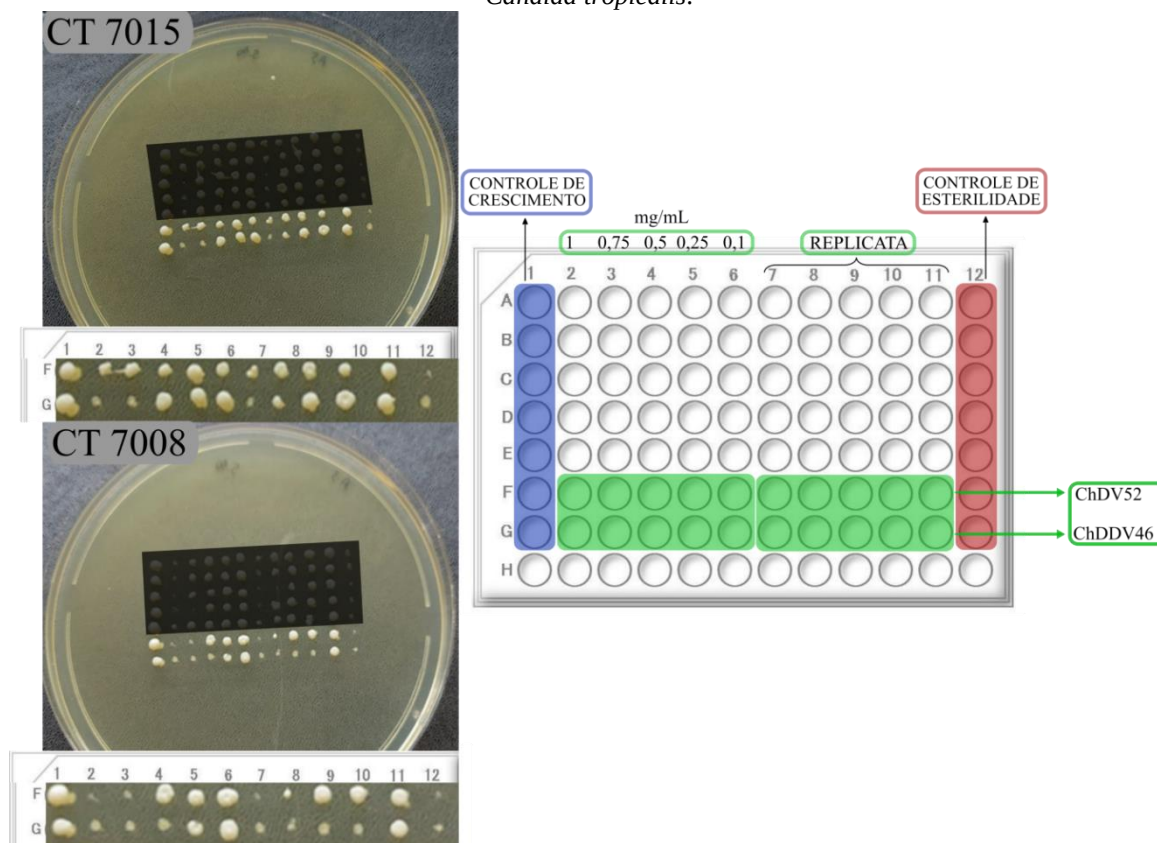
Figura 37: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de *Candida albicans*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Na segunda bateria de testes com os mesmo fungos, porém com os outros dois derivados de quitosana, não houve variação dos resultados esperados. Para ambos os polímeros que não apresentaram CIM, a concentração fungicida mínima não foi possível ser determinada.

Figura 38: Placa de microdiluição dos derivados ChDDV46 e ChDV52 frente as cepas de isolados clínicos de *Candida tropicalis*.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Nesse último ensaio realizado (Figura 38) com as cepas de isolados clínicos de *C. tropicalis*, os dois derivados apresentaram resultados de CFM semelhantes àqueles observados na CIM. Como o derivado ChDV52 não demonstrou inibição na cepa CT 7015, é inviável que haja CFM para esse polímero contra esse fungo, já o ChDDV46, por outro lado, apresentou atividade fungicida na mesma concentração da CIM ($0,75 \text{ g L}^{-1}$).

Para a última cepa de *C. tropicalis* (CT 7008) o derivado ChDDV46 apresentou CFM de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, uma concentração acima de sua CIM.

Todos os resultados estão resumidos na **Tabela 10** a seguir.

Tabela 10: Valores de CFM das cepas estudadas para os derivados de quitosana e vanilina

Cepa	CFM (g L ⁻¹)					
	ChCD	ChDDBSV46	ChCDV18	Vanilina	ChDDV46	ChDV52
<i>Candida albicans</i>						
<i>C. albicans</i> ATCC	0,75	1	-	-	-	-
CA 7051	0,75	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>						
CT 7015	*	*	*	*	0,75	-
CT 7008	*	*	*	*	0,5	0,75

Elaborado pelo autor, 2020

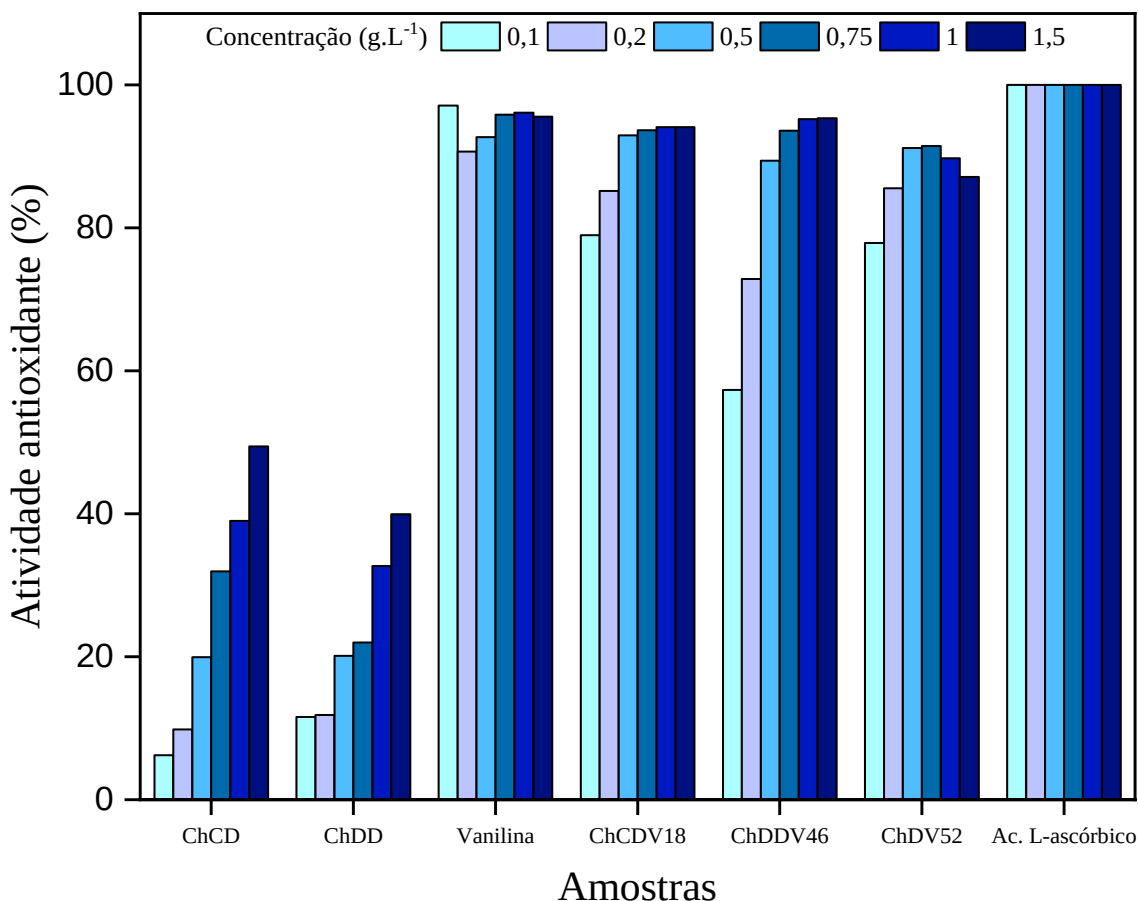
Dentre os principais antifúngicos disponíveis atualmente para o tratamento da *Candida* spp., os azóis são os mais utilizados, porém, essa classe de antifúngicos são fungistáticos, impedindo a produção de proteínas, replicação do DNA, modificações estruturais na parede celular, entre outros mecanismos. Portanto, ao considerar um tratamento tópico, é preferível que o antifúngico aplicado seja fungicida, infelizmente não há muitos fármacos com essa característica, o que destaca ainda mais a importância de se desenvolver novos agentes fungicidas, como os derivados ChCD, ChDDBS46, ChDDV46 e ChDV52 presentes neste projeto de pesquisa. (GANAN et al., 2019; MILAN et al., 1998)

5.5 Testes da atividade antioxidante dos derivados anfifílicos frente ao radical cátion ABTS^{•+}.

A atividade de eliminação de radicais livres é de suma importância, pois afetam negativamente o sistema biológico humano. Existem duas principais classes de radicais livres, os endógenos e os exógenos. O ABTS, um radical exógeno, origina-se de poluições químicas, fumaça de tabaco, resíduos de pesticidas, etc. desencadeando rapidamente reações dos radicais livres prejudiciais ao organismo. (PU et al., 2019)

Com o intuito de calcular a capacidade antioxidante total dos derivados frente ao radical cátion de ABTS, seguiu-se o procedimento descrito no item 4.5 e a equação 3. Os valores de absorbância obtidos estão apresentados na Figura 39.

Figura 39: Atividade de eliminação do radical livre ABTS^{•+} pelos polímeros de partida, os derivados anfífilos de quitosana e a vanilina. O ácido L-ascórbico foi utilizado como antioxidante referência, nas diferentes concentrações em 10 minutos de ação de cada composto frente ao radical.



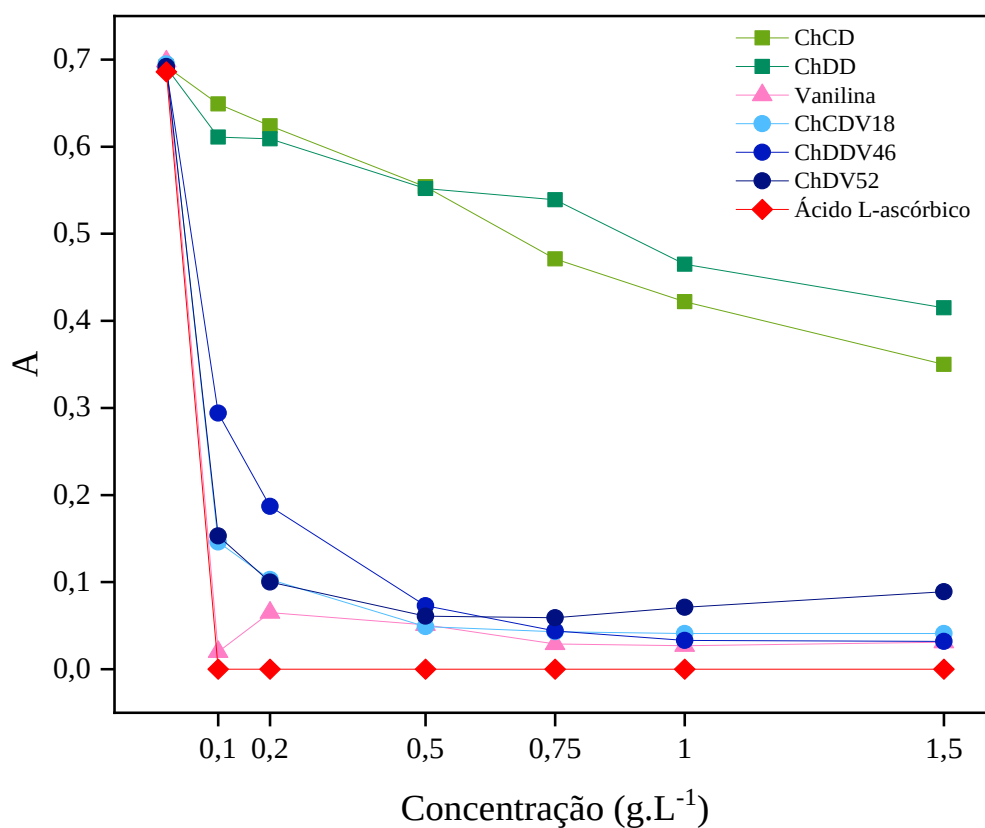
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

A partir dos resultados obtidos da atividade antioxidante dos compostos, em 10 minutos de ação, foi possível verificar o aumento significativo (acima de 40%) da eficácia dos derivados substituídos quando confrontados aos polímeros de partida. Ao se comparar as amostras ChCD (quitosana comercial degradada) e ChDD (quitosana desacetilada degradada) nota-se que o polímero com maior porcentagem de grupos NAG obteve um resultado ligeiramente superior, indicando que possivelmente a parte hidrofóbica do polímero possa estar envolvida no mecanismo da interação com o radical.

Comparando-se a atividade dos polímeros de partida e da vanilina pura, nota-se uma diferença significativa na eficácia da eliminação do ABTS^{•+}. Portanto, o aumento abrupto da ação dos derivados substituídos com vanilina (ChCDV18, ChDDV46 e ChDV52) se deve muito possivelmente ao mecanismo de ação da sua porção na cadeia polimérica.

O comportamento da atividade antioxidante com a variação da concentração se deu de forma crescente na média das amostras analisadas (Figura 40) como esperado, visto que quanto maior a concentração do composto, mais sítios ativos estão disponíveis para capturar os radicais livres em solução. Porém, com exceção do derivado ChDDV46 e dos de partida, os demais já apresentaram ótimos resultados da ação antioxidante mesmo nas menores concentrações testadas.

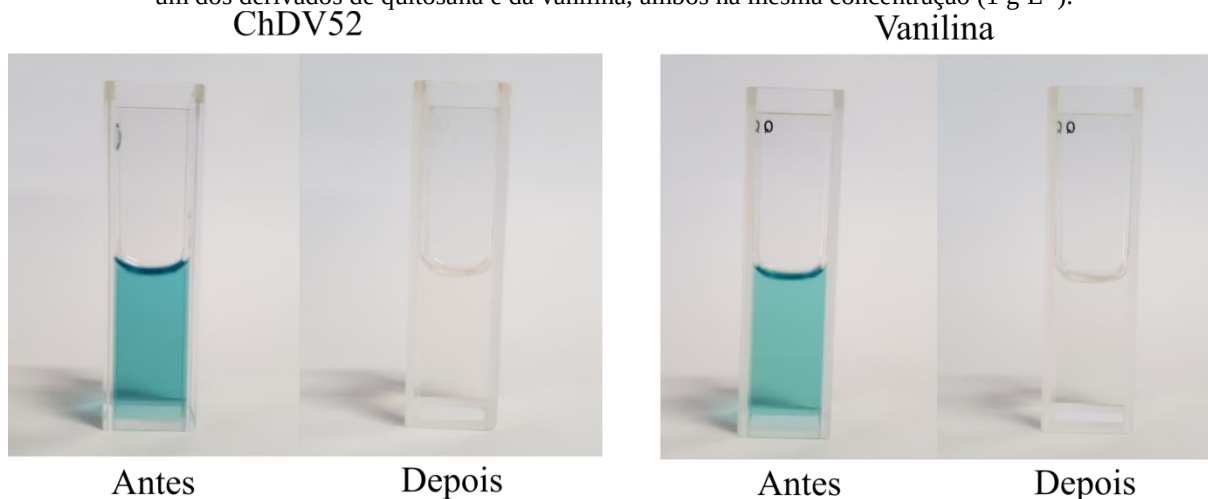
Figura 40: Perfil da atividade antioxidante (em 10 minutos de ação) dos compostos testados nas diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Numa perspectiva geral, as atividades dos derivados mostraram-se próximas as do antioxidante de referência, indicando resultados promissores, o que torna esses polímeros candidatos promissores a agentes antioxidantes. A Figura 41 demonstra a possibilidade de visualização da atividade antioxidante ao se comparar a tonalidade inicial do radical e a sua diminuição visível quase que por completo da coloração após o período de 10 minutos de exposição, utilizando um dos derivados de quitosana e a vanilina.

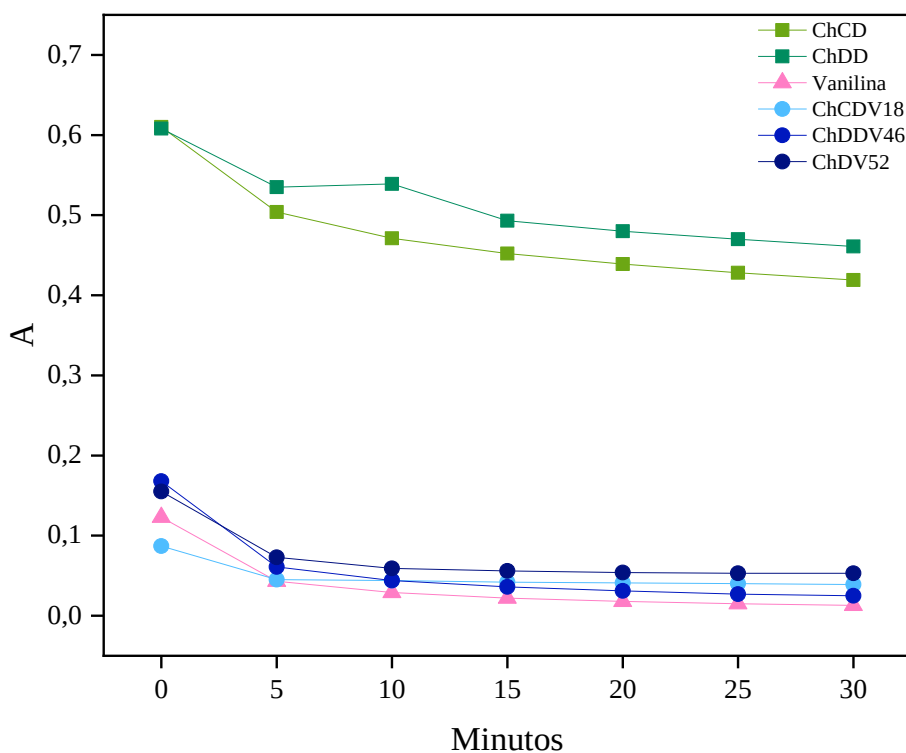
Figura 41: Cubetas contendo a solução do radical cátion de ABTS antes e depois da atividade antioxidante de um dos derivados de quitosana e da vanilina, ambos na mesma concentração (1 g L^{-1}).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Além dos testes realizados e os resultados apresentados com 10 minutos de ação dos compostos, o perfil da atividade antioxidante também foi analisado em 30 minutos (com intervalos de 5 minutos) na concentração intermediária ($0,75 \text{ g L}^{-1}$), com o intuito de avaliar se um tempo de contato maior era necessário. Os resultados estão presentes na Figura 42.

Figura 42: Decaimento da absorbância do radical ABTS^{++} por tempo da atividade antioxidante dos polímeros na concentração de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ por 30 minutos.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020

Os valores da absorbância de A_0 (controle) foram omitidos para uma maior clareza no gráfico assim como os do Ac. L- ascórbico, pois este já possui uma atividade de 100% na primeira concentração e tempo de medida (t_0).

Ao se analisar o decaimento da absorbância com o tempo, é possível notar que, naqueles compostos cuja atividade de eliminação do radical foi mais efetiva (derivados de Vanilina-quitosana e a vanilina pura) o valor tende a se estabilizar a partir dos 10 minutos de interação do radical com o antioxidante. Nas duas amostras de quitosanas de partida, nota-se que a variação após os 10 minutos também é menor. A **Tabela 11** elucida as porcentagens de variação t_{10} - t_{30} de cada composto.

Tabela 11: Variação da absorbância de t_{10} e t_{30} das amostras analisadas

Amostra	Variação da absorbância (%) de t_{10} e t_{30}
ChCD	7,51
ChDD	11,28
Vanilina	2,29
ChCDV18	0,71
ChDDV46	2,75
ChDV52	0,86

Elaborado pelo autor, 2020

Os valores expostos comprovam a baixa variação das amostras, principalmente quando se trata dos derivados de Vanilina-quitosana, cujo maior variação não supera os 3% de absorbância de t_{10} a t_{30} , comprovando que o tempo estimado de 10 minutos é suficiente para avaliação da atividade antioxidante. Pu et al. (2019) constatou que a atividade de eliminação do radical cátion ABTS aumentou com o aumento da concentração da quitosana, assim como o grau de desacetilação e a massa molecular também são fatores que influenciaram na ação frente ao radical. Nesse mesmo estudo foi sugerido que os mecanismos de ação da quitosana dependem dos grupos amino livres ($-NH_2$) e dos hidrogênios provenientes dos grupos amino protonados ($-NH_3^+$). (PU et al., 2019)

No presente projeto pode-se constatar que a ação dos derivados deve principalmente aos mecanismos de ação da porção enxertada com vanilina dos polímeros, uma vez que essa

espécie apresentou resultados superiores na remoção dos radicais, comparado com as quitosanas de partida.

Santosh e colaboradores vincularam como principal fator da atividade antioxidante da vanilina o potencial de redução, ou seja, a baixa energia necessária para conversão da vanilina para sua forma oxidada. Também foi relatado que outros fatores que podem influenciar a atividade de eliminação dos radicais são as ligações de hidrogênio intermoleculares (do grupo fenólico da vanilina) com o meio reacional, e o impedimento estérico da hidroxila (-OH) por conta dos grupos adjacentes. (SANTOSH KUMAR; PRIYADARSINI; SAINIS, 2002)

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que as etapas de síntese e caracterização, foram concluídas com sucesso, e permitiram a obtenção de derivados com diferentes graus de substituição e massas moleculares.

A atividade antifúngica dos polímeros sintetizados foi analisada por meio dos ensaios de CIM e CFM. Destaca-se principalmente os resultados obtidos para os polímeros ChCD e ChDDBSV46 que apresentaram atividade fungicida nas concentrações 0,75 e 1 g L⁻¹, respectivamente, para a cepa de *C. albicans* ATCC, e os derivados de vanilina-quitosana, o ChDDV46 que eliminou os fungos das duas cepas de isolados clínicos de *C. tropicalis* (7008 e 7015) e o ChDV52 que demonstrou atividade antifúngica para o CT 7008 na segunda maior concentração testada. Os demais não apresentaram CIM em nenhuma das concentrações.

A citotoxicidade dos polímeros foi avaliada seguindo método colorimétrico com MTS com de fibroblastos NIH3/3T3, cujos resultados apresentaram uma baixa toxicidade para essas células, com a viabilidade celular acima de 70% para todos os polímeros analisados. O que indica que os derivados não apresentam toxicidade significativa.

Por fim, a atividade de eliminação do radical cátion de ABTS foi analisada com os mesmo derivados e todos apresentaram atividade acima de 80% em quase todas as concentrações. As quitosanas de partida, por outro lado, não apresentaram bons resultados, tendo como a melhor atividade representada na ChCD (1,5 g L⁻¹) que eliminou cerca de 50% dos radicais presentes na solução. Por outro lado, a vanilina demonstrou ser um ótimo antioxidante sendo o sinergismo dos mecanismos de ação desse fenol aromático com os polissacarídeos o fator principal da atividade antioxidante dos derivados.

Os resultados mostram que os derivados sintetizados são potenciais agentes fungistáticos e fungicidas, e outras variações estruturais podem ser ainda exploradas, para maximizar as atividades. Os derivados demonstraram potencial contra as espécies não-*albicans* e todos os derivados de vanilina-quitosana são bons agentes antioxidantes. Essas duas características combinadas em um só composto o torna um possível princípio ativo em um futuro tratamento de doenças tópicas causadas por diferentes espécies de fungos do gênero *Candida* e na prevenção dos problemas de saúde relacionados ao desequilíbrio dos radicais livres no organismo.

REFERÊNCIAS

- ABHERI DAS SARMA, A. R. M. AND 1A. K. G. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions : An Overview. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 3, p. 185–192, 2010.
- ADWAS, A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body Toxicological effects of Propoxur View project Anti-dyslipidemic and Antiatherogenic Effects of Some Natural Products View project. **Article in Journal of Biotechnology**, v. 6, n. I–2019, p. 43–47, 2019.
- ALUGOJU PHANIENDRA, D. B. J.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.
- AMIDI, M. et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59–82, 2010.
- ANITHA, A. et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 672–677, 2009.
- ANTONIOLLI, L. R. et al. Avaliação da vanilina como agente antimicrobiano em abacaxi “Pérola” minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 473–477, 2006.
- ARYA, S. S. et al. Vanillin: a review on the therapeutic prospects of a popular flavouring molecule. **Advances in Traditional Medicine**, p. 17, 2021.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. **Food Bioscience**, v. 16, p. 17–25, 2016.
- CAVA-RODA, R. M. et al. Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2120–2131, 2012.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Candida Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.
- CHENIA, H. Y. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde, vanillin and kigelia africana fruit extracts against fish-associated chryseobacterium and myroides spp. Isolates. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, n. 3, p. 55–67, 2015.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599–607, 2003.
- COWEN, L. E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 7, p. 1–22, 2015.

- DE ASSIS, C. F. et al. Chitooligosaccharides antagonize the cytotoxic effect of glucosamine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1097–1105, 2012.
- DE OLIVEIRA PEDRO, R. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 50–55, 2013.
- DE OLIVEIRA TIERA, V. A.; WINNIK, F. M.; TIERA, M. J. Interaction of amphiphilic derivatives of chitosan with DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 100, n. 1, p. 309–313, 2010.
- DE PAULA PANSANI OLIVEIRA, F. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: Composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, n. 5, 2013.
- DESBRIÈRES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, n. 1, p. 21–28, 1996.
- DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 52, n. OCT, p. 794–804, 2004.
- DIAS, A. M. et al. Insights on the antifungal activity of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus flavus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, n. May, p. 433–444, 2018.
- DOMÍNGUEZ, J. M. et al. Sordarins: A new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2274–2278, 1998.
- FELICE, F. et al. Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: A comparative study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 76, p. 236–241, 2015.
- FENG, T. et al. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 126–132, 2008.
- G. E. KHACHATRYAN, N. I. M. AND V. B. G. Antibacterial Properties of New Chitosan-Based Schiff Bases. **International Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 7, p. 1187–1192, 2018.
- GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. D. O. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5725–5731, 2015.
- GANAN, M. et al. Antifungal activity of well-defined chito-oligosaccharide preparations against medically relevant yeasts. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2019.
- GARCÍA-RÍOS, E. et al. Improved antimicrobial activity of immobilised essential oil components against representative spoilage wine microorganisms. **Food Control**, v. 94, n. July, p. 177–186, 2018.

GARCIA-RUBIO, R. et al. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–13, 2020.

GARCIA, L. G. S. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against Candida spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, n. April, p. 662–669, 2018.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. et al. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 541–547, 2008.

HOSSEINI, B.; SAEDISOMEOLIA, A.; ALLMAN-FARINELLI, M. Association Between Antioxidant Intake/Status and Obesity: a Systematic Review of Observational Studies. **Biological Trace Element Research**, v. 175, n. 2, p. 287–297, 2017.

HUANG, M. et al. Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 3, p. 391–406, 2005.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344–353, 2004.

HUANG, R.; MENDIS, E.; KIM, S. K. Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n. 1–2, p. 120–127, 2005.

JAYAKUMAR, R. et al. Novel Chitin and Chitosan Materials in Wound Dressing. **Biomedical Engineering, Trends in Materials Science**, 2012.

JUNIOR, E. N. D. O. Fungal Growth Control by Chitosan and Derivatives. **Intech Open**, v. i, p. 13, 2016.

KARUPPAYIL, J. S. R. R. B. S. S. M. **Inhibition of Candida albicans growth and morphogenesis reveals potential antifungal activity of vanillin**. Nanded: 2012

KEWAUNEE, D. E.; ALLEN, G. ORAL Candida spp. COLONIZATION IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUSINFECTED INDIVIDUALS. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, 2007.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KORMA, S. A. et al. Production, Classification, Properties and Application of Chitosan. **International Journal of Research in Agricultural Sciences**, v. 3, n. 3, p. 2348–3997, 2018.

KULIKOV, S. N. et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some Candida species and clinical isolates of Candida albicans: Molecular weight-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 169–178, 2014.

LEITE, R. DE F. **Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite bovina**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

- LEMKE, T. L. et al. **Foye's principles of medicinal chemistry: Seventh edition**. [s.l: s.n.].
- LI, Q. et al. Novel water soluble chitosan derivatives with 1,2,3-Triazolium and their free radical-scavenging activity. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 1–13, 2018.
- LIEN AI PHAM-HUY, HUA HE, C. P.-H. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International journal of Biomedical science**, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008.
- MAFFEI, C. M. L. Agentes Antifúngicos. **Quimioterapia antifúngica**, p. 5–8, 2002.
- MAKANJUOLA, O.; BONGOMIN, F.; FAYEMIWO, S. A. An update on the roles of non-albicans candida species in vulvovaginitis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, 2018.
- MARIN, L. et al. Antifungal vanillin-imino-chitosan biodynameric films. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 27, p. 3353–3358, 2013.
- MARTINEZ, R. An update on the use of antifungal agents. **Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 32, n. 5, p. 449–60, [s.d.].
- MATICA, A.; OSTAFE, V. Antifungal Properties of Chitosans. **West University of Timisoara**, v. 26, n. 1, p. 55–63, 2017.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.
- MILAN, E. P. et al. Azole resistance among oral Candida species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, n. 3, p. 211–216, 1998.
- MOHAMED, G. G.; SHARABY, C. M. Metal complexes of Schiff base derived from sulphametrole and o-vanilin. Synthesis, spectral, thermal characterization and biological activity. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 4–5, p. 949–958, 2007.
- MOREIRA, P. L.; BOAS, P. J. F. V.; FERREIRA, A. L. A. Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 60, n. 1, p. 75–83, 2014.
- MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; DE CASTRO, R. S. Antifungals in eye infections: Drugs and routes of administration. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 72, n. 2, p. 132–141, 2013.
- NGARMSAK, M. et al. Antimicrobial Activity of Vanillin against Spoilage Microorganisms in Stored Fresh-Cut Mangoes. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 7, p. 1724–1727, 2016.
- NOGUEIRA, J. H. C. et al. Ageratum conyzoides essential oil as aflatoxin suppressor of Aspergillus flavus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 55–60, 2010.
- NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

- ORHAN-YANIKAN, E. et al. Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. **Food Control**, v. 101, n. February, p. 29–38, 2019.
- PACHECO, S.; DAMASIO, F. **Vanilina: Origem, Propriedades e Produção**. [s.l: s.n.].
- PACHECO, S. M. V.; MORGADO, A. F.; JUNIOR, A. F. Biossíntese de vanilina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MIP 95001. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 1–9, 2013.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 17–22, 2004.
- PU, S. et al. An in vitro comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, n. September 2018, p. 161–172, 2019.
- REX, J. H. et al. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 906–909, 1995.
- ROMERO-CORTES, T. et al. Antifungal activity of vanilla juice and vanillin against *Alternaria alternata*. **CYTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 375–383, 2019.
- RUANO, P. et al. Emerging Pathogens of the *Candida* Species. **Intech**, n. tourism, p. 13, 2016.
- SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.
- SAIBABU, V. et al. Vanillin confers antifungal drug synergism in *Candida albicans* by impeding CaCdr2p driven efflux. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100921, 2020.
- SAJOMSANG, W. et al. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 263–269, 2012.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, 2002.
- SANTOSH KUMAR, S.; PRIYADARSINI, K. I.; SAINIS, K. B. Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. **Redox Report**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2002.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART1, p. 10–24, 2013.
- SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1–2, p. 139–148, 2008.

- SILVA-DIAS, A. et al. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 1, p. 25–33, 2014.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SINGH, D. K.; TÓTH, R.; GÁCSEI, A. Mechanisms of Pathogenic *Candida* Species to Evade the Host Complement Attack. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–9, 2020.
- SMITH, E. B. History of antifungals. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 776–778, 1990.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 2007.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- STORTI, L. R. et al. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the pediatric unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, state of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p. 225–231, 2012.
- SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 2011.
- SUN, T. et al. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 21, p. 5774–5776, 2008.
- TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, 2013.
- TAI, A. et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 2, p. 170–177, 2011.
- TAKAKI, M. ; DIAS, A. M. ; DOS SANTOS GABRIEL, J. S. ; DE OLIVEIRA PEDRO, RAFAEL ; SOUZA, R. H. F. V. ; TIERA, M. J. ; DE OLIVEIRA TIERA, V. A. **SYNTHESIS , CHARACTERIZATION AND STUDY OF AMPHIPHILIC QUATERNARY DERIVATIVES OF CHITOSAN : IN VITRO STUDY AGAINST *Aspergillus flavus*. ADVANCES IN CHITIN SCIENCE VOLUME XIV PROCEEDINGS. Anais...2014**
- VERLEE, A.; MINCKE, S.; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 268–283, 2017.
- VIEGAS DE SOUZA, R. H. F. et al. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 4, p. 4437–4450, 15 abr. 2013.

WALSH, T. J. Invasive Fungal Infections: Problems and Challenges for Developing New Antifungal Compounds. **Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy**, v. 032, p. 349–373, 2011.

WHO. **WHO Antimicrobial resistance** *The Canadian Veterinary Journal*, 2014.

WILHEIM, A. B. et al. The resistance to fluconazole in patients with esophageal candidiasis. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 1, p. 32–37, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global action plan on antimicrobial resistance. **WHO Press**, p. 1–28, 2015.

YADAV, R.; SAINI, D.; YADAV, D. Synthesis and evaluation of vanillin derivatives as antimicrobial agents. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 57–62, 2018.

YAMAUCHI, R. Vitamin E: Mechanism of Its Antioxidant Activity. **Food Science and Technology International, Tokyo**, v. 3, n. 4, p. 301–309, 1997.

YANEVA, Z. et al. The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 34, n. 1, p. 221–237, 2020.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 176–186, mar. 2001.