



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

AMANDA MANCHINI DIAS

**“DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS: ESTUDO DA ATIVIDADE E
MECANISMO DE AÇÃO”**

São José do Rio Preto - SP

2017

AMANDA MANCHINI DIAS

**“DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS: ESTUDO DA ATIVIDADE E
MECANISMO DE AÇÃO”**

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

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

São José do Rio Preto - SP

2017

Dias, Amanda Manchini.

Derivados anfílicos de quitosana como agentes antimicrobianos : estudo da atividade e mecanismo de ação / Amanda Manchini Dias. -- São José do Rio Preto, 2017

84 f. : il., tabs.

Orientador: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

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

1. Química orgânica. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Quitosana. 4. *Aspergillus flavus*. 5. Aflatoxina. I. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 547

AMANDA MANCHINI DIAS

**“DERIVADOS ANFIFÍLICOS DE QUITOSANA COMO
AGENTES ANTIMICROBIANOS: ESTUDO DA ATIVIDADE E
MECANISMO DE AÇÃO”**

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

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

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vera Ap. de Oliveira Tiera

UNESP/IBILCE– São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida

UNESP/FCFAR – Araraquara

Prof^a. Dr^a. Iêda Aparecida Pastre Fertoni

UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - SP

2017

Dedico esse trabalho ao meu avô, Ângelo Dantas Dias Filho (*in memoriam*), pelo amor incondicional e dedicação a família.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de seguir meus sonhos, por ter me guiado e protegido todos esses anos e ter se mostrado presente em todos os momentos me dando forças para seguir.

Aos meus pais, Carlos e Célia, que sempre me incentivaram, apoiaram e me ajudaram nessa caminhada, não me deixando desistir e acreditando no meu potencial. Agradeço também as minhas irmãs, Aline e Vitória, ao meu cunhado, Emerson, e aos meus avós, Eulina, Maria e Natal, por estarem ao meu lado sempre. É por vocês que eu tenho vontade de ser cada vez melhor.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera pelos 6 anos que trabalhamos juntas, por ter me ensinado muitas coisas e ter sido um exemplo de profissional que com certeza me espelharei.

Ao Prof. Dr. Márcio José Tiera, pela amizade, ajuda e discussões que contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho.

A Dr^a. Márcia Cabrera, a Danúbia e ao Vinícius por toda paciência, discussões e ajuda com os experimentos com modelos de membrana.

Ao Prof. Dr. Sebastião Taboga e a Prof^a. Dr^a Patricia Vilamaior pela colaboração na parte de microscopias, e ao Luiz e ao Alexandre do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálise pela ajuda no preparo das lâminas.

A Dr^a Aline Lima por toda amizade, ajuda, paciência, carinho, por cuidar de nós do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) com tanto amor e dedicação, você é muito especial, obrigada de coração.

Ao Dr. Maicon Petronio pela amizade, por cuidar de mim, pela paciência e toda colaboração esses anos todos, sem nossas discussões dos meus resultados eu certamente não estaria aqui hoje.

A Me. Anna Carolina Rodrigues, minha parceira de laboratório e minha querida amiga, muito obrigada por estar sempre ao meu lado me ajudando e incentivando e a Me. Mirelle Takaki que mesmo longe se faz presente e não mede esforços para me ajudar também.

Ao pessoal do LBN que deixaram meus dias mais felizes e os dias de trabalho mais leves, em especial gostaria de agradecer aos meus amigos maravilhosos Me. Grazi Martins, Hemelen, André e Fabiana que são pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer, muito obrigada pela ajuda de vocês.

Ao Felipe Martins pela amizade, por ouvir minhas reclamações e quase nunca reclamar, por me ajudar, aconselhar e por todo carinho esses anos todos de amizade.

Ao Vítor pelos melhores conselhos, os piores também, por sempre estar disponível para ajudar e principalmente por me tranquilizar quando me perco na minha bagunça.

A todos os meus amigos em especial a Cecília, a Noeli, o Pedro e a Mari Tanaka, por toda amizade, conselhos, ajudas, conversas e risadas que trouxeram paz e leveza ao meu caminho, que iluminaram meus dias e me deram forças.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química do IBILCE/ UNESP-SJRP.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te esforço e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.

Isaías 41:10

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese, caracterização e o estudo do mecanismo da atividade antimicrobiana de derivados anfifílicos de quitosana contra o fungo *Aspergillus flavus*. As quitosanas utilizadas nas sínteses foram obtidas pela desacetilação heterogênea de quitosana comercial. O derivado hidrofílico foi obtido pela reação de quitosana com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetil (DEAE). O grau de substituição (GS) de grupos DEAE inseridos na cadeia polimérica foi determinado utilizando-se as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIV), obtendo-se 40% de substituição (QD 40% DEAE). Em seguida, a quitosana-DEAE foi degradada com nitrito de sódio para obtenção de polímeros com diferentes massas moleculares (Mw). As massas moleculares foram determinadas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), e os valores obtidos foram 8 - 25 - 60 - 116 e 136 kDa respectivamente. Na sequência, as quitosanas de diferentes Mw foram alquiladas com dodecilaaldeído seguido pela redução com borohidreto de sódio, obtendo-se derivados com ~20% de conteúdo hidrofóbico caracterizados por RMN¹H e FTIV. O comportamento em solução dos derivados anfifílicos foi estudado utilizando Espectroscopia de Fluorescência, e os resultados mostraram que em baixas concentrações os derivados de quitosana se auto-associam formando domínios hidrofóbicos. A agregação ocorre a partir da concentração de agregação crítica (CAC) que depende da massa molecular e do grau de substituição dos grupos hidrofóbicos presentes na estrutura polimérica. Os resultados dos ensaios microbiológicos mostram uma maior inibição do crescimento fúngico para os derivados de menor massa molecular (25 e 8 kDa) que pode estar relacionada a uma melhor interação entre o polímero e a membrana e/ou parede celular do *A. flavus*. Para investigar o mecanismo de interação da macromolécula com o fungo, realizou-se o estudo da interação dos diferentes polímeros anfifílicos com membranas modelo preparadas com os fosfolipídios L- α -fosfatidilcolina e L- α -fosfatidil-DL-glicerol, utilizando-se medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta. Os resultados obtidos permitiram postular um modelo baseado na força de interação polímero-lipossoma, que depende principalmente da massa molecular e da carga superficial da vesícula. Para as vesículas zwitteriônicas a interação com a bicamada depende mais criticamente da massa molecular, visto que nos derivados anfifílicos de 8 e 25 kDa a interação polímero-lipossoma levou a formação de vesículas estabilizadas, ou seja revestidas por uma camada de quitosana que se deposita na superfície vesicular de forma

gradativa, sem a formação de agregados. Para os derivados de maiores M_w (136, 116 e 60 kDa) as interações são mais intensas provocando a formação de agregados de vesículas em concentrações muito baixas ($> 0,1 \text{ g L}^{-1}$), porém o aumento abrupto do potencial zeta leva a desagregação das partículas originando lipossomas de $\sim 300 \text{ nm}$ de diâmetro. As imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão mostraram que o polímero atua na desestruturação da parede celular, pela associação com os polissacarídeos e proteínas da parede. Correlacionando-se as imagens obtidas pela microscopia confocal com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, pode se afirmar que a maior interação observada entre o polímero e os conídios se deve pela presença de maior concentração de proteínas hidrofóbicas na superfície dos mesmos, potencializando as interações entre o polímero e os constituintes da parede celular.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*, aflatoxinas, atividade antifúngica, degradação da quitosana, modelos de membrana.

ABSTRACT

This study describes the synthesis, characterization and the study of mechanism and antimicrobial activity of chitosan derivatives against the fungus *Aspergillus flavus*. Chitosan was obtained by the heterogeneous deacetylation of commercial chitosan. The hydrophilic derivative was obtained by reaction of chitosan with 2-chloro-N, N-diethylaminoethyl (DEAE) chloride. The degree of substitution (GS) of DEAE groups was determined using the techniques of Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (NMR^1H) and Absorption Spectroscopy in the Infrared region (FTIR), obtaining 40% of substitution. Afterwards, samples of the obtained derivative were degraded with sodium nitrite to obtain polymers with different molecular weights (Mw). Molecular weights were determined by Gel Permeation Chromatography (GPC), and the obtained values were 8 - 25 - 60 - 116 and 136 kDa respectively. Subsequently, chitosans with different molecular masses were alkylated with dodecyl aldehyde followed by reduction with sodium borohydride to provide ~ 20% hydrophobic content that was characterized by NMR^1H . The solution behavior of the amphiphilic derivatives was studied using Fluorescence Spectroscopy, and the results showed that at low concentrations, chitosan derivatives form self-assembled particles with hydrophobic domains. Derivatives self-aggregate at the critical aggregation concentrations (CAC), which were shown to be dependent on the molecular mass and degree of substitution by hydrophobic groups present in the polymeric structure. The results of the microbiological assays showed a greater inhibition for derivatives having low molecular weights which may be related to a better interaction between the polymer chain and the cell wall and cell membrane of the *A. flavus*, which can also be associated to the smaller size of the chain polymer of such derivatives. To investigate the mechanism of interaction of the macromolecule with the fungus, the study of the different amphiphilic polymers with model membranes prepared with the phospholipids L-alpha-phosphatidylcholine and L-alpha-phosphatidyl-DL-glycerol was carried out using measurements of Dynamic Light Scattering (DLS) and zeta potential. The results allowed to postulate an interaction model based on the strength of interaction, which depends mainly of the molecular weight and the surface charge of the vesicle. For the zwitterionic vesicles the interaction with the surface depends more critically on the molecular mass, for the amphiphiles of low Mw (Mw 25 and 8 kDa) the interaction leads to the formation of aggregates of vesicles. For the derivatives with higher Mw the interactions are stronger and the abrupt increase of the zeta potential leads to the

disintegration of the aggregates. The images obtained by Transmission Electron Microscopy showed that the polymer acts in the disassembly of the cell wall by the association with its constituents. By the correlation of the images obtained by the confocal microscopy, it can be affirmed that the greater interaction observed with the conidia is due to the presence of a greater concentration of hydrophobic proteins in their surface, strengthening the interactions between the polymer and the constituents of the cell wall.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxins, antifungal activity, degradation of chitosan, membrane models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização do <i>A. flavus</i> . A: Esquematização do ciclo de crescimento de fungo filamentosos. B: Colônia de <i>A. flavus</i> cultivada em meio de cultura (BDA) a 25 °C por 7 dias.....	20
Figura 2: Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana.	22
Figura 3: Esquema de possíveis modificações estruturais na quitosana.	23
Figura 4: (a) Estrutura química dos polímeros. (b) Efeitos das diferentes hidrofobicidades dos polímeros: Índice de inibição dos derivados DEAE-CH-Dody (1,0 g L ⁻¹) no crescimento micelial do <i>A. flavus</i>	25
Figura 5: Estrutura do polímero Pullulan.....	32
Figura 6: Câmara de Neubauer.	34
Figura 7: Mecanismo da reação de desacetilação da quitosana comercial.	39
Figura 8: Espectros de RMN ¹ H da quitosana comercial e desacetilada.....	40
Figura 9: Mecanismo da reação de substituição com DEAE.....	41
Figura 10: Espectro de RMN ¹ H do derivado hidrofílico de quitosana.	42
Figura 11: Mecanismo da reação de degradação da cadeia polimérica da quitosana.	43
Figura 12: Cromatogramas dos polímeros, comparação com a quitosana desacetilada e curva de calibração com padrão pullulan.....	45
Figura 13: Mecanismo da reação de alquilação dos derivados de quitosana-DEAE.....	46
Figura 14: Espectros de RMN ¹ H dos derivados de quitosana-DEAE alquilados de diferentes massas moleculares.	48
Figura 15: Espectros de infravermelho para a série de polímeros, comparação com a quitosana comercial e desacetilada. Os espectros de 136, 116, 60, 25 e 8 kDa referem-se aos derivados anfífilicos de quitosana-DEAE-dodecil.....	50
Figura 16: Gráficos da CAC dos derivados de quitosana.	52
Figura 17: Comparação entre o tamanho das colônias na ausência e presença dos derivados de quitosana na concentração de 1,0 g L ⁻¹	54
Figura 18: Índices de inibição do crescimento fúngico em função da concentração dos polímeros, em porcentagem, dos diferentes derivados de quitosana.	55

Figura 19: Estruturas A: L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol (PG); B: L- α -Fosfatidilcolina (PC).....	56
Figura 20: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana desacetilada.....	57
Figura 21: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana desacetilada.....	57
Figura 22: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana com 40% de grupos DEAE.....	59
Figura 23: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC: PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana com 40% de grupos DEAE.....	59
Figura 24: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 136 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	60
Figura 25: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC: PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 136 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	61
Figura 26: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 116 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	61
Figura 27: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 116 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	62
Figura 28: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 60 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	62
Figura 29: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 60 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	63
Figura 30: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 25 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	64
Figura 31: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 25 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.	64

Figura 32: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 8 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 20% de grupos DODECILA .	65
Figura 33: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de quitosana de Mw de 8 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 20% de grupos DODECILA.	65
Figura 34: Esquema do mecanismo de interação polímero quitosana em concentrações crescentes do polieletrólito. A: interação vesículas zwiteriônicas - polímero. B: interação vesículas aniônica - polímero.	66
Figura 35: Esquema geral do mecanismo do experimento de indução do vazamento do conteúdo fluorescente. Sendo A: controle negativo (branco), B: após a adição da solução de polímero (Q 40%DEAE 20%DOD 1 g L ⁻¹) e C: controle positivo (Triton X-100).	68
Figura 36: Gráfico da relação entre as intensidades de fluorescência da dispersão das vesículas de PC:PG nas diferentes concentrações de quitosana Mw de 136 substituída com 40 % de grupos DEAE e 20 % de grupos DODECILA.	69
Figura 37: Gráfico da relação entre as intensidades de fluorescência da dispersão das vesículas de PC:PG nas diferentes concentrações de quitosana Mw de 8 kDa substituída com 40 % de grupos DEAE e 20 % de grupos DODECILA.	69
Figura 38: Estrutura da quitosana substituída com rodamina B.	71
Figura 39: Imagens da microscopia do fungo nos diferentes meios. A: Controle (ausência de polímero); B: Q 40% DEAE; C: Q 40% DEAE 19% DOD 136 kDa e D: Q 40% DEAE 20% DOD 8 kDa.	72
Figura 40: Representação da estruturação dos constituintes da parede celular do A. flavus conídio e hifa.	74
Figura 41: Imagens obtidas de Microscopia Eletrônica 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.	75
Figura 42: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das hifas do fungo A. flavus onde E e F são hifas crescidas na presença de Q 40% DEAE 19% DOD Mw 136 kDa e G e H na presença de Q 40% DEAE 20% DOD Mw 8 kDa.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados.	28
Tabela 2: Relação massa de nitrito de sódio – Mw obtida.....	44
Tabela 3: Porcentagens de substituição de dodecila nos diferentes derivados de quitosana e estrutura final obtida.	47
Tabela 4: Valores de CAC dos derivados de quitosana.	53
Tabela 5: Porcentagens de substituição de dodecila nos diferentes derivados de quitosana e estrutura final obtida.	70

LISTA DE ABREVIATURAS

QD= Quitosana Desacetilada

QC= Quitosana comercial

DEAE= Dietilaminoetil

Dod= Dodecila

M_w= Massa molecular

kDa= Quilodalton

CPG= Cromatografia de permeação em gel

CAC= Concentração de agregação crítica

CBMAI= Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria

BDA= Batata dextrose ágar

GD= Grau de desacetilação

GS= Grau de substituição de grupos DEAE

GS dod= Grau de substituição de grupos dodecila

QD 40 DEAE= Quitosana substituída com 40% de grupos DEAE

QD **40%** DEAE 19 DD **W** kDa= Quitosana substituída com 40% de grupos DEAE, 19% de grupos DODECIL e W de massa molecular sendo W= 8, 25, 60, 116 ou 136 kDa.

QDD= Quitosana degradada

FI= Força iônica

PC= L- α -Fosfatidilcolina

PG= L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol

DLS= Espalhamento de Luz Dinâmica

TEM= Microscopia Eletrônica de Transmissão

RMN¹H= Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

FTIV= Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Aspergillus flavus</i>	19
1.2 Quitosana.....	21
1.2.1 Antimicrobianos a base de quitosana	22
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Lista de reagentes	28
3.2 Desacetilação da quitosana comercial	29
3.3 Síntese do derivado hidrofílico de quitosana	29
3.4 Degradação controlada da cadeia polimérica.....	29
3.5 Alquilação dos derivados de quitosana hidrofílicos de diferentes massas moleculares	30
3.6 Caracterização dos derivados de quitosana.....	30
3.6.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN¹H.....	30
3.6.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV).....	31
3.6.3 Cromatografia de permeação em gel (CPG).....	31
3.6.4 Espectrofotometria de fluorescência molecular	32
3.7 Ensaio microbiológicos com <i>Aspergillus flavus</i>.....	33
3.7.1 <i>Aspergillus flavus</i>.....	33
3.7.2 Preparo das soluções de quitosana e do controle	33
3.7.3 Preparo da suspensão de esporos	33
3.7.4 Preparo das soluções polímero-BDA	34
3.7.5 Índice de inibição em porcentagem	34
3.8 Estudos com modelos de membrana	35

3.8.1 Preparação das vesículas.....	35
3.8.2 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta	36
3.8.3 Experimentos de vazamento do conteúdo fluorescente	36
3.9 Investigação da ação do polímero por microscopia	36
3.9.1 Marcação dos derivados de quitosana com rodamina	36
3.9.2 Microscopia de Varredura confocal a laser	37
3.9.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Síntese e caracterização dos derivados de quitosana	38
4.1.1 Reação de desacetilação	38
4.1.2 Reação de substituição com DEAE	40
4.1.3 Degradação da cadeia polimérica e determinação da massa molecular Mw	42
4.1.4 Reação de alquilação	45
4.2 Caracterização dos derivados por FTIV	49
4.3 Determinação da concentração de agregação crítica.	51
4.4 Ensaios Microbiológicos.....	53
4.5 Estudos com modelos de membrana	56
4.5.1 Espalhamento de Luz Dinamico e Potencial Zeta	56
4.5.2 Indução de Vazamento do marcador fluorescente.....	67
4.6 Marcação dos Derivados com Rodamina e Determinação do grau de substituição.....	70
4.7 Microscopia Confocal a Laser.....	71
4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	73
5 CONCLUSÃO	77
6 REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios da agricultura mundial é aumentar a produtividade das lavouras sem afetar a segurança alimentar. Essas questões têm sido arduamente discutidas principalmente devido à divulgação dos resultados dos órgãos do sistema nacional de vigilância sanitária e de saúde coletiva que mostraram dados alarmantes sobre uso indiscriminado de agrotóxicos e/ou pesticidas, e suas conseqüências no meio ambiente. Segundo a legislação Brasileira, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

O crescimento da monocultura principalmente de soja, milho, sorgo e algodão é apontado como o grande responsável pelo Brasil ocupar a liderança mundial de consumo de agrotóxico, porém os riscos associados a esse excessivo consumo ainda não são totalmente conhecidos (DOSSIÊ ABRASCO, 2014). Segundo os resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos, desenvolvido pela ANVISA em 2011, 37% dos alimentos analisados encontravam-se livres de traços dos princípios ativos de agrotóxicos, 35% apresentou níveis considerados aceitáveis e 28% apresentou ingredientes ativos não autorizados ou acima do tolerado pela legislação brasileira (ANVISA a, 2011).

A invasão fúngica é um problema que afeta praticamente todas as culturas, sendo inevitável e influenciada por diversos fatores como a localização geográfica, as práticas agronômicas e a susceptibilidade do produto à invasão do fungo que geralmente ocorre na fase de produção podendo ser agravadas durante condições adversas de beneficiamento e armazenamento (ARAUJO, 2008). A atividade metabólica dos fungos geralmente é aumentada com o acréscimo da umidade e de temperatura em ambientes contaminados, promovendo a degradação de proteínas, carboidratos, fosfolipídios e outros compostos dos grãos, gerando como metabólitos secundários toxinas denominadas micotoxinas. (PEDRO et al., 2013). Entre os impactos da disseminação fúngica em sementes, destaca-se a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, odor desagradável, perda de matéria seca,

mudanças químicas e nutricionais com conseqüente perda da qualidade e do valor de mercado (NAIK; SHASHIKALA; KRISHNAMURTHY, 2008).

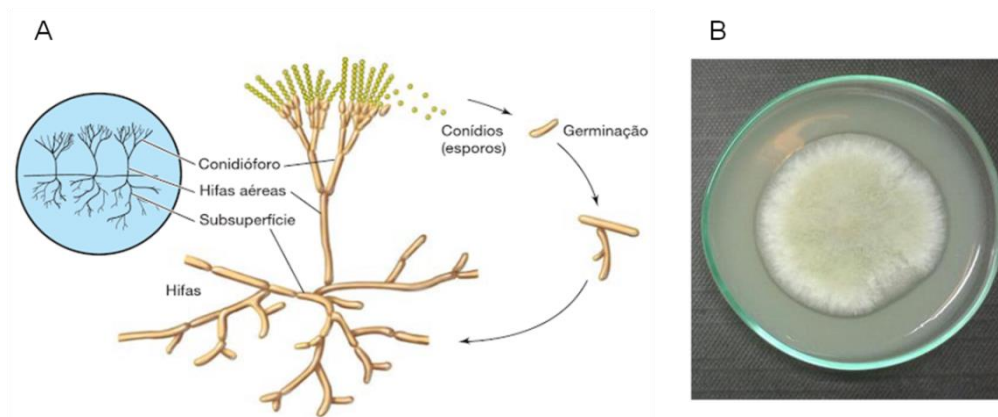
As micotoxinas são substâncias químicas, que conferem aos fungos uma vantagem competitiva sobre outros fungos e sobre bactérias presentes no ambiente, apresentando alta toxicidade a doses mínimas, tem seu controle respaldado pela Resolução RDC 07/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde foi estabelecido os limites máximos de concentração de algumas micotoxinas em 14 categorias de alimentos e em ração animal sendo seu descumprimento considerado uma infração sanitária (ANVISA b, 2011).

Diante dessa realidade, muitos pesquisadores tem buscado cada vez mais encontrar fungicidas de origem natural para inibir o desenvolvimento de fungos e consequentemente a produção de suas micotoxinas. Óleos essenciais, extratos vegetais, e biopolímeros como quitina e quitosana são exemplos de compostos, que possuem a vantagem de apresentarem baixa toxicidade, serem biodegradáveis, renováveis e facilmente obtidos da natureza (MI; JIANG, 2014, KENAWY et al., 2006).

1.1 *Aspergillus flavus*

O *Aspergillus flavus*, é um fungo multicelular pertencente a Divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família Trichomaceae (KIRK et al., 2008), caracterizado por apresentar uma rede de filamentos denominada hifas que são paredes celulares tubulares que envolvem a membrana citoplasmática e divide cada hifa em célula unitária (MICROBIOLOGIA DE BROCK, 2010). O *A. flavus* caracteriza-se por possuir colônias esverdeadas, figura 1, pela presença de conídios pigmentados. Desenvolve-se bem em substratos oleaginosos e justamente por isso é considerado um dos grandes contaminantes de grãos armazenados conseguindo sobreviver mesmo em condições adversas devido à produção de conídios, estruturas de reprodução assexuada que também são responsáveis pela fácil dispersão do fungo (CHANG; EHRLICH, 2010).

Figura 1: Caracterização do *A. flavus*. A: Esquematisação do ciclo de crescimento de fungo filamentososo. B: Colônia de *A. flavus* cultivada em meio de cultura (BDA) a 25 °C por 7 dias.



Fonte: A: MADIGAN et al., 2010; B: Acervo do autor.

Quando em substratos e em condições favoráveis como umidade do ar entre 80 e 90% e temperatura acima de 25 °C, a atividade metabólica do fungo é aumentada. Metabólitos secundários não são necessários para a sobrevivência do fungo, porém conferem a eles vantagens competitivas em relação a outros microrganismos. Um dos metabólitos secundários produzidos pelos *Aspergillus* são as aflatoxinas. As aflatoxinas são conhecidas por terem potente ação mutagênica, cancerígena, nefrotóxica, hepatotóxica e imunossupressora, sendo conhecidas aproximadamente 17 diferentes tipos, destacando-se a aflatoxina B1 (COUTINHO et al., 2012) considerada o agente natural mais carcinogênico que se conhece, tendo como principal fungo produtor o *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A intoxicação tanto humana como animal pode ocorrer diretamente pela ingestão de alimentos contaminados ou ainda indiretamente pelo consumo de leite, ovos e carne de animais alimentados com ração contaminada. O processamento térmico, principal forma de eliminação das colônias fúngicas nas indústrias, não afeta a concentração de aflatoxinas, dessa forma o controle da infestação é a melhor forma de prevenção (ARAUJO, 2008).

O consumo de fungicidas corresponde a 14% do mercado nacional de agrotóxicos comercializados (ANVISA; UFPR, 2012). Estes apresentam os mais variados mecanismos de ação, por exemplo, os ditiocarbamatos como o Mancozeb e o Tiram, atuam na inibição de proteínas, os Inibidores da Demetilação Sistêmicos (DMI's) como os Tiazóis e as Pirimidinas, desregulam a síntese de ergosterol, conseqüentemente afetando as membranas, porém, para

garantir a eficácia da desregulação total da célula, é muito comum a utilização de mais de um princípio ativo nas aplicações (EMBRAPA, 2010).

A periculosidade do uso desses produtos tanto para o ambiente quanto para o aplicador e indiretamente para o consumidor final é parcialmente conhecida. Eles são classificados como muito perigosos ao ambiente, contaminantes sistêmicos, acumulativos, carcinogênicos e teratogênicos e ainda, como consequência do seu uso indiscriminado, tem se isolado cepas de espécies cada vez mais resistentes (NOGUEIRA et al., 2010).

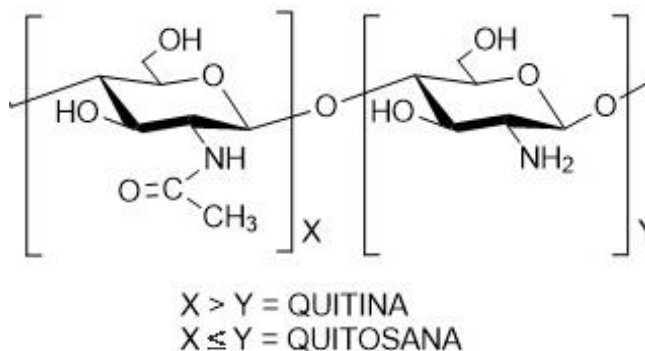
A busca por alternativas econômicas e ecologicamente atrativas tem movimentado muitas pesquisas pelo mundo. O fungicida considerado ideal é aquele que apresenta alta seletividade ao patógeno sem deixar resíduos tóxicos no produto final nem desencadeie desequilíbrio ecológico além de ser de fácil aplicação, estável e de segura manipulação ao aplicador.

A utilização de produtos que naturalmente apresentem propriedades antifúngicas tem sido alvo de muitos estudos principalmente pela possibilidade de substituição dos produtos atuais no tratamento e controle das contaminações por microrganismos, com a vantagem de possuírem naturais rotas de degradação e muitas vezes serem biocompatíveis. Nesse sentido destacamos a utilização do biopolímero quitosana.

1.2 Quitosana

A quitosana é um polímero de origem natural, derivado da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, encontrada como constituinte da parede celular de fungos, no exoesqueleto de crustáceos e carapaças de insetos (PEDRO et al., 2013). A quitina e a quitosana (Figura 2) são compostas por unidades 2-acetamida-2-deoxi-*D*-glicopirranose e 2-amina-2-deoxi-*D*-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) em porções variáveis, na qual a quitina é composta predominantemente por grupos acetamida enquanto que a quitosana possui predominantemente grupos amina (CAMPANA; SIGNINI, 2001).

Figura 2: Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana.



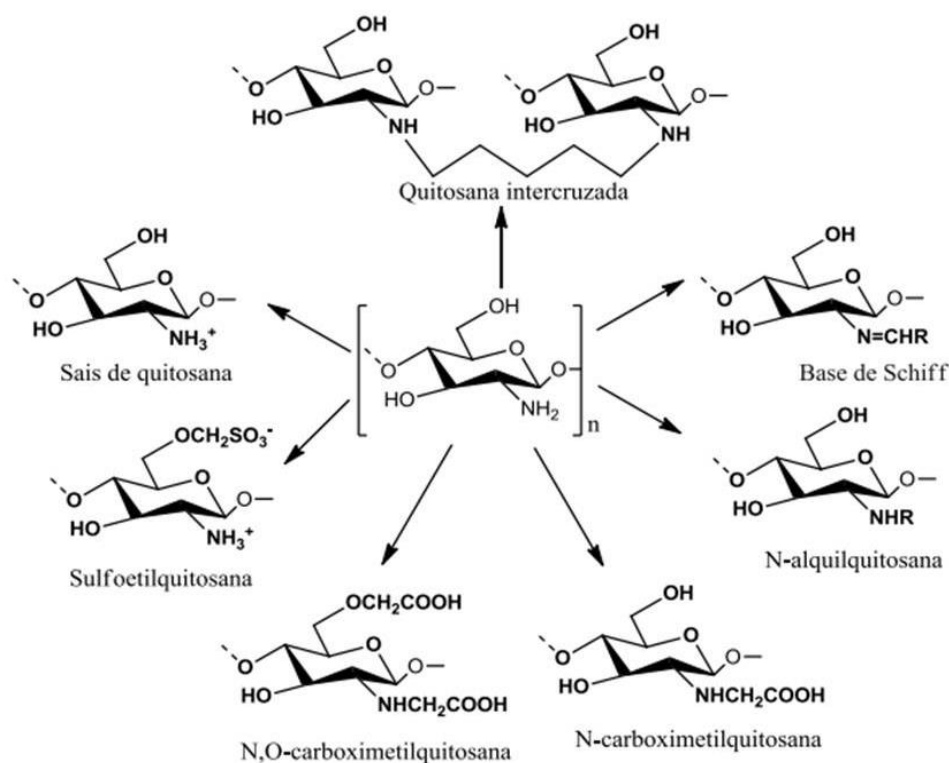
Fonte: Autoria própria.

1.2.1 Antimicrobianos a base de quitosana

A quitosana vem sendo estudada e aplicada nas mais diversas áreas por apresentar propriedades naturais atrativas à indústria, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade, bioadesividade, baixa toxicidade e potencial antimicrobiano (TAKAKI, 2015) apresentando atividade contra bactérias gram positivas e gram negativas, além de fungos filamentosos e leveduras (KONG et al., 2010). A baixa solubilidade do polímero em água e em meio neutro limita algumas aplicações, entretanto, a possibilidade de modificação em sua estrutura, sobretudo devido à presença dos grupos aminas no carbono C2 e hidroxilas nos carbonos C3 e C6 permitem contornar essas limitações (LIM; HUDSON, 2004).

A modificação da estrutura do polissacarídeo tem como objetivo a obtenção de biomateriais com propriedades específicas potencializadas. Como exemplo, podemos citar a conversão ou modificação da cadeia polimérica em reações de *N*-acetilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (Figura 3)

Figura 3: Esquema de possíveis modificações estruturais na quitosana.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2004.

Em 2007, Azevedo e colaboradores descreveram uma lista com as principais áreas de aplicação deste polímero: na agricultura (como defensivos e adubo para as plantas), no tratamento de água (como agente floculante, na remoção de íons metálicos e como agente redutor de odores), na indústria de cosméticos (como esfoliante, hidratante capilar e creme dental), na indústria farmacêutica e indústria biomédica (para a liberação controlada de drogas, encapsulamento de materiais, reconstituição óssea, implantes dentários, lentes de contato, entre outros) e na indústria alimentícia (como fibras dietéticas, agente redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida, bactericida e no recobrimento de frutas).

Na área de antimicrobianos, muitos fatores contribuem para a eficiência da quitosana e seus derivados contra bactérias, fungos e leveduras. De acordo com os estudos realizados por Kong e colaboradores (2010), esses fatores podem ser classificados em fatores microbiológicos, que incluem diferenças entre as espécies, constituintes da membrana, presença ou não de parede celular e estágio de desenvolvimento das células e fatores intrínsecos da quitosana como densidade de cargas positivas, massa molecular (Mw), concentração do polímero no meio, características hidrofílicas e hidrofóbicas, capacidade de

quelação, estado físico, solubilidade em água, cristalização e fatores físico-químicos como força iônica, pH e temperatura do meio.

A influência desses diferentes fatores na eficiência antimicrobiana da quitosana e seus derivados foi comprovada por diversos pesquisadores. Por exemplo, Kong e colaboradores (2008), mostraram que as propriedades antifúngicas da quitosana são maiores em pH mais baixos. Ignatova e colaboradores (2006) observaram que derivados de quitosana com grupos quaternários de amônio exibiram maior atividade antibacteriana quando comparados com a quitosana não modificada. Esses fatos mostram a importância da carga parcial obtida após a modificação na ação antimicrobiana (IGNATOVA et al., 2006). Porém diferentes grupos proporcionam diferentes propriedades ao polímero variando também a interação com os diferentes organismos.

Em contrapartida às modificações que conferem a quitosana um aumento da densidade de cargas positivas, a inserção de cadeias alifáticas tem mostrado excelentes resultados antimicrobianos inclusive em valores maiores de pH, sugerindo que a ação desses derivados também pode ser resultado da interação hidrofóbica dos substituintes com os lipídios de membrana (HUANG et al., 2004).

Vários trabalhos tem abordado a influencia da Massa molecular (Mw) da quitosana em suas propriedades antifúngicas (LI et al., 2011; SEYFARTH et al., 2008). Entretanto, os resultados encontrados na literatura são muitas vezes contraditórios. Seyfarth e colaboradores (2008) constataram que a atividade antifúngica do polímero contra espécies de *Candida ssp* decrescia com a diminuição da massa molecular, no entanto, Kulikov e colaboradores (2014) afirmaram que oligoquitosanas de Mw entre 2-20 kDa inibiram com eficiência o crescimento de *Candida albicans*. Todos esses resultados apontaram 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 com diferentes propriedades de membranas.

Resultados recentes obtidos em nosso grupo por Gabriel e colaboradores (2015), mostraram que derivados de quitosana substituídos com grupos dietilaminoetil (DEAE) e DODECIL (Dod) apresentaram elevados índices de inibição contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Os resultados deste trabalho mostraram uma forte dependência dos índices de inibição com o grau de modificação estrutural, concentração e massa molecular dos polímeros. A tendência observada para as quitosanas desacetiladas contra *A. flavus* foi um aumento da

A compreensão do mecanismo de ação dos derivados de quitosana na inibição do crescimento fúngico possibilita potencializar a ação de novos derivados modificados além de incrementar a seletividade e eficácia do polímero. Portanto, este trabalho teve como foco otimizar a composição do biofungicida quitosana para potencializar sua atividade antimicrobiana.

Para avaliar a importância da massa molecular do polímero na atividade antifúngica, buscou-se sintetizar derivados de quitosana com diferentes massas moleculares que apresentassem conteúdos constantes do substituinte hidrofílico DEAE (~40%) e hidrofóbico DODECIL (~20%). Além da síntese, o estudo foi direcionado à elucidação do mecanismo de ação utilizando membranas modelo, miméticas a membrana celular dos fungos, compostas por L- α -fosfatidilcolina (PC) e L- α -fosfatidilcolina/L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PC:PG) na proporção 80:20 (%) e pela utilização de Microscopia Confocal a Laser e Microscopia Eletrônica e de Transmissão.

2 OBJETIVO

Partindo-se de resultados preliminares, este trabalho propõe a avaliação do efeito da massa molecular de derivados terciários anfifílicos de quitosana na eficiência de inibição do crescimento, *in vitro*, do fungo *Aspergillus flavus* bem como, o estudo dos possíveis mecanismos de interação polímero-célula fúngica que resultam na ação antimicrobiana observada a partir da:

I. Síntese e caracterização de derivados anfifílicos de quitosana substituídos com 40% de grupos DEAE e 20% de grupos dodecil, de diferentes massas moleculares (de 8 a 140 kDa);

II. Comparação das eficiências antifúngicas dos derivados de diferentes massas moleculares sob o fungo *Aspergillus flavus*;

III. Estudo das interações físico-químicas dos polímeros sintetizados com membranas modelo;

IV. Utilização de Microscopia Confocal a laser e Microscopia Eletrônica de Transmissão para avaliar modificações estruturais e locais efetivos de ação dos polímeros nas células fúngicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lista de reagentes

Os reagentes utilizados estão listados na tabela 1. A água utilizada no preparo das soluções foi deionizada em um sistema purificador de água da Gehaka modelo DG.

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados.

Reagentes	Procedência
Acetato de sódio	Synth
Ácido Acético	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Cianoborohidreto de sódio	AldrichChemical Co
5- carboxifluoresceína	Sigma Aldrich
cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina	AldrichChemical Co
Cloreto de deutério	AldrichChemical Co
Cloreto de sódio	Dinamica
Clorofórmio	Sigma Aldrich
Dodecanal	Fluka
Etanol	Synth
Hidróxido de sódio	Synth
Isotiocianato de rodamina B	Sigma Aldrich
L- α -Fosfatidilcolina	Sigma Aldrich
L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol	Sigma Aldrich
Meio de cultura batata dextrose ágar (BDA)	Himedia
Na ₂ EDTA	Synth
Nitrito de Sódio	Synth
Óxido de deutério	AldrichChemical Co
Propanona	Synth
Quitosana comercial	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda
Tris (hidroximetil) amino metano	Vetec
Triton X-100	Sigma Aldrich
2- (4-amidinofenil) -1H-indole-6- carboxamidina (DAPI)	Sigma Aldrich

3.2 Desacetilação da quitosana comercial

A quitosana comercial (QC) foi desacetilada de acordo com o método descrito por Tiera e colaboradores (2006), assim, 16 g de quitosana comercial foram solubilizadas em 800 mL de uma solução de ácido acético 2% (v/v). Ver-teu-se 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio $23,5 \text{ mol L}^{-1}$ à solução de quitosana mantendo-se a mistura sob atmosfera de nitrogênio com agitação constante e temperatura de $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Após 90 minutos a mistura foi vertida em 3 litros de água deionizada a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado obtido após a decantação do material foi lavado, trocando-se 2 litros do sobrenadante por água deionizada, até o pH do meio aproximar-se da neutralidade, posteriormente, isolou-se o material por filtração a pressão reduzida. O processo de desacetilação foi repetido e o material, depois de isolado por filtração, foi recuperado por liofilização em um liofilizador modelo L101 da marca LIOTOP. Desacetilou-se um total de 32 g de quitosana comercial para a obtenção de uma massa mínima de 20 g de quitosana desacetilada.

3.3 Síntese do derivado hidrofílico de quitosana

A inserção do grupo hidrofílico no polissacarídeo foi feita pela reação da quitosana desacetilada (QD) com cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila (DEAE) (GABRIEL et al., 2015). Para aproximadamente 40% de substituição de grupos DEAE na cadeia polimérica 17 g de quitosana desacetilada foram solubilizadas em 550 mL de ácido clorídrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, aqueceu-se a solução à $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionou-se 8,7 g de cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietilaminoetila e ajustou-se o pH do meio para 8. Controlou-se o pH, temperatura e agitação por 2 horas, purificou-se a mistura obtida por diálise contra solução de hidróxido de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ por 1 dia e contra água deionizada por 5 dias. O produto foi recuperado por liofilização.

3.4 Degradação controlada da cadeia polimérica

Derivados de quitosana de diferentes massas moleculares (M_w) foram obtidos a partir da oxidação da cadeia polimérica em meio ácido utilizando-se nitrito de sódio (HUANG; KHOR; LIM, 2004). Degradou-se alíquotas da quitosana substituída com 40% de grupos DEAE (Q 40% DEAE) objetivando valores de M_w de aproximadamente 5, 20, 50 e 100 kDa.

Para a reação, massas de 3,3 g de Q 40% DEAE foram solubilizadas em 165 mL de ácido acético 6% (v/v). As massas de nitrito referente às diferentes Mw objetivadas foram solubilizadas em 10 mL de água deionizada e vertidas nas soluções de quitosana. Manteve-se sob agitação constante por 1 hora posteriormente interrompeu-se a reação elevando-se o pH o meio para 9 com a adição de solução de hidróxido de sódio 4 mol L⁻¹. O produto foi purificado por diálise contra água deionizada por 5 dias e recuperado por liofilização.

3.5 Alquilação dos derivados de quitosana hidrofílicos de diferentes massas moleculares

A alquilação da cadeia polimérica foi realizada em duas etapas, primeiramente a reação dos grupos amina da quitosana com dodecil aldeído com conseqüente formação da base de Schiff que foi posteriormente reduzida utilizando-se borohidreto de sódio, adaptando-se o método descrito por Gabriel (2013). Para a reação 3 g dos derivados de quitosana DEAE de diferentes massas moleculares, foram solubilizados em 160 mL de ácido acético (0,4 mol L⁻¹) em seguida adicionou-se 110 mL de etanol e ajustou-se o pH do meio para 5 adicionando alíquotas de solução de hidróxido de sódio 4 mol L⁻¹. Visando a substituição de aproximadamente 20 % de grupos dodecil na cadeia da quitosana verteu-se 0,7 mL de dodecil aldeído á mistura. Decorrido 1 hora de reação adicionou-se 4,9 g de borohidreto de sódio e manteve-se a suspensão sob agitação vigorosa por 12 horas. O produto foi purificado por diálise contra água deionizada por 10 dias e recuperado por liofilização.

3.6 Caracterização dos derivados de quitosana

3.6.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN¹H

As amostras analisadas por RMN¹H foram preparadas pela solubilização de aproximadamente 20 mg dos polímeros, previamente secos em estufa a pressão reduzida, em 700 µL de óxido de deutério com a adição de 10 µL de cloreto de deutério. Os espectros foram obtidos em Espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz á temperatura de 70 °C, do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE/UNESP São José do Rio Preto.

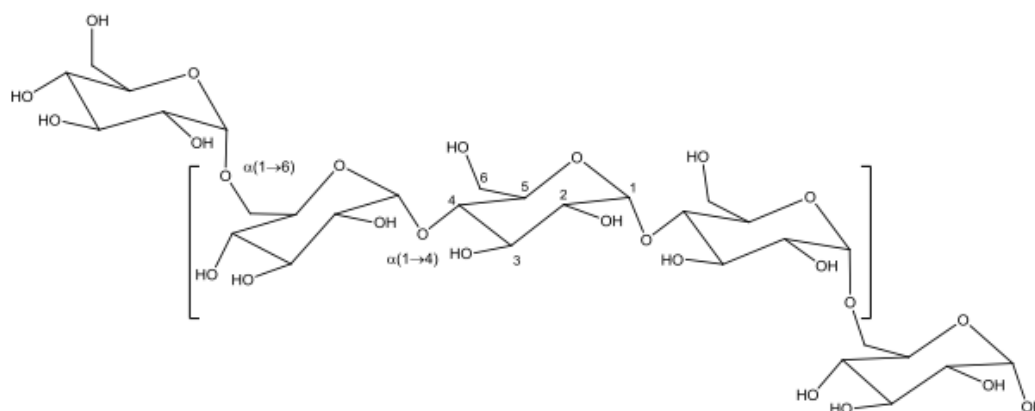
3.6.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV)

Os espectros de FTIV permitem caracterizar os polímeros pelo aparecimento de sinais típicos dos estiramentos entre as ligações dos grupos funcionais, assim, amostras sólidas dos derivados de quitosana foram analisadas em Espectrômetro de Infravermelho Médio com Transformada de Fourier, modelo Vertex 70, marca Bruker (Germany) com cristal de diamante como elemento interno de reflexão e utilizando-se medidas da Reflectância Total Atenuada fazendo-se 32 scans com resolução de 4 cm^{-1} realizadas no Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

3.6.3 Cromatografia de permeação em gel (CPG)

Na CPG as moléculas são separadas segundo suas massas ou volumes hidrodinâmicos. Este é responsável pela maior ou menor interação da amostra com a fase estacionária da coluna cromatográfica, sendo o tempo de eluição inversamente proporcional á massa molecular (SOUSA, 2007). Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu (LC-20), com detecção por índice de refração modelo RID-10^a do Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Utilizou-se como eluente solução tamponante ácido acético $0,3\text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2\text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5), o fluxo foi de $0,8\text{ mL min}^{-1}$, a temperatura de 35° C . As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 5 g L^{-1} em solução tamponante ácido acético $0,3\text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2\text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5) e a curva de calibração das colunas foi construída por padrões monodispersos de Pullulan, Figura 5, um α -glicano constituído de unidades repetidas de glicose unidas por ligação glicosídica do tipo α (1 $\rightarrow$ 6) e α (1 $\rightarrow$ 4) de Mw 805.000 a 6.200 Da, em colunas com tamanhos de 8 mm x 300 mm.

Figura 5: Estrutura do polímero Pullulan.



Fonte: Adaptado de GURGEL, 2010.

3.6.4 Espectrofotometria de fluorescência molecular

Os estudos da auto-associação dos derivados anfifílicos de quitosana em meio aquoso foram realizados pela supressão de sonda fluorescente induzida pela interação polímero-sonda. Os experimentos foram realizados a 25 °C no Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi no Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas IBILCE/UNESP, em solução tamponante ácido acético/acetato de sódio 20 mmol L⁻¹ FI=50 mmol L⁻¹ pH 5. Pequenas alíquotas das soluções estoques dos derivados foram adicionadas à cubeta de quartzo contendo solução de pireno 7,5x10⁻⁷ mol L⁻¹ em solução tamponante. O pireno foi excitado em 310 nm e o espectro de fluorescência registrado no intervalo de 350 a 400 nm.

3.7 Ensaios microbiológicos com *Aspergillus flavus*

3.7.1 *Aspergillus flavus*

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

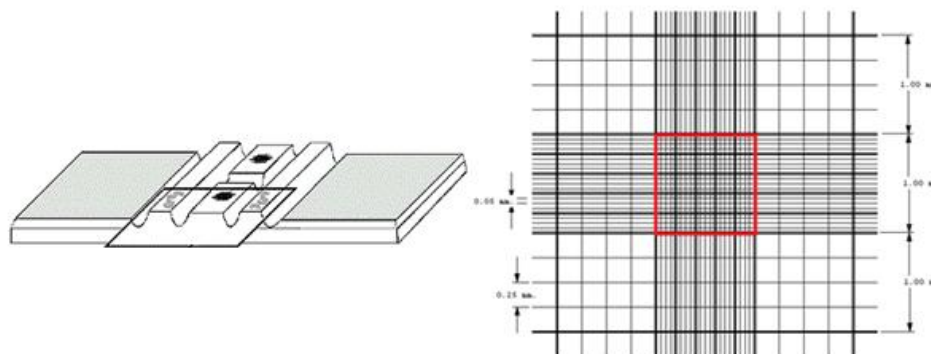
3.7.2 Preparo das soluções de quitosana e do controle

As soluções de polímeros foram preparadas pela solubilização em 50 mL de ácido acético 1% das respectivas massas referente às concentrações finais desejadas (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 g L⁻¹). As soluções do controle são feitas com 50 mL de ácido acético na ausência do polímero. O pH de todas as soluções foram ajustados para 4,9.

3.7.3 Preparo da suspensão de esporos

Com auxílio de alça de platina algumas alçadas de esporos de uma colônia previamente preparada e incubada em meio de cultura por 7 dias a 25 °C foram transferidas para um microtubo com 1 mL de água deionizada autoclavada. A suspensão foi homogeneizada e para garantir a concentração da suspensão em de 1,0x10⁶ esporos/mL procedeu-se a contagem com auxílio de câmara de Neubauer espelhada. Inicialmente higienizou-se a câmara e a lamínula com álcool 70%, posteriormente adicionou-se 10 µL da suspensão á câmara e em um microscópio invertido da marca OptPhase procedeu-se a contagem das unidades formadoras de colônia. A câmara de Neubauer é composta por uma lâmina de vidro com áreas demarcadas utilizadas para facilitar a contagem de células (Figura 6) e por lamínula de vidro que recobre as áreas de contagem. Como parâmetro, todos os esporos encontrados no quadrado central demarcado na figura 5 foram contados. Após a realização das contagens, a quantidade de esporos por mL foi calculada multiplicando-se o valor encontrado pelo fator 10.000 correspondente a transformação do volume da área de contagem em número de esporos presentes por mL de suspensão (MARTINS, 2009).

Figura 6: Câmara de Neubauer.



Fonte: Adaptado de http://protocolos3.dominiotemporario.com/page_19.html e http://deliamm96cuadernopracticashema14.blogspot.com.br/2014_11_01_archive.html

3.7.4 Preparo das soluções polímero-BDA

Preparou-se o meio de cultura base para o crescimento do fungo pela solubilização de 3,9 g de BDA (batata dextrose Agar) em 50 mL de água deionizada (uma para cada concentração de derivado de quitosana e para o controle). As misturas foram aquecidas para completa solubilização e autoclavadas por 20 minutos a 121 ± 1 °C. Em seguida as soluções de quitosana foram adicionadas aos meios de cultura ainda líquidos, homogeneizadas e divididas em placas de Petri para solidificarem. Cada concentração de derivado de quitosana resultam em 4 placas de Petri. Fez-se um orifício no centro da placa de 5 mm de diâmetro onde foi inoculado 2 µL da suspensão de esporos, item 3.7.3. Incubou-se as placas em câmara incubadora B.O.D. MA 415 da marca Marconi por 7 dias a 25 °C. Repetiu-se o procedimento para confirmação dos resultados.

3.7.5 Índice de inibição em porcentagem

O crescimento radial da colônia de *Aspergillus flavus* foi acompanhado e mensurado com auxílio de paquímetro no 7º dia de incubação. Para a análise da eficiência biofungicida dos derivados de quitosana, o índice de inibição foi calculado de acordo com o proposto pela literatura (MARTÍNEZ-CAMACHO, 2010) pela equação 1:

$$\text{Índice de Inibição} = [1 - (D_a/D_b)] \times 100 \quad (1)$$

Onde: D_a é o diâmetro da colônia das placas contendo quitosana e, D_b é o diâmetro das placas contendo BDA (controle).

3.8 Estudos com modelos de membrana

As membranas biológicas são estruturas altamente especializadas responsáveis pela regulação de várias funções celulares, principalmente a interação e transporte de substâncias. Devido a complexidade desses sistemas, prefere-se estudar eventos independentes e controlados utilizando-se modelos miméticos simplificados que contenham características fundamentais conhecidas. As vesículas lipídicas ou lipossomas, são estruturas vesiculares e microscópicas formadas, basicamente, por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos, são amplamente utilizadas como modelos simplificados das membranas biológicas.. (ARCHILHA, 2008; MACHADO et al., 2007). Estudos físico-químicos e estruturais podem avaliar possíveis alterações nos sistemas pela presença dos derivados de quitosana, possibilitando avaliar interação polímero-membrana. O presente trabalho propôs o estudo da interação de derivados de dietilaminaetil quitosana com lipossomas de L- α -fosfatidilcolina (PC) e L- α -fosfatidilcolina/L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PC:PG) na proporção 80:20 (%).

3.8.1 Preparação das vesículas

Finos filmes dos fosfolipídios L- α -fosfatidilcolina (PC) e L- α -fosfatidilcolina/L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PC:PG), na proporção 80:20 (%) na concentração final de 1×10^{-3} mol L^{-1} , foram obtidos a partir da dispersão dos fosfolipídios em 1 mL de clorofórmio em um tubo de fundo redondo. O solvente foi evaporado utilizando nitrogênio formando um fino filme que foi hidratado com solução tamponante ácido acético/acetato 20 mmol L^{-1} , FI=150 mmol L^{-1} pH 5,5 e agitada com auxílio de vórtex. Posteriormente, a solução foi extrusada em extrusor Avanti's Mini-Extru'der for LUV Preparation utilizando membrana de 400 nm e membrana de 100 nm.

3.8.2 Espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta

O Espalhamento de Luz Dinâmico é uma técnica utilizada para medir o diâmetro de partículas na faixa de nanômetros e micrometros a partir do movimento browniano destas em suspensão, fazendo com que a luz de um laser incidente na amostra seja espalhada em diferentes frequências. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano que é correlacionado com o tamanho de partícula. O Potencial Zeta é uma medida da mobilidade eletroforética de partículas suspensas em meio líquido a partir da ação de um campo elétrico aplicado, utilizada para medir a carga superficial de partículas em suspensão (MALVERN, 2017).

As análises de DLS e Potencial Zeta foram realizadas no Laboratório de Estudos em Peptídeos do IBILCE/UNESP - SJRP, utilizando-se o aparelho Zetasizer Nano ZS, Malvern, variando-se a concentração de derivados de quitosana em suspensão de vesículas (PC e PC:PG) previamente preparadas como descrito no item 3.8.1.

3.8.3 Experimentos de vazamento do conteúdo fluorescente

Vazamento de marcador fluorescente nas vesículas, induzido pelos derivados anfifílicos, foi monitorado por espectros de emissão de fluorescência. Onde, alíquotas da suspensão de vesículas foram dispersas em solução tamponante Tris/HCl 10 mmol L⁻¹, 1 mmol L⁻¹ Na₂EDTA e 0,15 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 7,5 em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, variando-se a concentração dos polímeros em estudo a 25 °C. A intensidade de emissão de fluorescência em 520 nm (excitação 490 nm) em função do tempo foi monitorada em intervalos de 15 minutos. Os experimentos foram realizados no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia e Microcalorimetria de Macromoléculas Biológicas do IBILCE/UNESP-SJRP em um Espectrofluorímetro de contagem de fótons de alta sensibilidade ISS – PC.

3.9 Investigação da ação do polímero por microscopia

3.9.1 Marcação dos derivados de quitosana com rodamina

Os derivados de quitosana foram sinalizados com rodamina para posteriormente serem utilizados na microscopia confocal a laser. Para isso, 200 mg de cada derivado foi dissolvida

em água na presença de ácido acético 0,1% v/v. O pH foi ajustado para 6.2 utilizando-se solução de NaOH e a amostra mantida sob agitação em atmosfera de N₂, em seguida dissolveu-se 12 mg de isotiocianato de rodamina B em metanol e adicionou-se lentamente às soluções de quitosana sob agitação. A reação foi mantida sob atmosfera de N₂ e agitação por 18h a temperatura ambiente. A mistura reacional foi dialisada contra água deionizada por 5 dias, solução de hidróxido 0,05 mol L⁻¹ por 1 dia e novamente contra água deionizada por 5 dias e posteriormente recuperada por liofilização. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz (MA et al., 2008).

3.9.2 Microscopia de Varredura confocal a laser

As lâminas utilizadas na microscopia foram preparadas segundo a adaptação do método Agar Block descrito por Saggiorato e colaboradores (2012) onde cubos de meio de cultura (BDA) na presença e ausência de derivados de quitosana sinalizados com rodamina, foram inoculados com uma suspensão de esporos do fungo *Aspergillus flavus*, e posteriormente foram depositados sobre lâmina de microscopia estéril e coberto por lamínula estéril. Essas lâminas foram então colocadas em placas de petri e incubadas por 3 dias a 25 °C controlando-se a umidade do ambiente. A lâmina e a lamínula com as hifas aderidas foram então fixadas utilizando-se metanol e marcadas utilizando-se DAPI para a hifa controle (crescida na ausência de polímero) conforme DAPI Protocol for Fluorescence Imaging (TERMOFISHER SCIENTIFIC Inc., 2016). As microscopias foram realizadas no Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises (CMMicro) do departamento de Biologia do IBILCE/UNESP em um Microscópio de Varredura confocal a laser Zeiss LSM 710 com um aumento de 40 vezes.

3.9.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As hifas do fungo crescido nos diferentes meios por 3 dias foram fixados em glutaraldeído 3% diluído em solução tamponante Millonig pH 7,3 contendo ácido tânico 0,25%, durante 24 horas. Após lavagem em solução tamponante, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% também em solução tamponante Millonig, por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em acetona e incluídos em resina Araldite (COTTA-PEREIRA et al., 1976). As telas de cobre contendo os cortes ultrafinos foram

contrastadas com solução de acetato de uranila a 2% (20 min.), lavadas em água bidestilada, mergulhadas em solução de citrato de chumbo a 2% (6 min.) e lavadas novamente. As observações foram feitas em Microscópio Eletrônico Tecnai Spirit - FEI Company no Centro de Microscopia Eletronica do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP Botucatu.

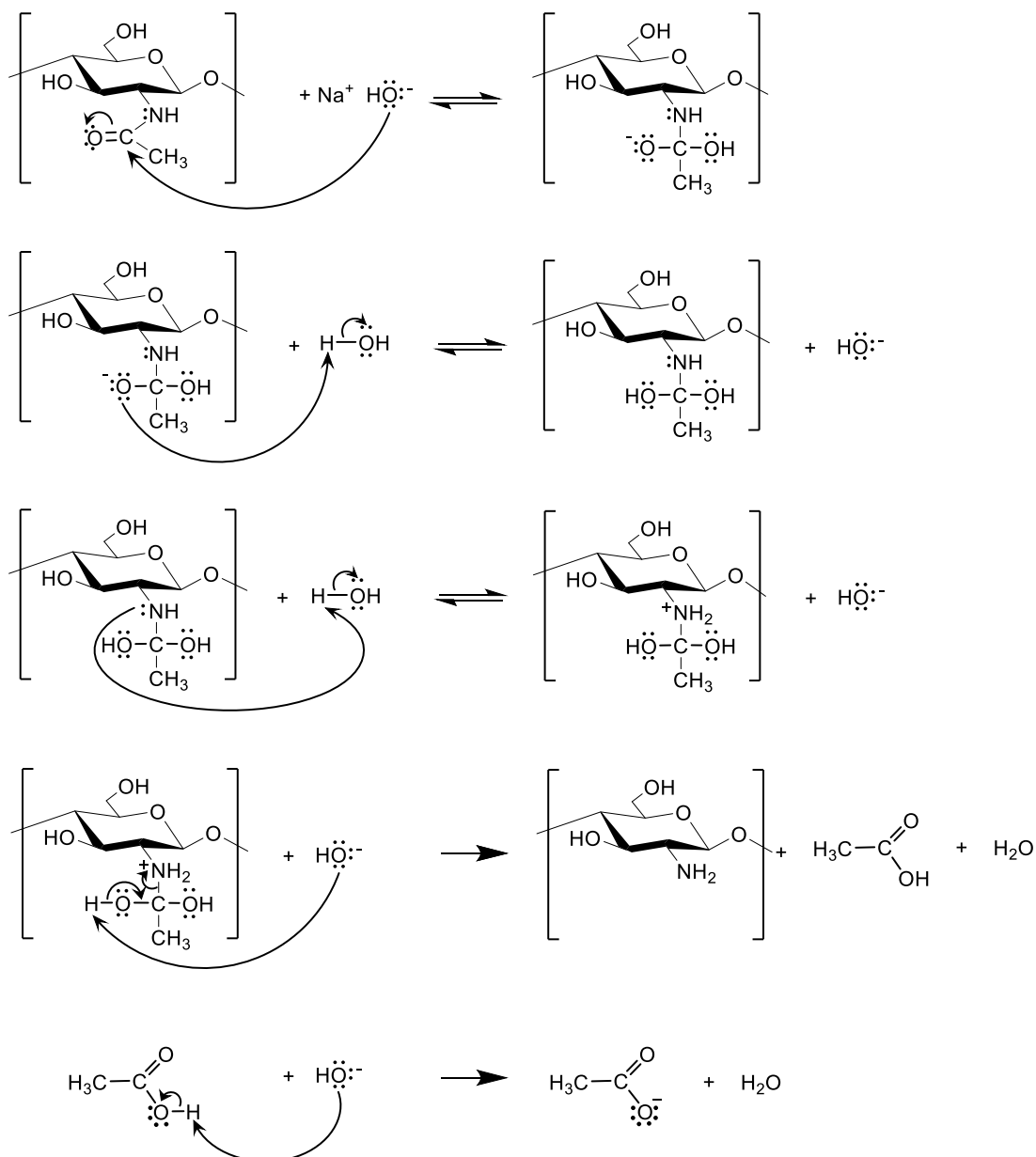
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização dos derivados de quitosana

4.1.1 Reação de desacetilação

A desacetilação da quitosana foi realizada através da reação de hidrólise da amida em meio básico que ocorre pela adição nucleofílica da hidroxila no grupo carbonila da amida, seguida da protonação do nitrogênio da acetamida, desprotonação do grupo hidroxila, retomada da ligação dupla entre o carbono carbonílico e o oxigênio, com eliminação do ácido carboxílico (Figura 7). Como resultado, aumenta-se o número de grupos aminas livres no polímero, aumentando também sua solubilidade e reatividade.

Figura 7: Mecanismo da reação de desacetilação da quitosana comercial.



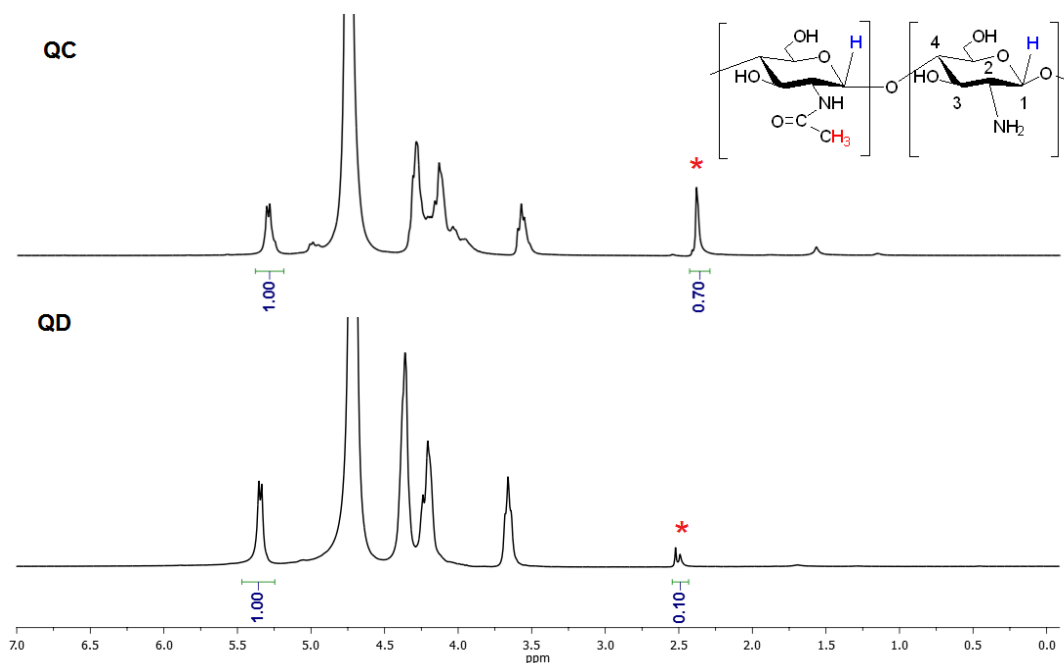
Fonte: Autoria própria.

A análise dos espectros de RMN¹H da QC e QD possibilitou mensurar a concentração de grupos amina livres, em porcentagem (Figura 8). O sinal dos hidrogênios anoméricos dos monômeros desacetilados e acetilados apareceram entre 5,0 e 5,4 ppm. A região de 4,2 a 4,5 ppm apresenta os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 dos monômeros e o sinal em 3,7 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel. Os

hidrogênios pertencentes aos grupos acetamida apresentaram sinal na região de 2,5 ppm (GABRIEL et al.,2013). O grau de desacetilação foi calculado a partir da equação 2 onde **GD** significa grau de desacetilação, **A_{ac}** a área da integração dos sinais dos hidrogênios do grupo acetamida e **A_{an}** a área da integração dos sinais dos hidrogênios anoméricos.

$$GD = \left[1 - \left(\frac{A_{ac}}{3 A_{an}} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

Figura 8: Espectros de RMN¹H da quitosana comercial e desacetilada.

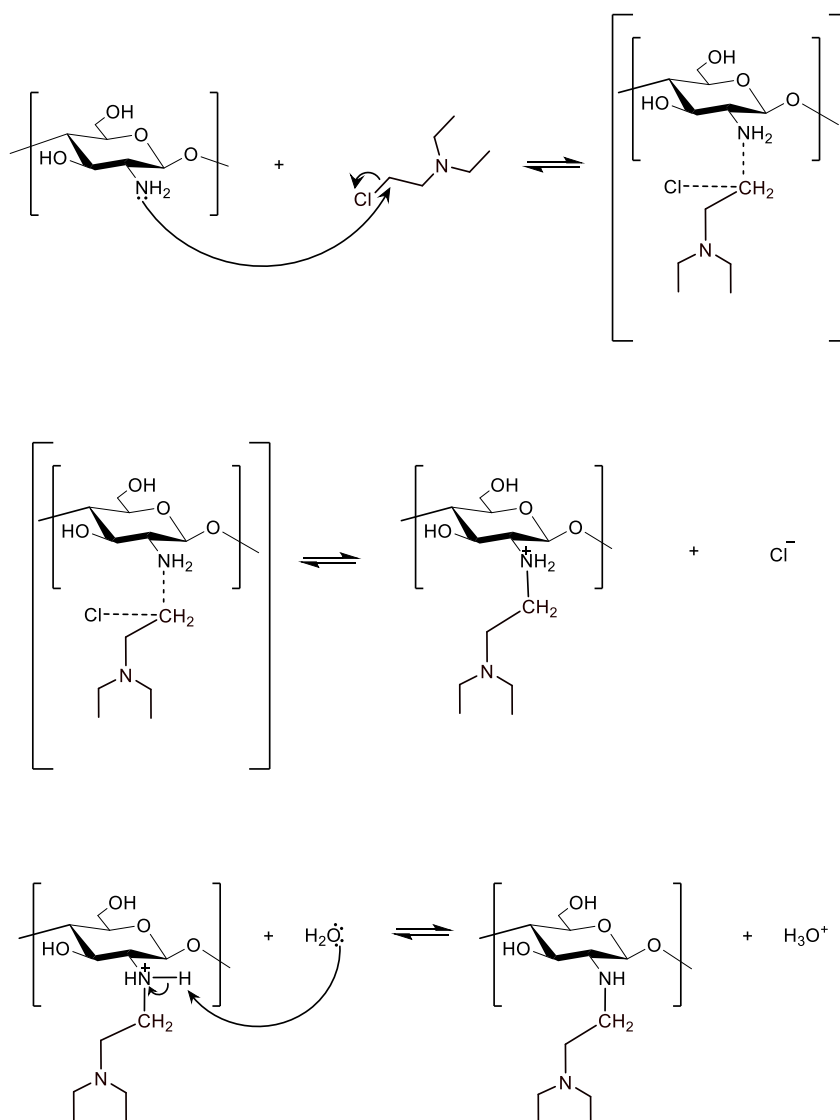


A quitosana comercial apresentou 77% de grupos amina livres e após a reação de desacetilação obteve-se 97% de grupos desacetilados.

4.1.2 Reação de substituição com DEAE

A primeira etapa das modificações na cadeia da quitosana foi a inserção do grupo hidrofílico DEAE. Essa reação consiste em uma substituição nucleofílica bimolecular e ocorre pelo ataque nucleofílico ao carbono ligado ao átomo de cloro do grupo DEAE com conseqüente formação do estado de transição seguida do rompimento da ligação entre carbono e cloro e formação da ligação carbono-nitrogênio (Figura 9).

Figura 9: Mecanismo da reação de substituição com DEAE.



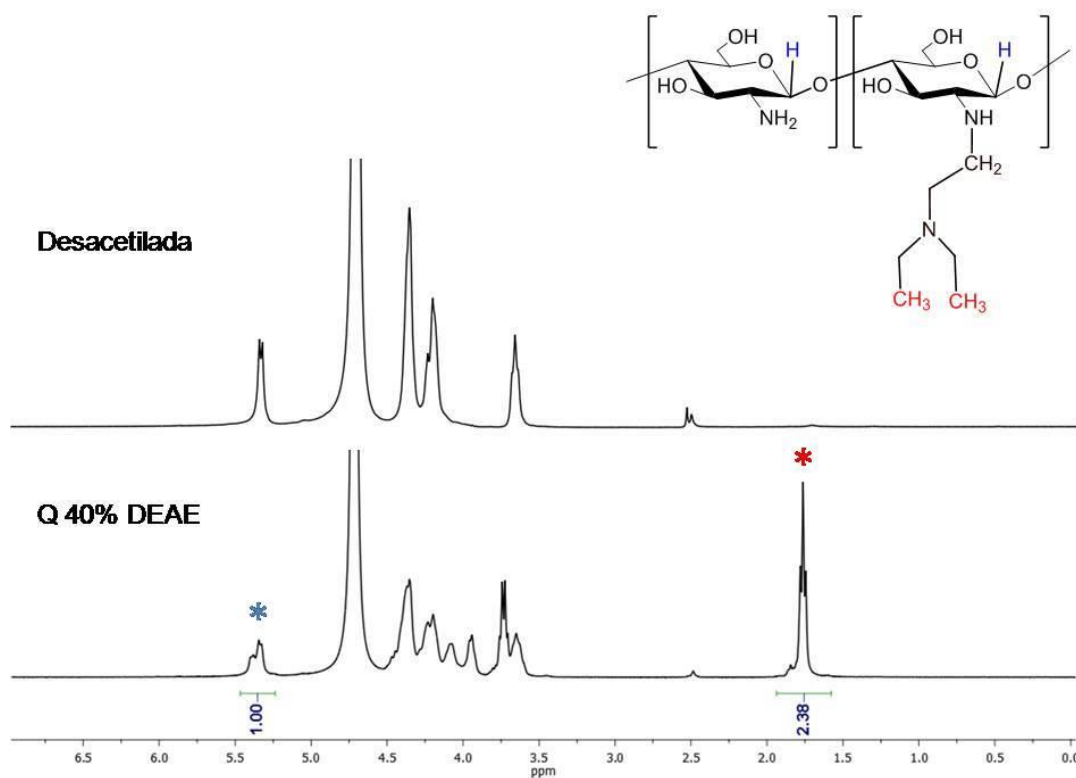
Fonte: Autoria própria

A porcentagem de substituição de grupos DEAE na cadeia polimérica foi determinada por RMN¹H a partir da ressonância dos hidrogênios dos carbonos metílicos do grupo DEAE (espectros de RMN¹H apresentados na figura 10) utilizando-se a equação 3. Onde **GS** significa grau de substituição, **A CH** refere-se a área correspondente aos sinais dos hidrogênios dos grupo metila do DEAE e **A an** refere-se a área dos sinais dos hidrogênios anoméricos.

Obteve-se 40 % de substituição de grupos DEAE na cadeia polimérica.

$$GS = \left(\frac{A_{CH}}{6 A_{an}} \right) \times 100 \quad (3)$$

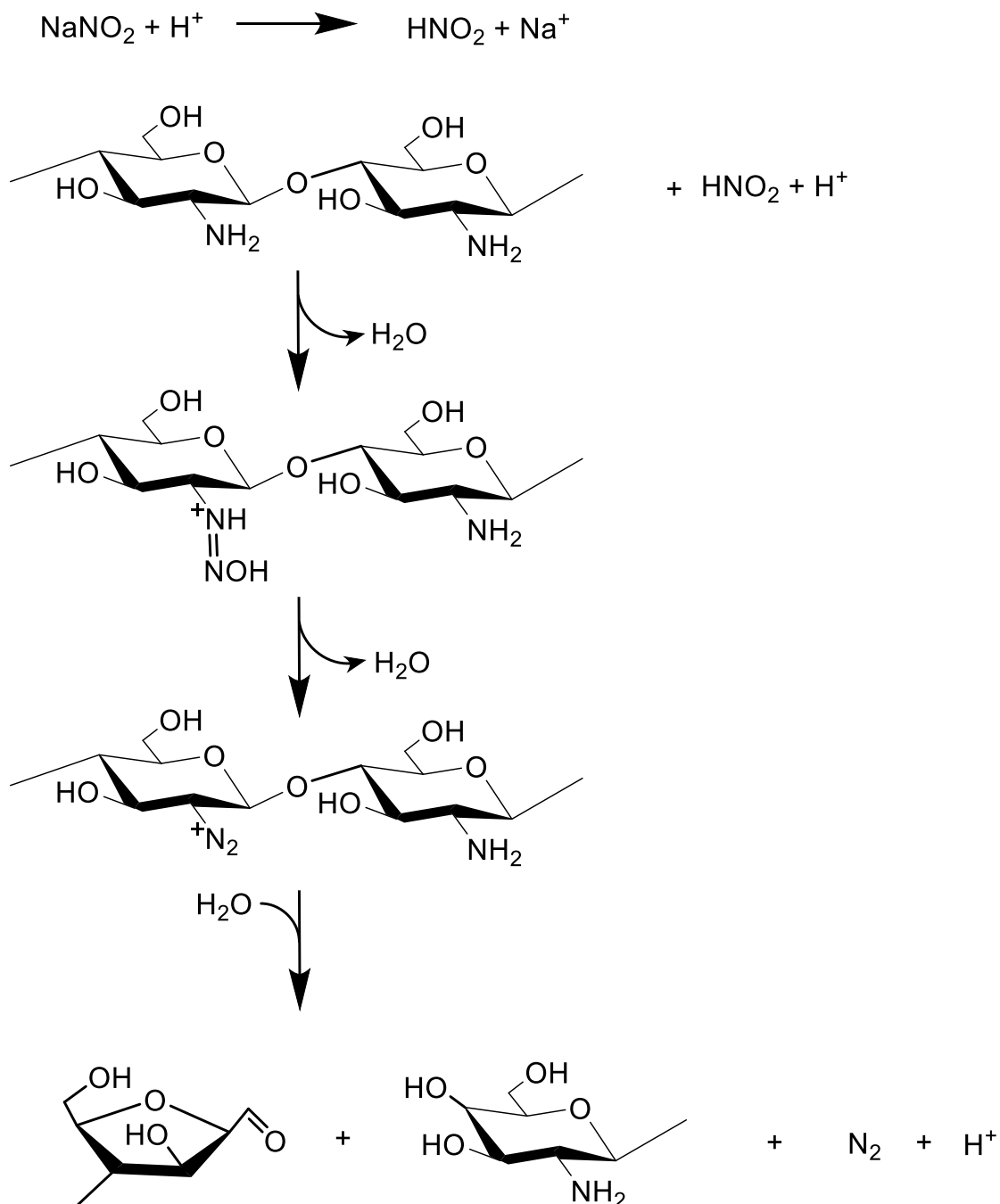
Figura 10: Espectro de RMN¹H do derivado hidrofílico de quitosana.



4.1.3 Degradação da cadeia polimérica e determinação da massa molecular Mw

Tendo por objetivo utilizar derivados anfifílicos com conteúdo hidrofílico constante e massas molares decrescentes o derivado de quitosana contendo grupo DEAE foi submetido a degradação. A reação de degradação envolveu a quebra da ligação glicosídica pelo ácido nitroso formado quando o nitrito de sódio foi adicionado no meio reacional. Dessa forma, a massa de nitrito de sódio foi aumentada gradativamente para obtenção de massas moleculares decrescentes. A reação ocorreu através da desaminação de uma unidade desacetilada da quitosana e formação de 2,5-anidro-D-manose como unidade redutora final (figura 11) (TOMMERAAS et al., 2001).

Figura 11: Mecanismo da reação de degradação da cadeia polimérica da quitosana.



Fonte: Autoria própria.

As quantidades de nitrito utilizadas bem como os valores de Mw obtidos por cromatografia de permeação em gel (CPG), estão apresentados na tabela 2 e na figura 12 respectivamente. Os resultados confirmam o sucesso da variação da Mw resultante do aumento gradativo de NaNO_2 . As quantidades utilizadas permitiram obter 5 derivados com

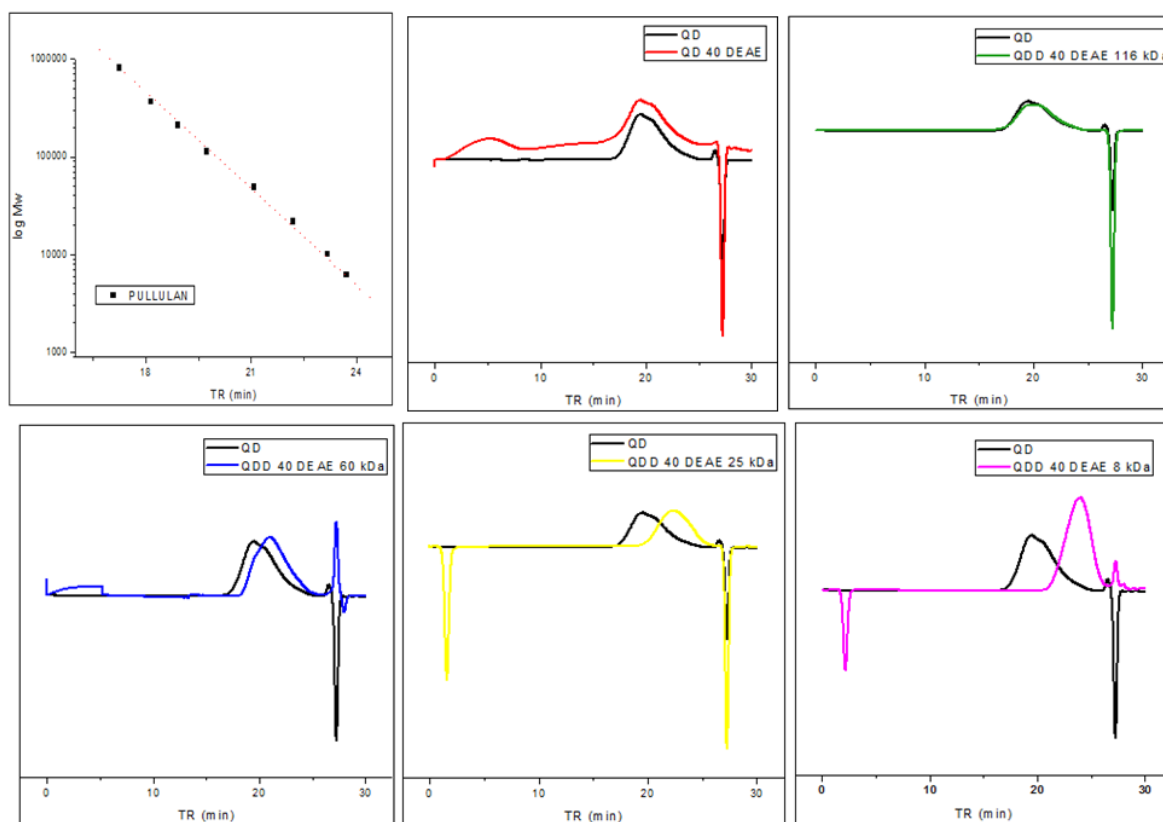
massas moleculares variando de 136 kDa a 8 kDa. Entretanto como observado anteriormente por Huang; Khor e Lim.,(2004) , não há uma relação linear entre a quantidade de nitrito de sódio e o Mw obtido. Os valores de Mw/Mn referem-se a polidispersividade das soluções.

A análise dos cromatogramas da figura 12 mostra também que todas as amostras obtidas apresentaram perfis de eluição dentro da faixa da curva de calibração. A quitosana de partida (QD 40% DEAE 136 kDa) apresentou um perfil de eluição muito próximo daquele de quitosana desacetilada, indicando que a degradação durante a reação foi muito baixa. Além disso, como esperado, os cromatogramas das amostras de menores massas moleculares se deslocam progressivamente para maiores tempo de retenção, e confirmando o sucesso dos procedimentos utilizados.

Tabela 2: Relação massa de nitrito de sódio – Mw obtida.

Polímero	Massa NaNO₂ (mg)	Mw (kDa)	Mw/Mn
QD	0	122,447	2,93
Q 40% DEAE	0	136,527	2,97
QDD 40% DEAE	21,5	116,1	2,81
QDD 40% DEAE	100	69,061	2,54
QDD 40% DEAE	240,7	25,372	2,92
QDD 40% DEAE	412,5	8,773	3,08

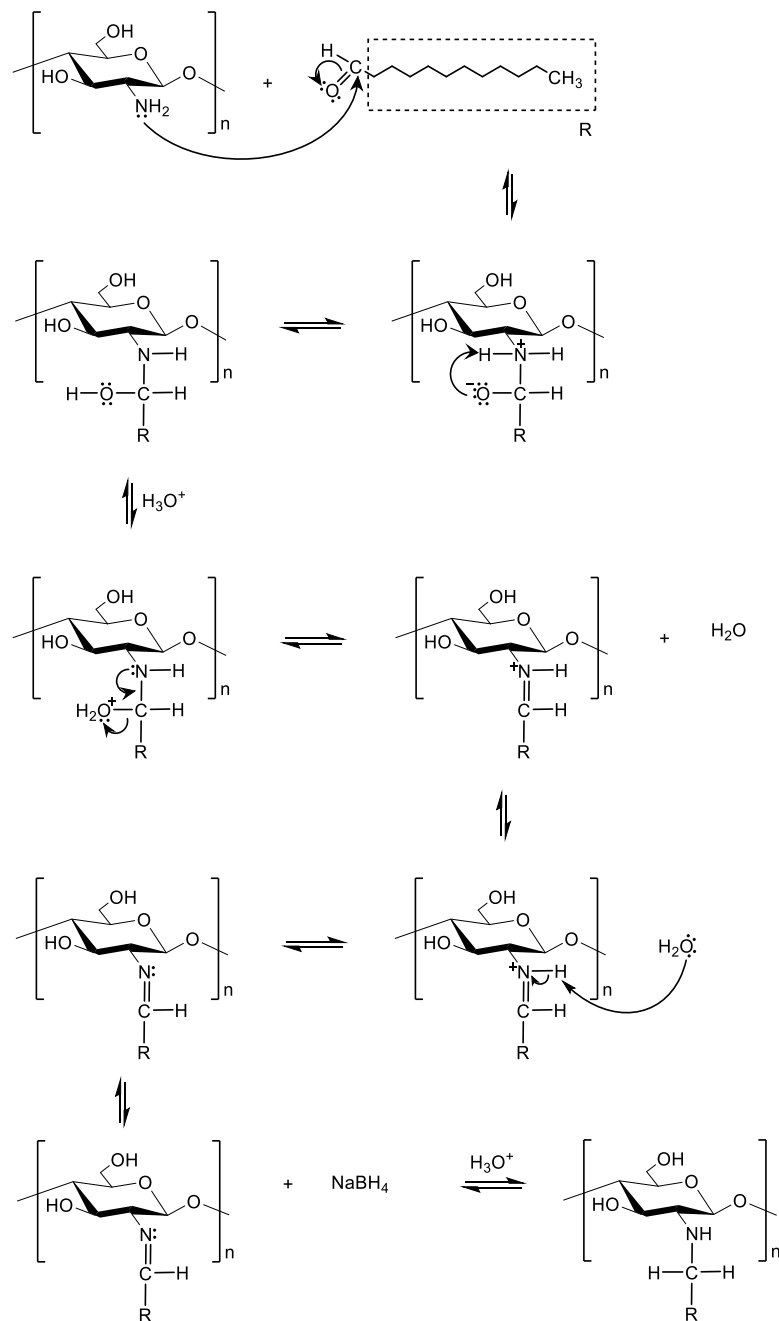
Figura 12: Cromatogramas dos polímeros, comparação com a quitosana desacetilada e curva de calibração com padrão pullulan.



4.1.4 Reação de alquilação

Os derivados de quitosana anfifílicos foram finalmente sintetizados a partir da reação dos polímeros de Q 40% DEAE de diferentes massas moleculares com dodecilaldeído. (Figura 13).

Figura 13: Mecanismo da reação de alquilação dos derivados de quitosana-DEAE.



Fonte: Autoria própria

A primeira etapa da reação refere-se a adição nucleofílica do carbono carboxílico do aldeído ao nitrogênio da amina da quitosana, formando uma imina que é posteriormente reduzida resultando na ligação covalente simples do grupo dodecil à estrutura.

Os espectros de RMN¹H (Figura 14) permitiram calcular os graus de substituição por grupos dodecila na cadeia polimérica (**GS dod**). Na equação utilizada **A CH dod** refere-se a área do sinal em 1,3 ppm que corresponde à ressonância dos hidrogênios dos grupos metila das cadeias de dodecil e **A an** corresponde à área do sinal dos hidrogênios anoméricos dos monômeros substituídos e não substituídos com DEAE e grupos dodecil que aparecem na faixa de 5 a 5,5 ppm.

$$GS\ dod = \left(\frac{A\ CH\ dod}{3\ A\ an} \right) \times 100 \quad (3)$$

As quantidades de dodecil utilizadas para obtenção de um grau de substituição de 20% foram descritas no item 3.5. As mesmas massas de polímero de partida, volume de aldeído e condições reacionais foram repetidas para todos os derivados. Os resultados apresentados na tabela 3 confirmam o sucesso das sínteses uma vez que todos os derivados apresentaram graus de substituição muito próximos, o que possibilita um estudo comparativo, tendo como única variável a massa molecular.

Tabela 3: Porcentagens de substituição de dodecila nos diferentes derivados de quitosana e estrutura final obtida.

Polímero	GS dod
QD 40 DEAE 136 kDa	19
QD 40 DEAE 116 kDa	19
QD 40 DEAE 60 kDa	19
QD 40 DEAE 25 kDa	19
QD 40 DEAE 8 kDa	20

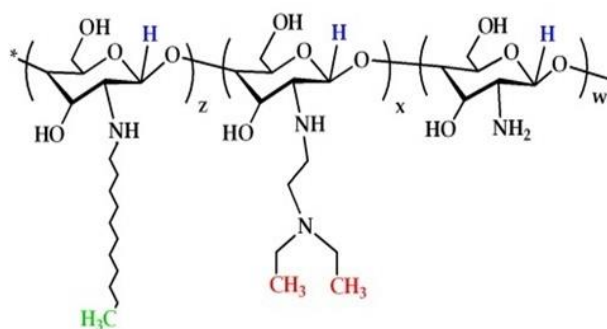
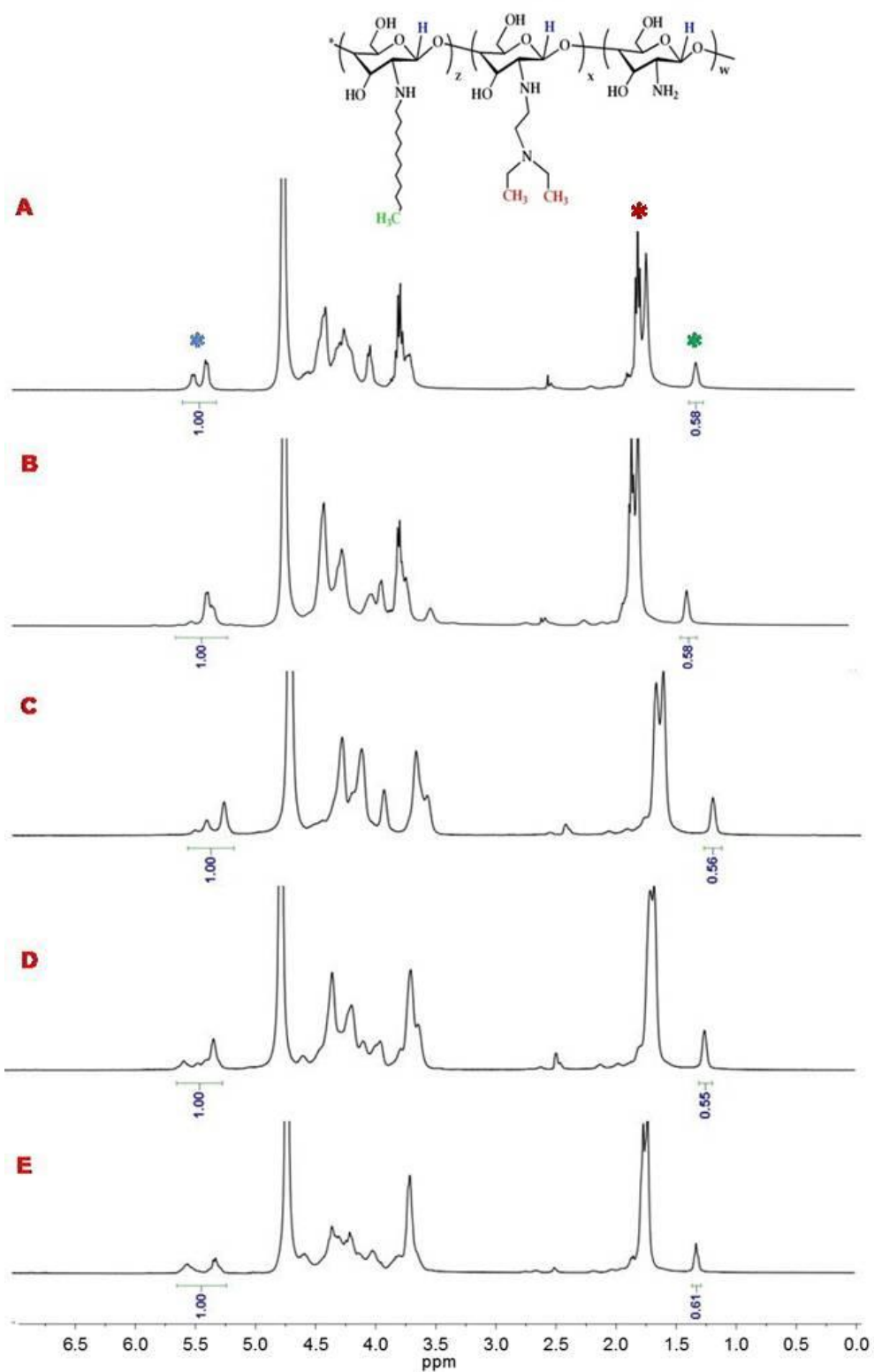


Figura 14: Espectros de RMN¹H dos derivados de quitosana-DEAE alquilados de diferentes massas moleculares.

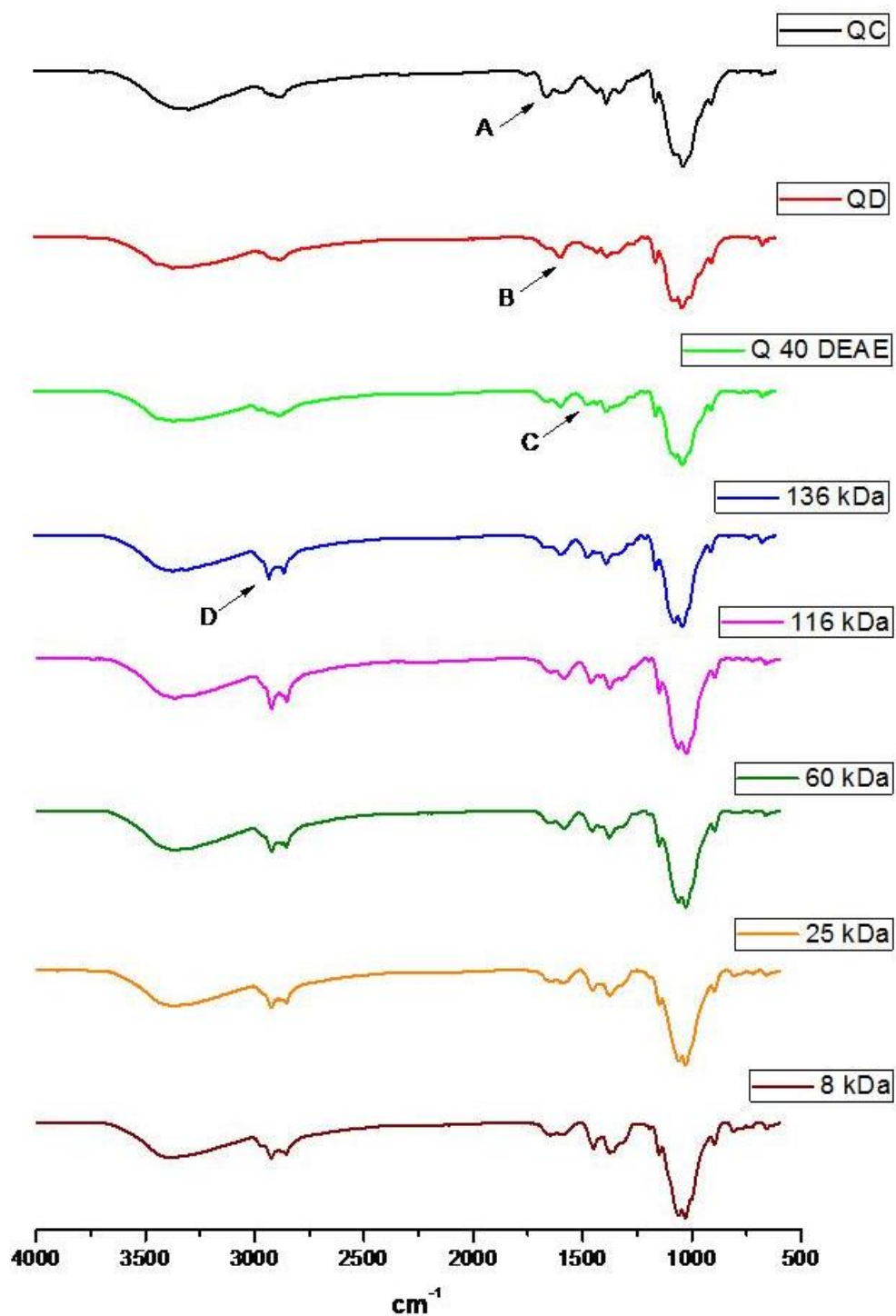


A= QD 40 % DEAE 19 % DOD 136 kDa, B= QD 40 % DEAE 19 % DOD 116 kDa, C= QD 40 % DEAE 19 % DOD 60 kDa, D= QD 40 % DEAE 19 % DOD 25 kDa e E= QD 40 % DEAE 19 % DOD 8 kDa.

4.2 Caracterização dos derivados por FTIV

Os espectros de infravermelho dos polímeros, figura 15, confirmaram a eficiência das reações propostas para as substituições realizadas. A primeira delas, a desacetilação, foi confirmada pela ausência da banda em 1660 cm^{-1} , que é característica do estiramento da ligação C=O da carbonila dos grupos acetamida dos monômeros acetilados. No espectro da quitosana comercial (77% de desacetilação) é visível a banda em 1450 cm^{-1} característica da ligação C-N de grupos amidas, a qual se mostra ausente na quitosana desacetilada (97% de desacetilação). A inserção dos grupos DEAE foi confirmada pelo aumento da intensidade do sinal em 1425 cm^{-1} característico da ligação entre C-N de grupos aminas e pelo aparecimento de bandas entre 2850 a 2950 cm^{-1} características do estiramento da ligação entre C-H de grupos CH_2 e CH_3 respectivamente, tal sinal também confirma a substituição com os grupos dodecila (derivados 136 kDa, 116 kDa, 60 kDa, 25 kDa e 8 kDa) uma vez que quando há presença desses grupos os sinais ficam mais intensos.

Figura 15: Espectros de infravermelho para a série de polímeros, comparação com a quitosana comercial e desacetilada. Os espectros de 136, 116, 60, 25 e 8 kDa referem-se aos derivados anfífilos de quitosana-DEAE-dodecil.



Onde as letras indicam os estiramentos das ligações, sendo A em 1660 cm^{-1} da ligação C=O da acetamida, B em 1450 cm^{-1} da ligação C-N da acetamida, C em 1425 cm^{-1} da ligação C-N da amina e D em 2950 e 2850 cm^{-1} ligação C-H de CH_3 e CH_2 .

4.3 Determinação da concentração de agregação crítica.

Devido a natureza anfifílica dos derivados além da interação com a parede celular e com a membrana dos fungos, estes polímeros podem apresentar interações intra e intermoleculares em meio aquoso. Portanto, a associação das quitosanas anfifílicas foi estudada em solução aquosa de pH 5,0. O pireno foi utilizado como sonda fluorescente para avaliar a formação de agregados para os diferentes derivados de quitosana preparados. Estudos recentes mostraram que quitosanas modificadas hidrofobicamente podem se auto-associar em solução aquosa levando a formação de agregados de grandes dimensões (GABRIEL et al., 2013). Quitosana pura também tem sido estudada e agregados tem sido observados em maiores concentrações que seus derivados anfifílicos.

Os resultados deste estudo são apresentados na forma de gráficos, como mostrado na Figura 16. Os pontos de inflexão, a partir dos quais se observa uma queda brusca nos valores da razão I/III (sinais característicos do espectro de fluorescência do pireno sendo o pico I em 372 nm e o pico III em 384 nm), representam o início do processo de auto associação, ou seja, interações intermoleculares das cadeias, que levam a formação de agregados, que podem aumentar de tamanho com o aumento da concentração (GABRIEL et al., 2013). Os valores de CAC foram determinados pela intersecção das retas que tangenciam os pontos antes e depois da inflexão. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Os resultados mostram que os derivados com maior massa molecular apresentam menores valores de CAC quando comparados com a quitosana desacetilada. Esse fato pode ser explicado pela presença de grupos dodecila na cadeia do polímero que promovem interações intermoleculares mais fortes, refletindo-se em um decréscimo do valor da razão dos sinais I/III do pireno. Portanto, apesar da presença da porção hidrofílica (DEAE) na cadeia polimérica, as interações intermoleculares levam a formação de agregados com polaridades reduzidas.

Observa-se também que a M_w dos derivados de quitosana influenciam diretamente nas CACs, visto que os polímeros de menores M_w apresentaram maiores CACs, indicando uma maior hidrofobicidade dos polímeros com maiores massas moleculares (Tabela 4).

Figura 16: Gráficos da CAC dos derivados de quitosana.

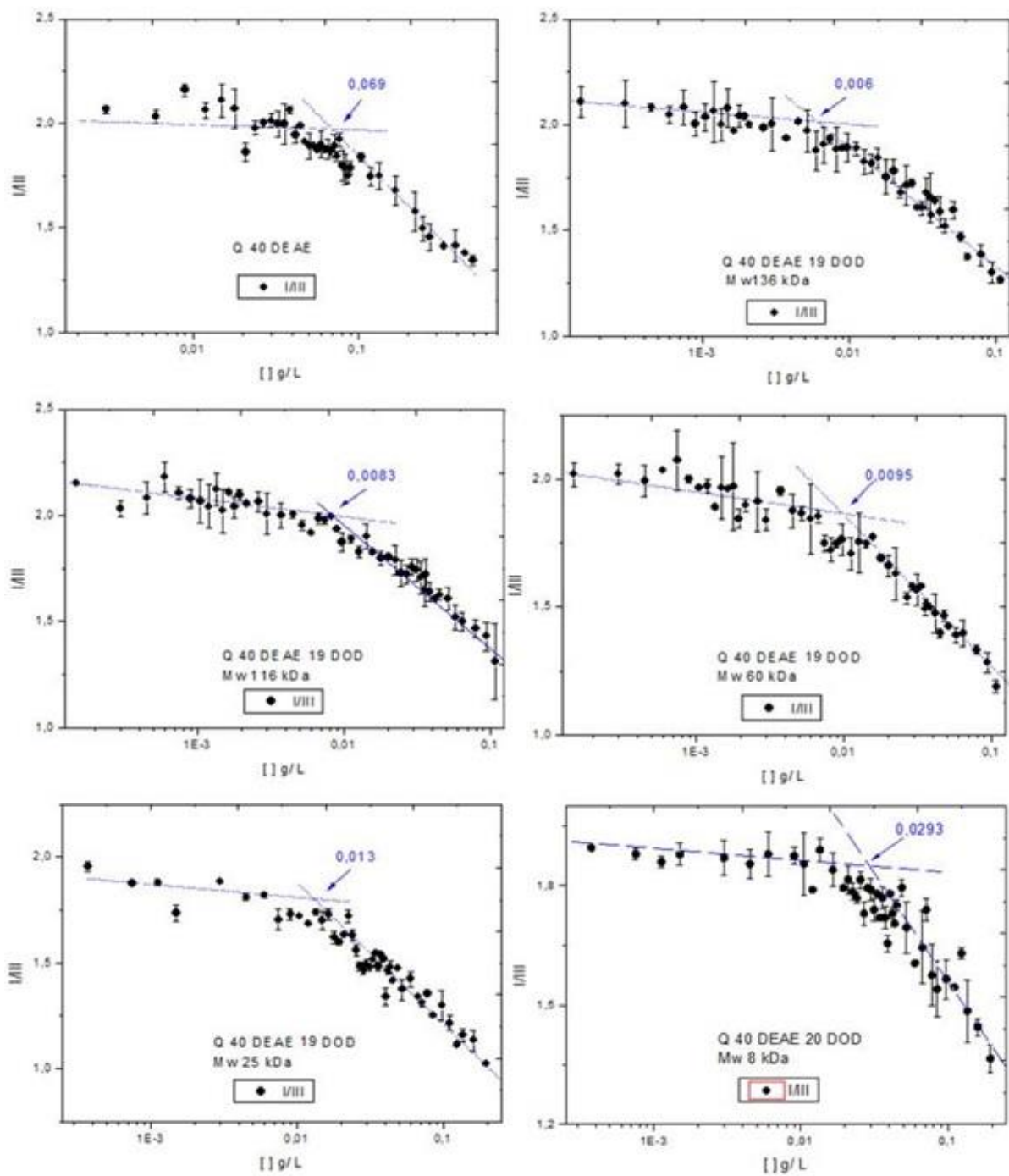
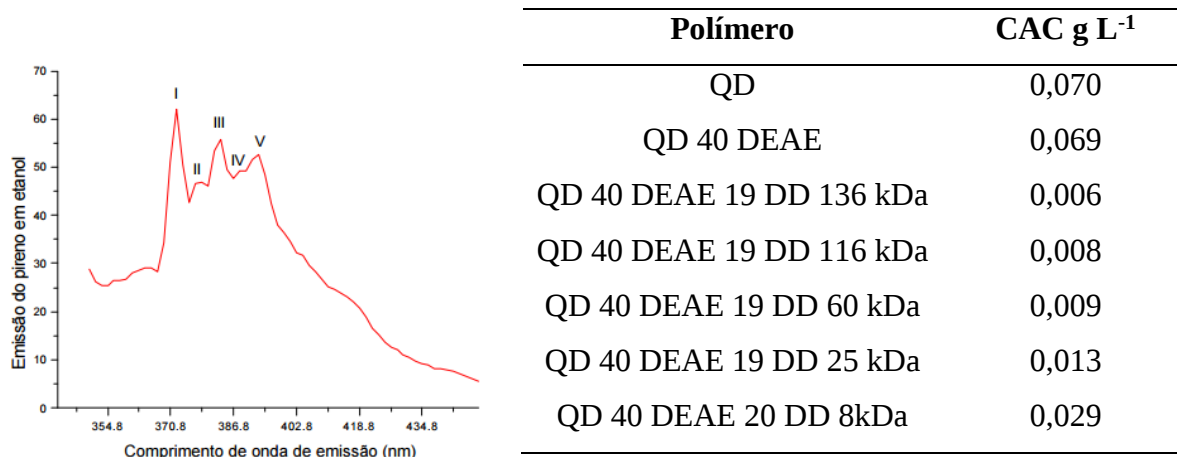


Tabela 4: Valores de CAC dos derivados de quitosana.

Fonte: Imagem SILVA, 2012. Tabela autoria própria.

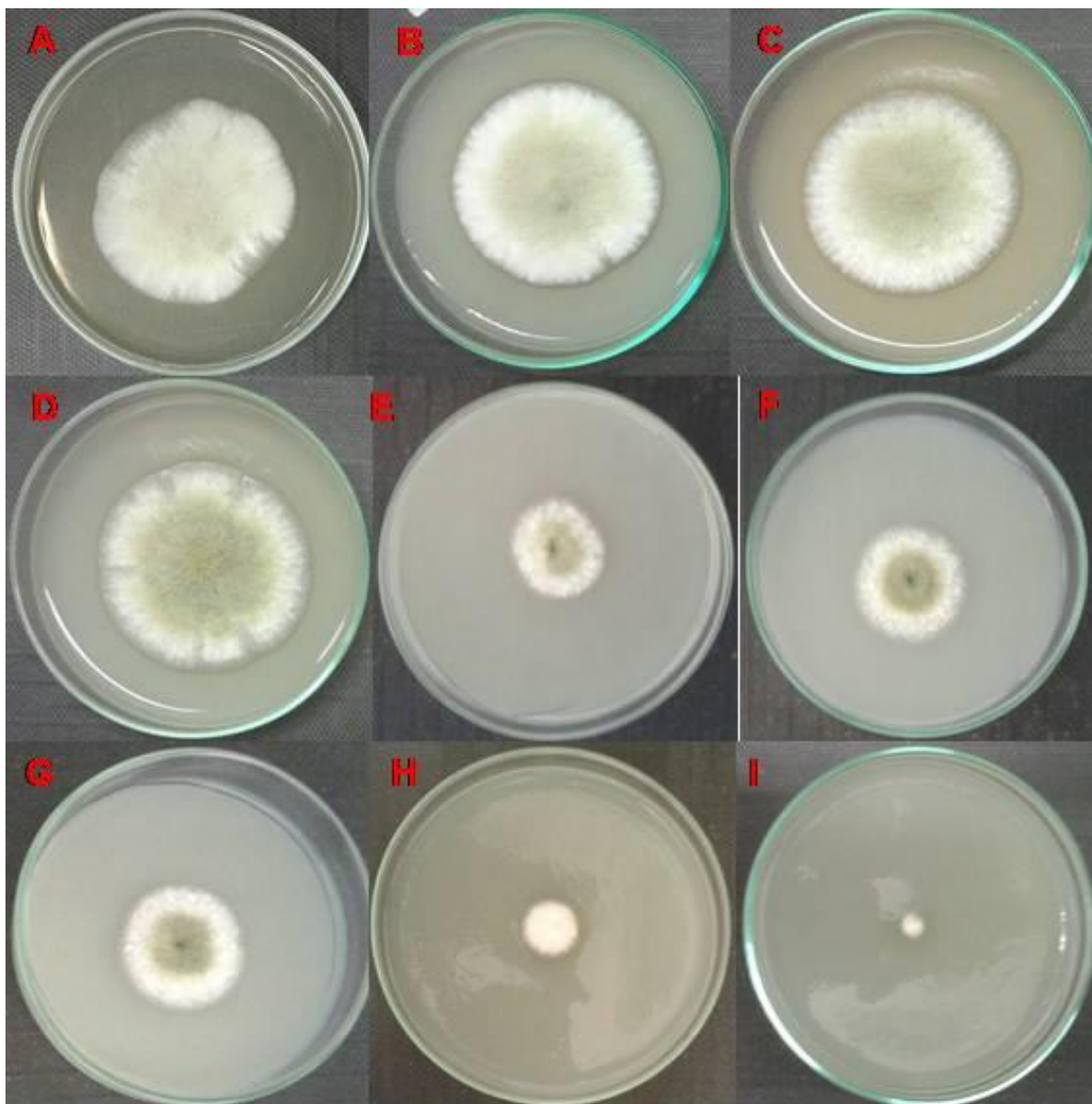
4.4 Ensaios Microbiológicos

Muitos trabalhos abordam o efeito da concentração da quitosana na eficiência antimicrobiana (RAPPUSSI-DA-SILVA, 2006; RABEA et al., 2003), outros além da concentração tratam do efeito do grau de substituição e massa molecular nessa eficiência.

Os ensaios microbiológicos foram realizados em 5 diferentes concentrações para os derivados anfifílicos de quitosana (0,1-0,25-0,50-0,75-1,0 g L⁻¹). Para as amostras de quitosana comercial, desacetilada e substituída com DEAE (Q 40% DEAE) os ensaios foram realizados somente na concentração de 1 g L⁻¹. As imagens mostradas na figura 17 exemplificam nos experimentos conduzidos as diferenças entre os índices de inibição dos diferentes polímeros.

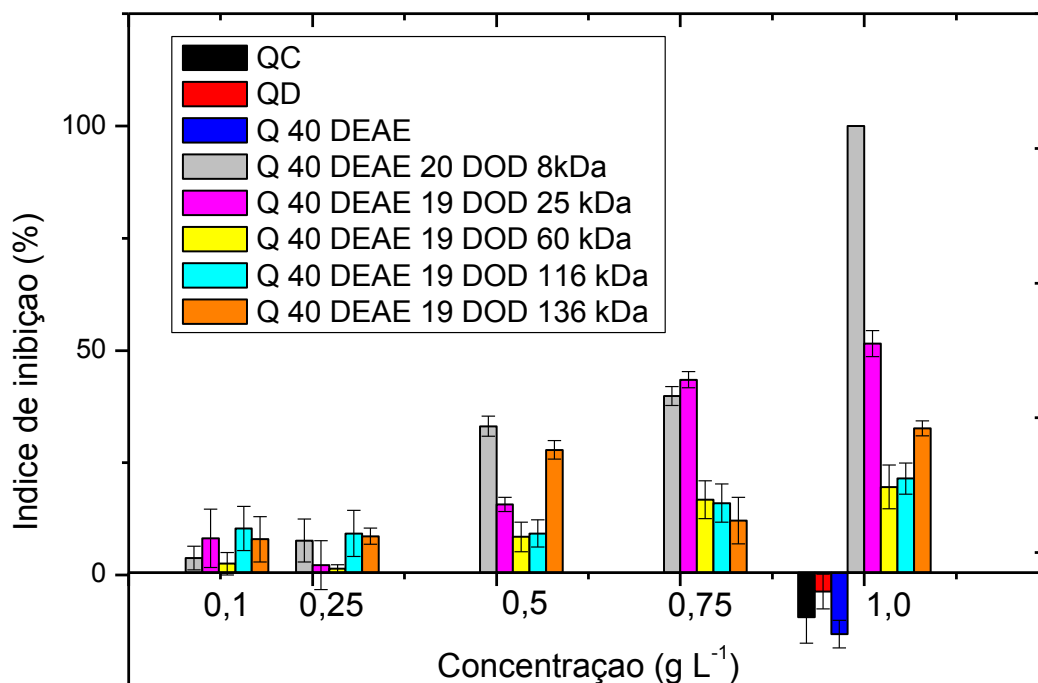
Os índices de inibição obtidos confirmam a proposta do trabalho e estão de acordo com a literatura (GABRIEL et al., 2015; TAKAKI et al., 2013; PEDRO et al., 2013). De forma geral, para os derivados anfifílicos, os índices de inibição aumentam com a concentração. Entretanto a figura 16 mostra claramente que os derivados anfifílicos de menor massa molecular (8,0 e 25 kDa) foram mais eficientes, sendo que na concentração de 1,0 g L⁻¹ apresentaram respectivamente 100 e 51,55 % de inibição. Os resultados estão apresentados nas figuras 17 e 18.

Figura 17: Comparação entre o tamanho das colônias na ausência e presença dos derivados de quitosana na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$.



A= controle (ausência de quitosana), B= quitosana comercial, C= quitosana desacetilada, D= QD 40 % DEAE, E= QD 40 % DEAE 19 % DOD 136 kDa, F= QD 40 % DEAE 19 % DOD 116 kDa, G= QD 40 % DEAE 19 % DOD 60 kDa, H= QD 40 % DEAE 19 % DOD 25 kDa, I= QD 40 % DEAE 20 % DOD 8 kDa.

Figura 18: Índices de inibição do crescimento fúngico em função da concentração dos polímeros, em porcentagem, dos diferentes derivados de quitosana.



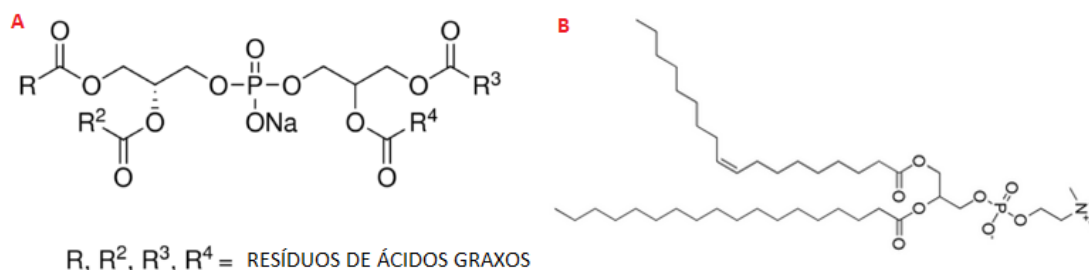
A análise dos resultados indica que a maior inibição com os derivados de menor Mw pode estar relacionada com uma melhor interação com a membrana e/ou parede celular, o que pode ser proporcionado justamente pelo menor tamanho da cadeia polimérica desses derivados. Esses resultados analisados a luz dos experimentos de CAC podem ser interpretados como um compromisso entre a interação intermolecular entre as cadeias poliméricas e a parede do fungo. Considerando-se que a concentração de inibição está acima das CACs, para os anfifílicos de menores Mw as interações intermoleculares são mais fracas e podem permitir uma melhor interação com a membrana, resultando em maiores índices de inibição.

Estudos do efeito da massa molecular na atividade antifúngica de quitosana foram relatados por Badawy e colaboradores (2009) e por Li e colaboradores (2011). Embora os fungos estudados sejam diferentes, respectivamente *Botrytis cinérea* e *Fulvia fulva*, ambos estudos mostraram que quitosanas oligoméricas e de menores massas moleculares são mais eficientes do que as de alta massa na inibição de fungos. Portanto, a interação entre as cargas dos constituintes da parede celular com os derivados de quitosana e as interações hidrofóbicas entre o grupo dodecil e as proteínas hidrofóbicas da parede celular podem ser potencializadas para os polímeros de menores massas moleculares.

4.5 Estudos com modelos de membrana

Além da interação com a parede celular, os anfifílicos podem interagir com a membrana celular, estudos com modelos miméticos de membrana podem fornecer dados do potencial desses anfifílicos nestas interações. No estudo com membranas modelo as dispersões de vesículas foram preparadas conforme descrito no item 3.8.1, utilizando-se a L- α -Fosfatidilcolina e a mistura 80:20 (%) L- α -Fosfatidilcolina/L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol. Portanto dois modelos foram utilizados, um zwitteriônico de PC e outro contendo 20% de PG que fornece um potencial negativo ao modelo de membrana. As estruturas dos lipídeos utilizados estão apresentadas na figura 19.

Figura 19: Estruturas A: L- α -Fosfatidil-DL-Glicerol (PG); B: L- α -Fosfatidilcolina (PC).



Fonte: Adaptado de SIGMA, 2017.

4.5.1 Espalhamento de Luz Dinamico e Potencial Zeta

Experimentos de Espalhamento de Luz Dinâmica e Potencial Zeta possibilitaram monitorar as interações do polímero com as vesículas. O efeito da adição de quantidades crescentes dos anfifílicos no tamanho e potencial zeta dos modelos PC e PC:PG são apresentadas nas figuras abaixo.

Figura 20: Diâmetro das lipossomas zwitterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana desacetilada**.

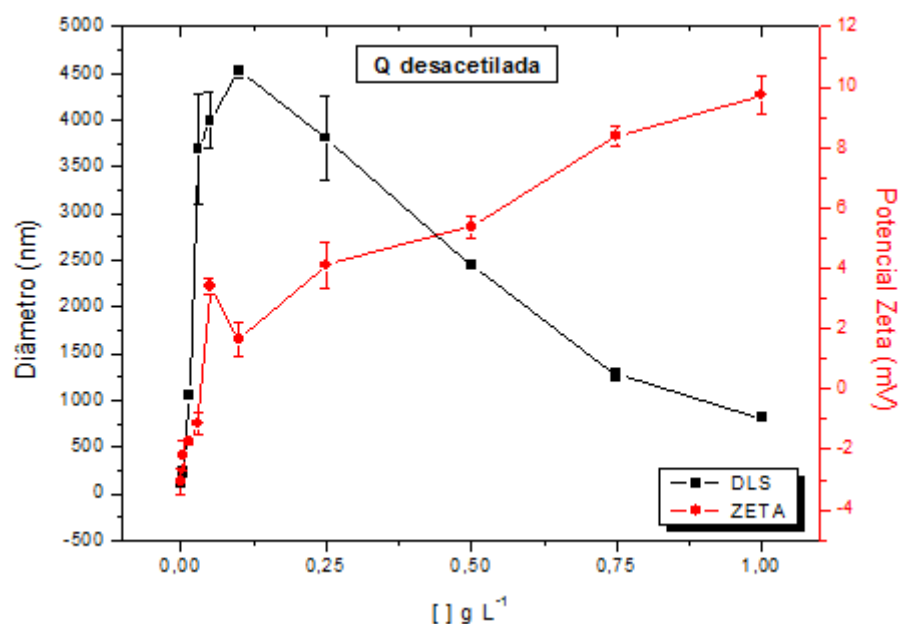
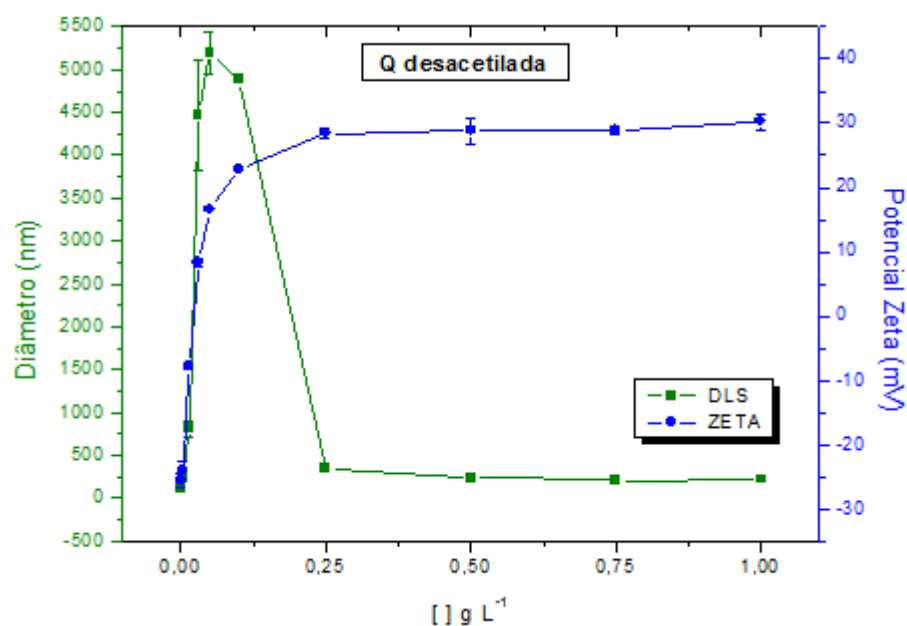


Figura 21: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana desacetilada**.



O primeiro gráfico, figura 20, mostra que para as lipossomas zwitteriônicas, a adição de quantidades crescentes de quitosana aumenta continuamente a carga superficial (em vermelho) atingindo valores positivos de + 10 Mv na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto o tamanho é afetado de forma diferente, e inicialmente verifica-se um aumento no diâmetro até $0,1 \text{ g L}^{-1}$ seguido de um decréscimo para maiores concentrações (em preto). O segundo gráfico, figura 21, mostra um comportamento semelhante para as lipossomas carregadas negativamente, porém devidos as fortes interações eletrostáticas entre o polímero carregado positivamente e a membrana negativamente, o aumento da carga superficial é mais abrupto e a estabilização da carga e do tamanho das vesículas ocorrem em uma faixa mais estreita de concentração. Esses resultados são similares aqueles reportados por Mertins e Dimova (2011), que propuseram que a quitosana pode interagir com vesículas zwitteriônicas ou carregadas negativamente formando agregados de tamanhos variados ou vesículas individuais recobertas com uma camada de cadeias de quitosana.

O estudo da interação com o derivado contendo grupos DEAE (Q 40% DEAE) mostrou resultados similares aos obtidos com a QD e são apresentados nas figuras 22 e 23. Entretanto, na interação com Q 40% DEAE os tamanhos das vesículas de PC aumentaram continuamente com a concentração. Os resultados da CAC medidos anteriormente mostraram que em pH 5,0 Q 40% DEAE é ligeiramente mais hidrofóbico que quitosana desacetilada, e devido ao longo tamanho das cadeias, podem por meio de seus agregados induzir interações mais fortes com PC de forma mais lenta e apaziguando as interações intermoleculares dos polímeros, chegando ao valor final de $\sim 200 \text{ nm}$ de forma gradativa, diferentemente da QD.

Para as vesículas aniônicas, é esperada a observação do efeito da interação eletrostática mais acentuada pela presença de cargas negativas na superfície da membrana. Isto foi evidenciado pelo rápido aumento no potencial zeta, que atinge o valor de + 15 Mv na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Esta forte adesão à superfície das vesículas negativas, e o rápido aumento da carga superficial, com consequente inversão de carga, pode levar a repulsão das vesículas, com decréscimo nos tamanhos como mostra o traço verde da figura 23 para PC:PG.

Figura 22: Diâmetro das lipossomas zwitterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana com 40% de grupos DEAE**.

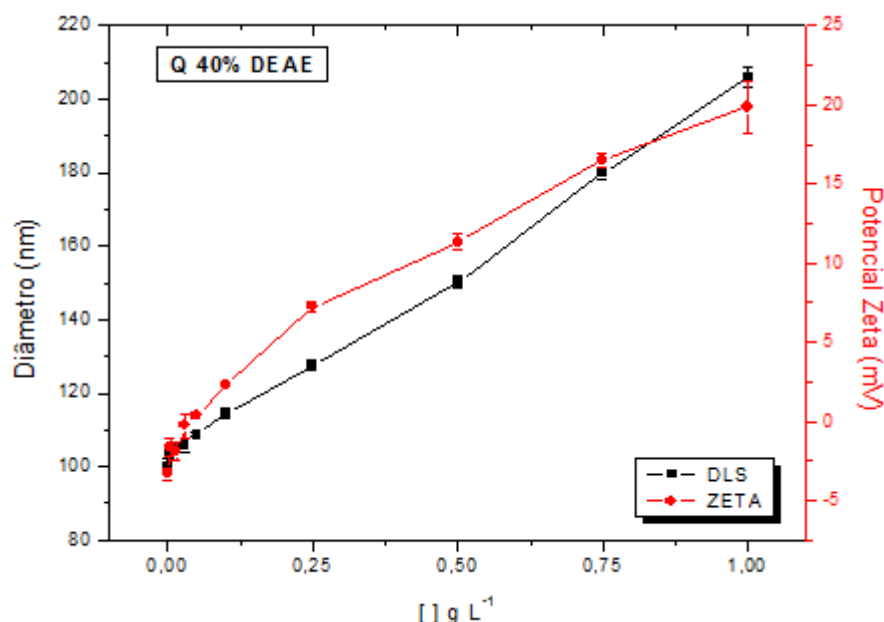
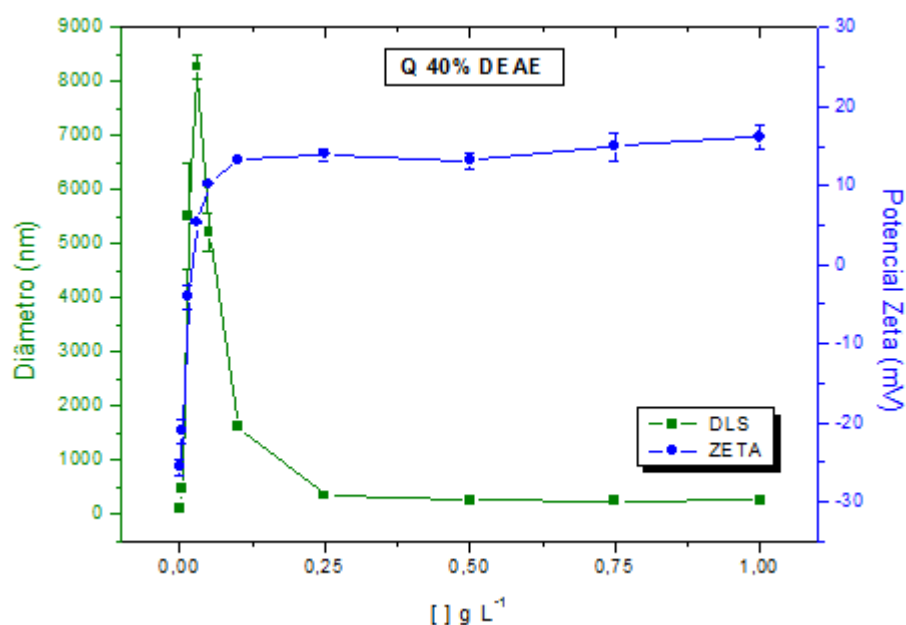


Figura 23: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC: PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana com 40% de grupos DEAE**.



O efeito da interação dos anfifílicos (QD 40% DEAE 19% DD 136 kDa a QD 40% DEAE 20% DD 8 kDa) nas propriedades das vesículas é similar para todos os derivados. Além das interações eletrostáticas, a presença dos grupos dodecil aumenta a força de

interação e para todos os derivados o potencial zeta aumenta bruscamente devido a adsorção das cadeias na superfície das vesículas (Figuras 24 a 29). Entretanto para os derivados de maior massa molecular o aumento do potencial zeta é mais abrupto, e valores positivos variando de + 25 a + 27 mV são obtidos para concentrações da ordem de 0,05 a 0,1 g L⁻¹. Esses aumentos abruptos de potencial de superfície são acompanhados por uma rápida inversão nos tamanhos, que inicialmente aumentam para baixas concentrações dos anfifílicos seguido de um decréscimo para concentrações maiores que 0,2 g L⁻¹. Embora as vesículas PC:PG apresentem potencial negativo, as diferenças entre PC e PC:PG são discretas e na interação com os anfifílicos de maior massa (136 e 116 kDa) o potencial PC:PG é ligeiramente mais positivo.

Figura 24: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 136 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.

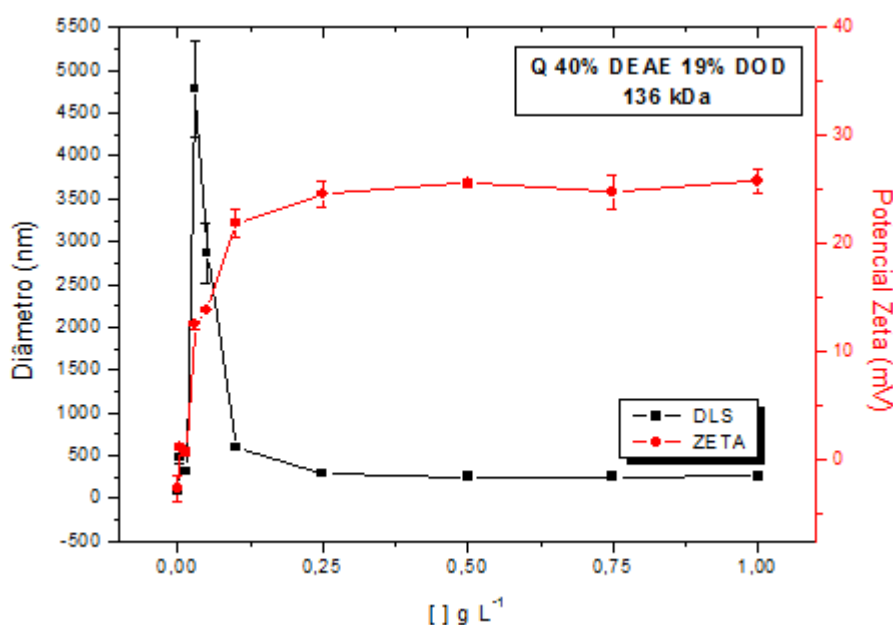


Figura 25: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC: PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 136 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.**

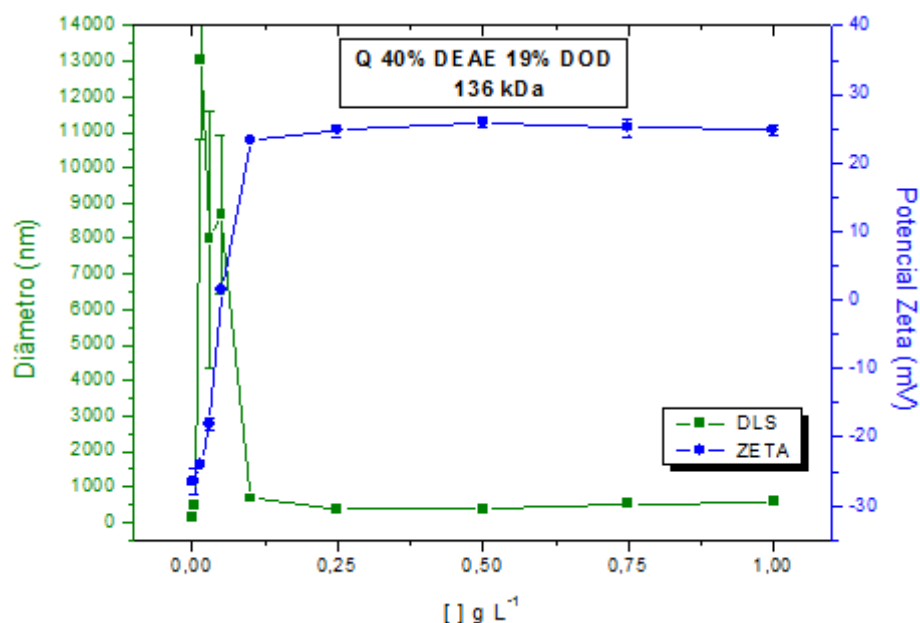


Figura 26: Diâmetro das lipossomas zwitterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 116 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA.**

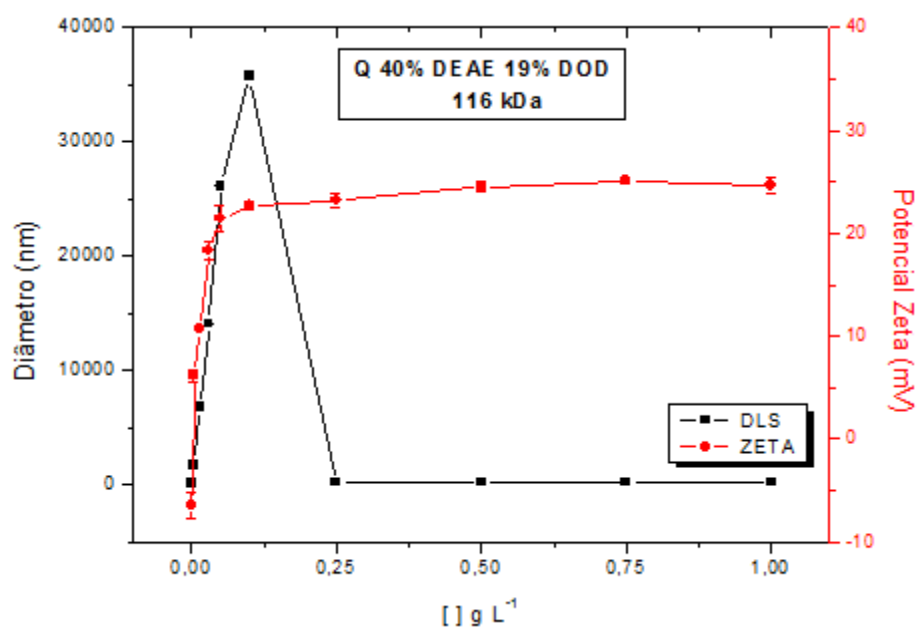


Figura 27: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 116 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.

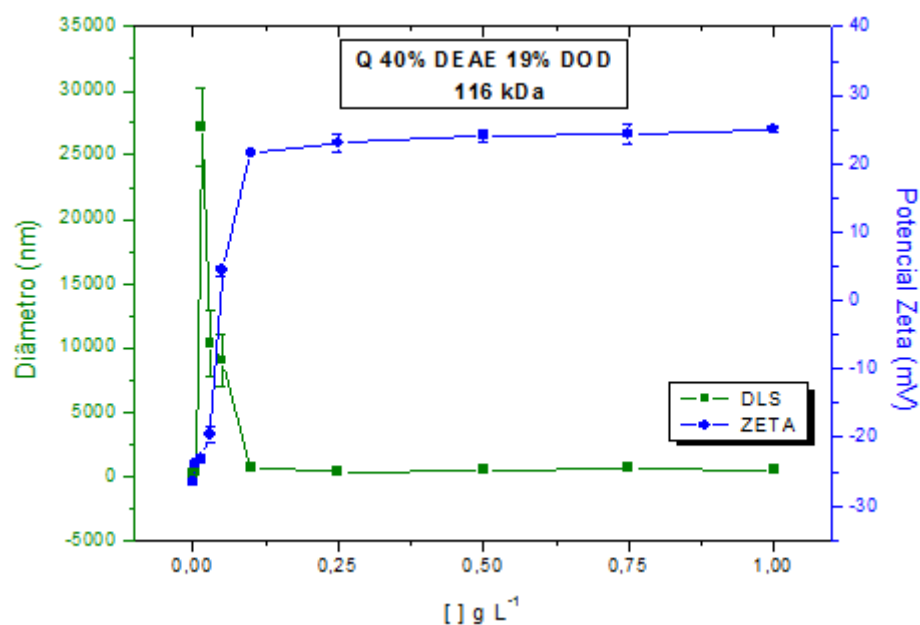


Figura 28: Diâmetro das lipossomas zwitterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 60 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.

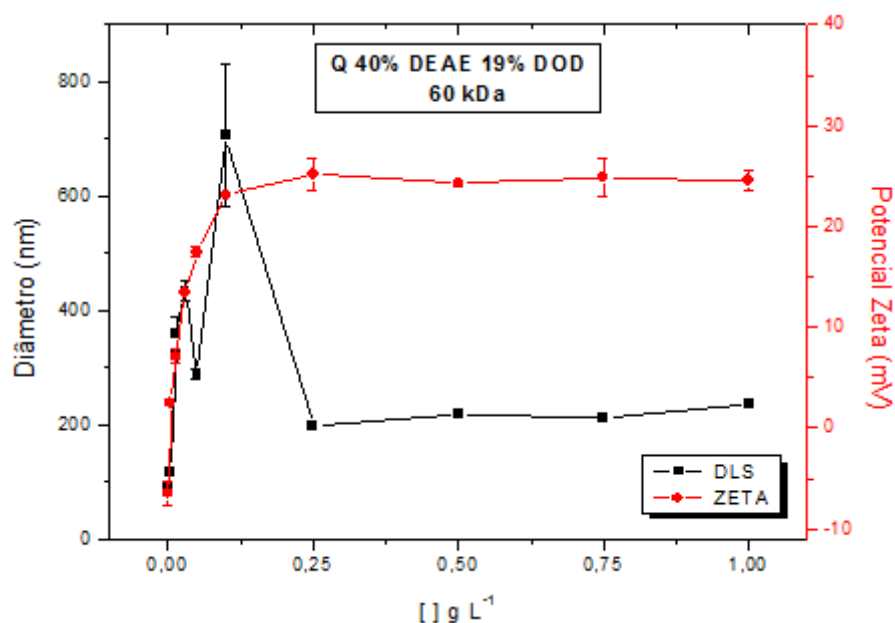
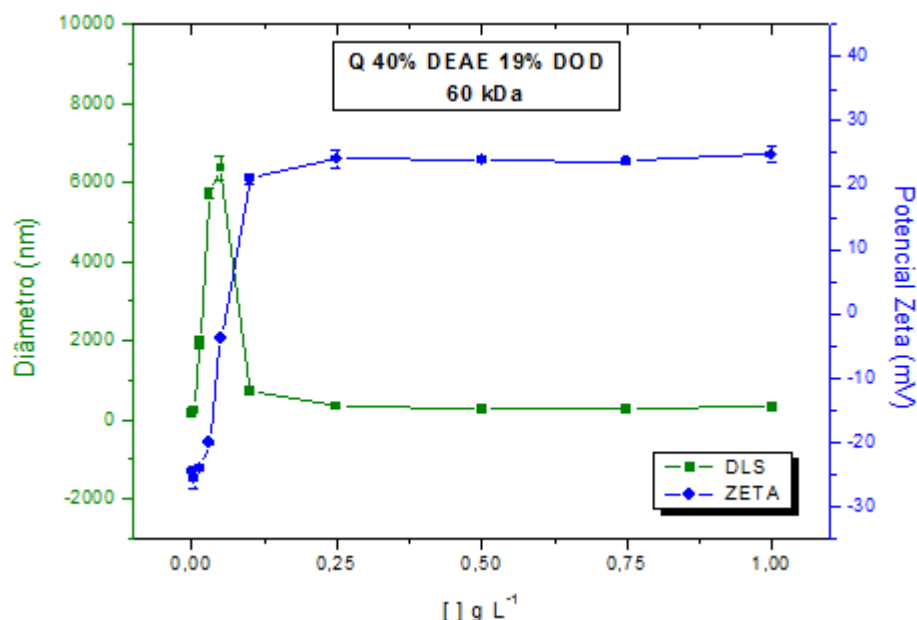


Figura 29: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 60 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.



A interação dos anfifílicos de menor Mw (Mw 25 e 8 kDa) mostra claramente que a carga superficial desempenha um papel mais efetivo nessas faixas de Mw. Como pode ser observado das figuras 30 e 32 as interações desses anfifílicos com a vesícula zwitteriônica, além de induzirem um aumento menos abrupto do potencial zeta, provocam um aumento contínuo no tamanho dos agregados. Entretanto, a interação com PC:PG segue o mesmo padrão observado com os anfifílicos de maiores massas moleculares. Esse comportamento indica que a força de interação tem um papel importante no revestimento e agregação, ou seja, a agregação das vesículas é afetada pela dinâmica da interação com a superfície. Para os derivados de menor Mw a interação é mais efetiva e o aumento mais gradativo do potencial é capaz de impedir a associação de vesículas para formação de agregados maiores, mesmo em altas concentrações.

Figura 30: Diâmetro das lipossomas zwiterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 25 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.

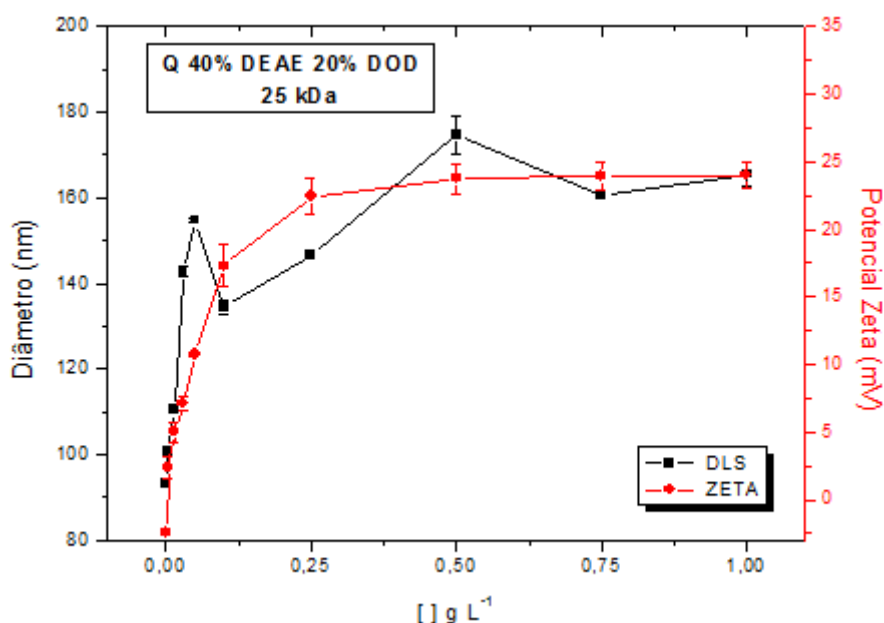


Figura 31: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 25 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 19% de grupos DODECILA**.

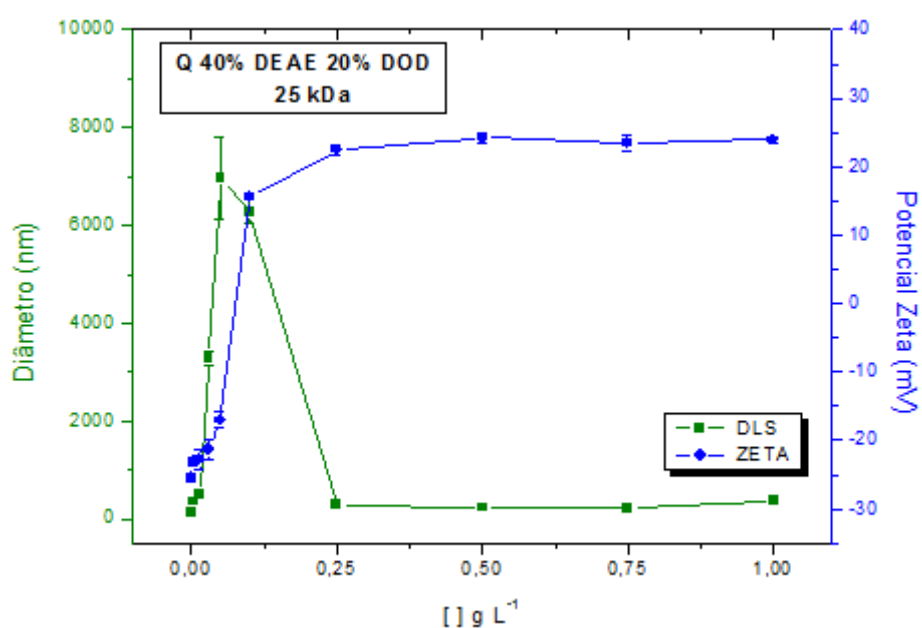


Figura 32: Diâmetro das lipossomas zwitterionicas (PC) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 8 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 20% de grupos DODECILA**.

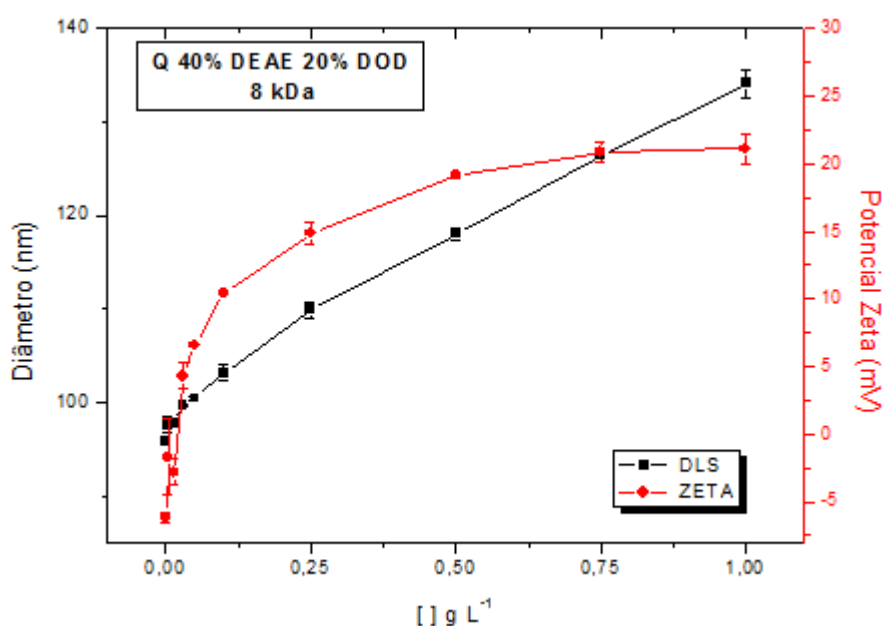
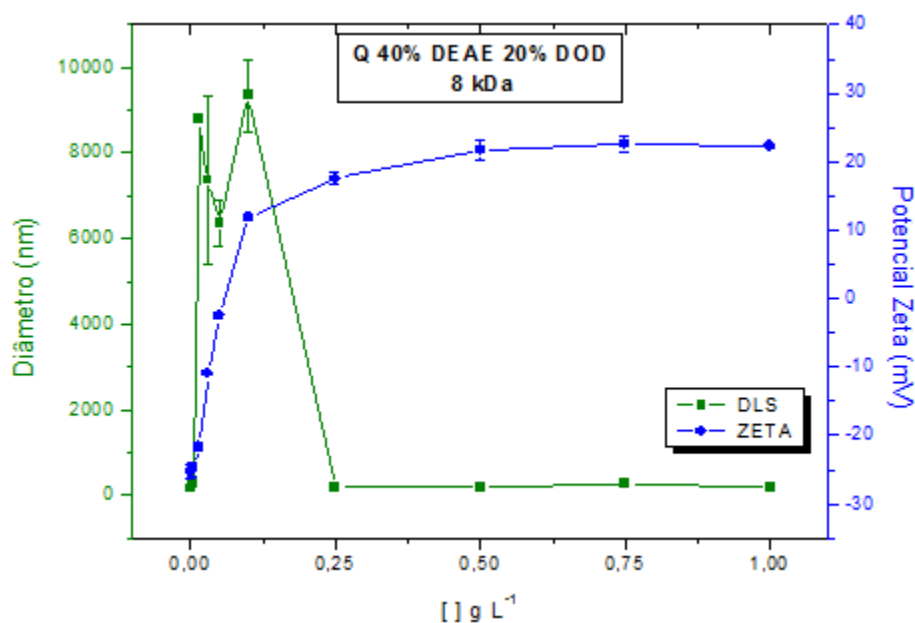
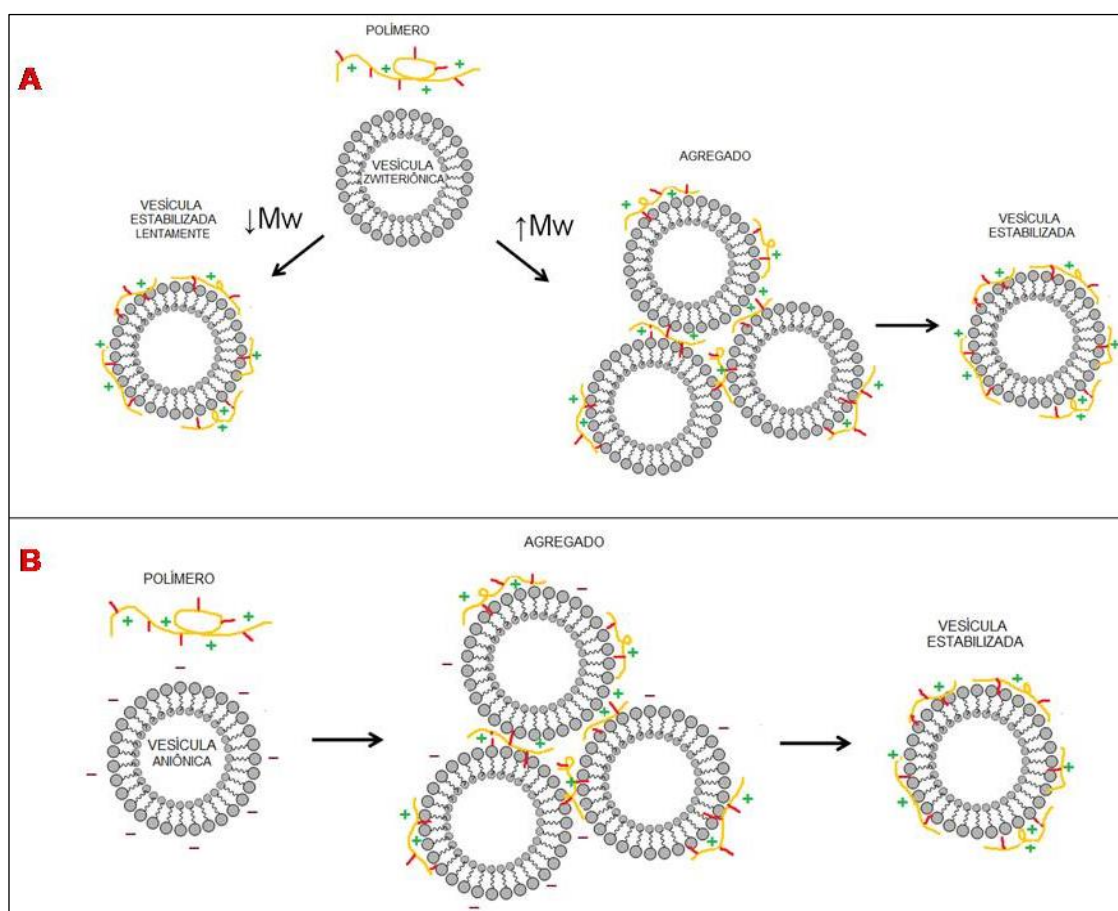


Figura 33: Diâmetro das lipossomas aniônicas (PC:PG) e potencial superficial em concentrações crescentes de **quitosana de Mw de 8 kDa modificada com 40% de grupos DEAE e 20% de grupos DODECILA**.



Os resultados obtidos permitem postular um modelo de interação que depende principalmente da massa molecular e da carga superficial da vesícula. Para as vesículas zwitteriônicas a interação com a superfície depende mais criticamente da Mw, para os anfifílicos de baixa Mw (Mw 25 e 8 kDa) a interação leva a formação de vesículas estabilizadas pelo polímero de forma mais gradativa, sem a formação de grandes agregados. Para os derivados de maiores Mw as interações são mais fortes e o aumento abrupto do potencial zeta leva a desagregação das vesículas. Embora mais intenso, este mesmo comportamento é observado na interação das vesículas PC:PG com todos os anfifílicos, independente da Mw, o que confirma que a força de interação eletrostática comanda adsorção na superfície da vesícula. Esse comportamento é ilustrado de forma esquemática na figura 34, sendo confirmado por experimentos de vazamento de conteúdo fluorescente apresentados na seção seguinte.

Figura 34: Esquema do mecanismo de interação polímero quitosana em concentrações crescentes do polieletrólito. A: interação vesículas zwitteriônicas - polímero. B: interação vesículas aniônica - polímero.



Fonte: Autoria própria.

4.5.2 Indução de Vazamento do marcador fluorescente

Estudos de vazamento foram conduzidos com vesículas de PC:PG contendo em seu poço aquoso fluoresceína, um corante fluorescente. No interior do poço aquoso a fluorescência da sonda é suprimida devido a auto agregação dos lipídios da membrana. É conhecido da literatura que moléculas anfifílicas e peptídeos induzem danos em modelos de membrana, que podem ser detectados pelo aumento da fluorescência (DOS SANTOS CABRERA, 2008). Portanto, interações dos anfifílicos com PC:PG que levem ao vazamento, são uma indicação de ruptura da membrana e podem ser detectados pelo aumento da fluorescência. A fluorescência foi monitorada em misturas de PC:PG com os polímeros anfifílicos de maior e menor Mw.

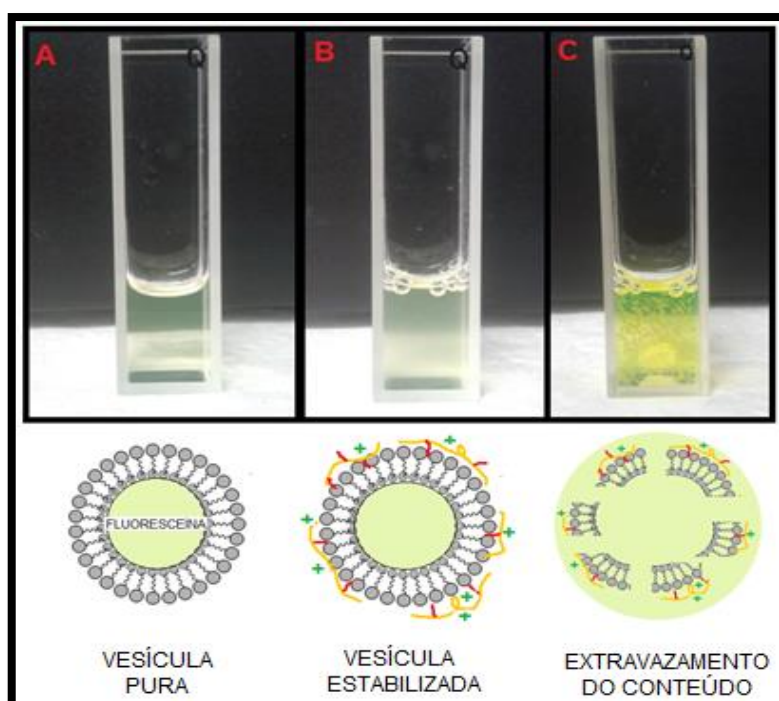
As intensidades da fluorescência antes da adição do polímero são apresentadas como controle negativo (-) e a intensidade após a indução do rompimento das vesículas induzidas pelo surfactante Triton X-100 a 1% como controle positivo (+). O esquema geral do experimento é mostrado na figura 35.

Os resultados da intensidade de fluorescência na ausência e presença dos anfifílicos de 136 e 8 kDa são apresentados respectivamente nas figuras 36 e 37. Os anfifílicos foram adicionados nas concentrações de 0,03, 0,25 e 1,0 g L⁻¹. A contrário do que se observa com o controle positivo (vesícula + anfifílico + Triton X) as intensidades após a adição dos polímeros induzem uma diminuição da intensidade da fluorescência, que pode estar relacionada com um aumento no espalhamento de luz decorrente da presença de agregados, indicando entretanto, que mesmo na maior concentração utilizada (1 g L⁻¹), a tendência do polímero é interagir superficialmente, sem desestruturação da bicamada lipídica da lipossoma, visto que em nenhuma das concentrações houve o aumento da fluorescência (barras vermelhas nos gráficos das figuras 36 e 37).

Além disso, a adição do surfactante (controle positivo) nas misturas anfifílico-vesículas mostram intensidades que são gradativamente menores com o aumento da concentração dos anfifílicos. Estes resultados indicam que tanto os anfifílicos de alta massa molecular (136 kDa) como aqueles de baixa massa (8 kDa) não levam a formação de poros nos modelos de membrana. Portanto, os resultados obtidos com a fluorescência corroboram os resultados de DLS, mostrando que realmente nessa faixa de concentração, ocorre uma estabilização das lipossomas pela adesão de polímero à superfície das mesmas. Os resultados aqui obtidos são similares aqueles obtidos por Tan e colaboradores (2015) que estudaram as

interações de vesículas de PC-Tween-80 com quitosanas de 200 kDa e observaram que a interação da quitosana com a lipossoma forma uma camada densa que reveste toda a superfície da membrana alterando propriedades como a fluidez, permeabilidade, carga superficial e reatividade.

Figura 35: Esquema geral do mecanismo do experimento de indução do vazamento do conteúdo fluorescente. Sendo A: controle negativo (branco), B: após a adição da solução de polímero (Q 40%DEAE 20%DOD 1 g L⁻¹) e C: controle positivo (Triton X-100).



Fonte: Autoria própria.

Figura 36: Gráfico da relação entre as intensidades de fluorescência da dispersão das vesículas de PC:PG nas diferentes concentrações de quitosana Mw de 136 substituída com 40 % de grupos DEAE e 20 % de grupos DODECILA.

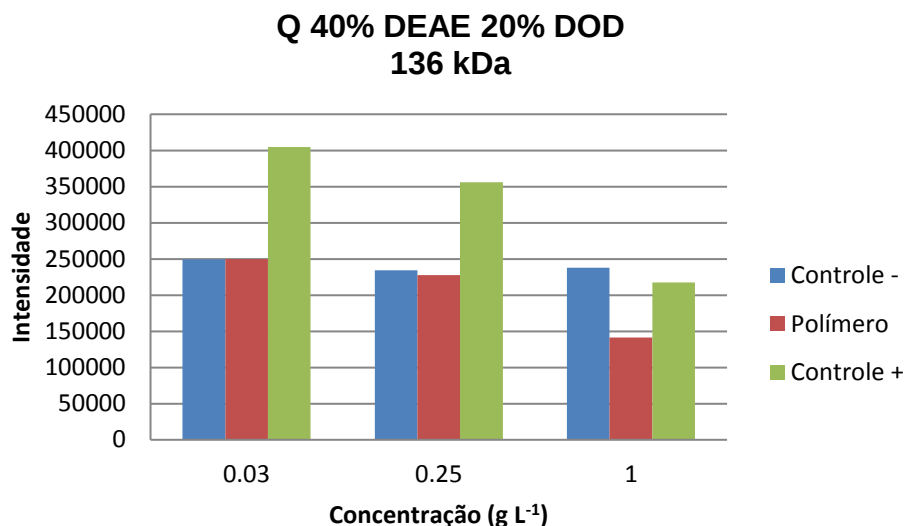
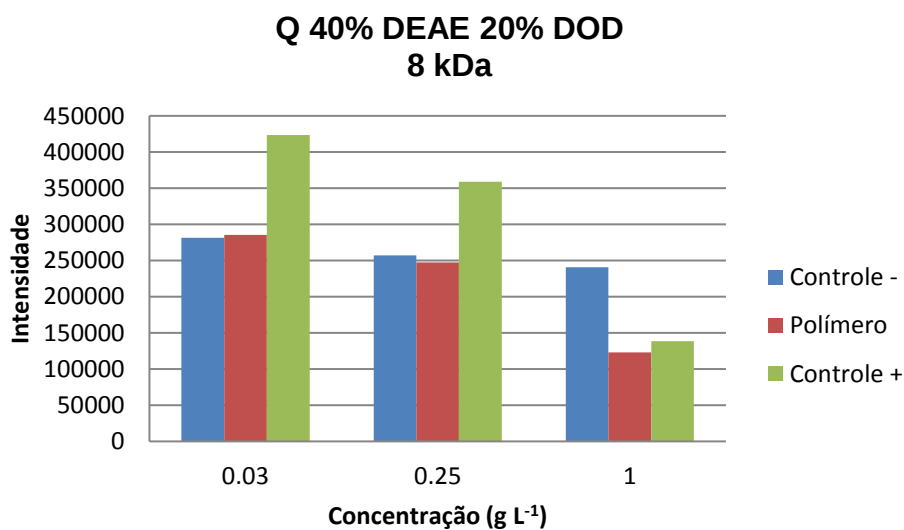


Figura 37: Gráfico da relação entre as intensidades de fluorescência da dispersão das vesículas de PC:PG nas diferentes concentrações de quitosana Mw de 8 kDa substituída com 40 % de grupos DEAE e 20 % de grupos DODECILA.



4.6 Marcação dos Derivados com Rodamina e Determinação do grau de substituição

De acordo com o procedimento descrito no item 3.9.1 os derivados de quitosana foram sinalizados com a sonda fluorescente rodamina. A porcentagem de substituição foi determinada pela construção de uma curva padrão de calibração pela qual determinou-se o coeficiente de absortividade molar ($7,2 \times 10^4 \text{ M cm}^{-1}$) e a equação da reta, possibilitando calcular a concentração de rodamina pela absorbância obtida com a solução dos derivados de quitosana marcados. As porcentagens de rodamina substituídas (%R) foram determinadas utilizando-se a equação:

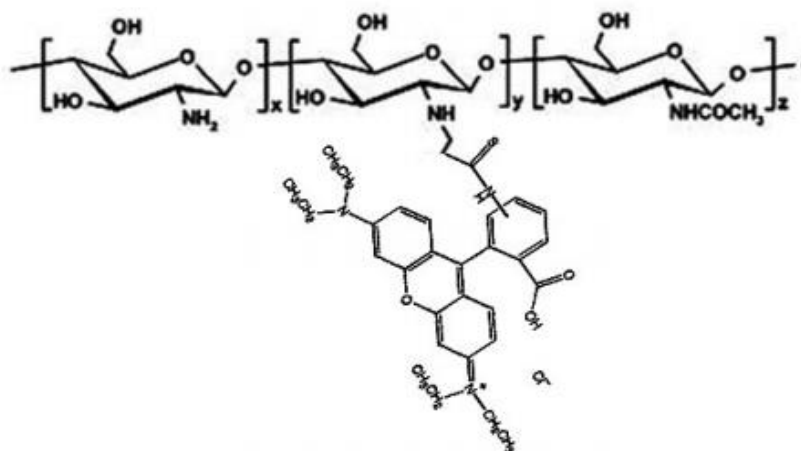
$$\%R = \left(\frac{n_r}{n_q} \right) \times 100$$

Onde n_r é o número de mols de rodamina e n_q é o número de mols de quitosana. As porcentagens de substituição obtidas são apresentadas na tabela.

Tabela 5: Porcentagens de substituição de dodecila nos diferentes derivados de quitosana e estrutura final obtida.

Polímero	Absorbância	% de substituição
Q 40 % DEAE	1,34	0,85
Q 40% DEAE 19% DOD 136 kDa	0,84	0,52
Q 40% DEAE 19% DOD 116 kDa	1,29	0,82
Q 40% DEAE 19% DOD 60 kDa	1,23	0,78
Q 40% DEAE 19% DOD 25 kDa	1,26	0,79
Q 40% DEAE 19% DOD 8 kDa	1,04	2,67

Figura 38: Estrutura da quitosana substituída com rodamina B.

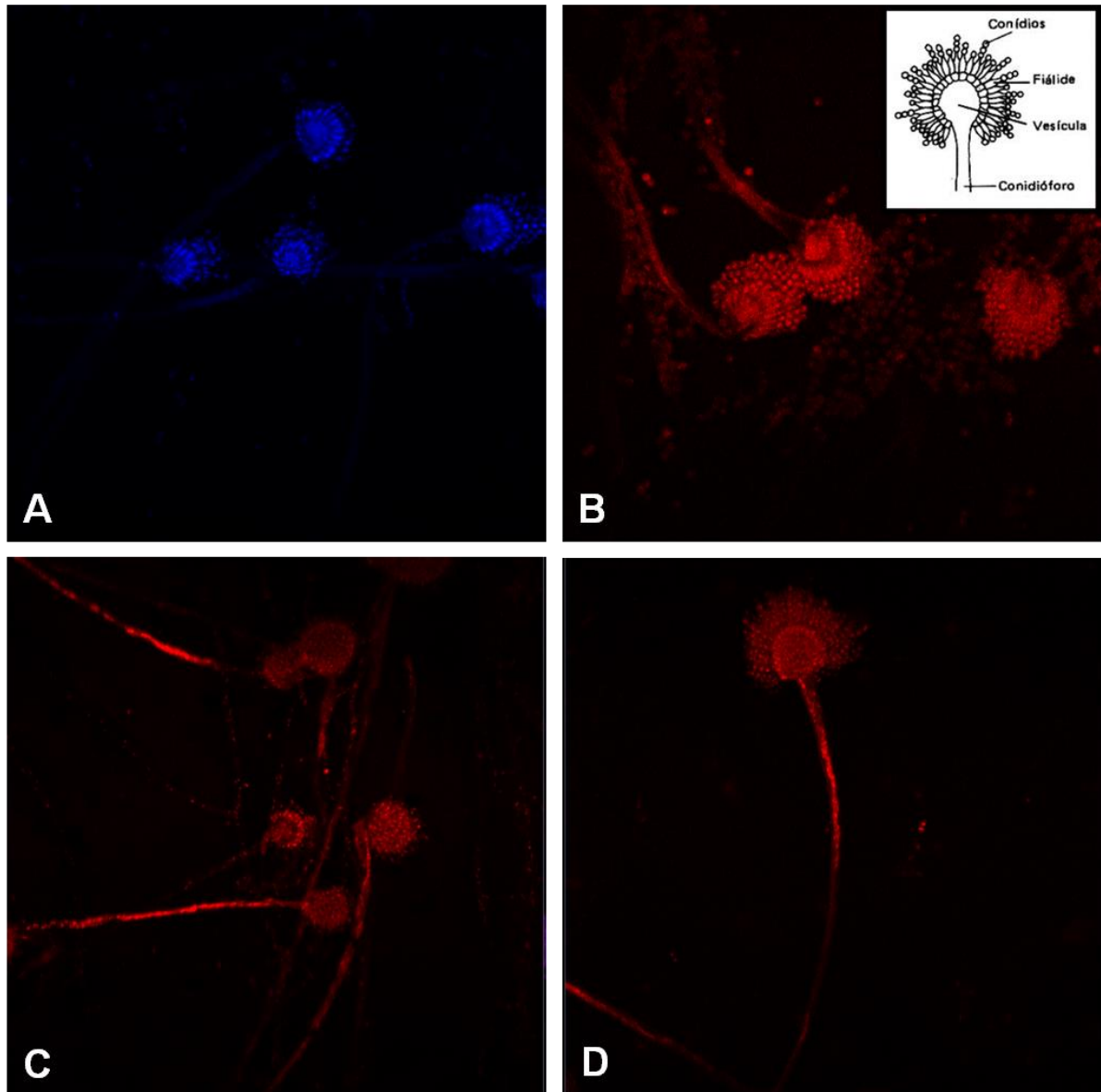


Fonte: Adaptado de PICOLA, 2009.

4.7 Microscopia Confocal a Laser

A microscopia confocal foi utilizada para observar os locais de maior interação entre os polímeros e as hifas e investigar as diferenças que as modificações estruturais poderiam causar nessas interações. As imagens obtidas estão apresentadas na figura 39. Os resultados mostram que tanto a quitosana 40% DEAE, como as quitosanas anfifílicas aderem fortemente na superfície das fiálides e conídios, porém foi observado que os derivados anfifílicos apresentaram interações mais efetivas com os conidióforos, possivelmente pela maior hidrofobicidade do polímero em relação ao Q 40% DEAE. Entretanto, as imagens não permitiram distinguir claramente diferenças na eficiência de adesão, sendo que para os anfifílicos Q 40% DEAE 19% DOD 136 kDa e Q 40% DEAE 20% DOD 8 kDa, as imagens sugerem apenas uma maior intensidade da fluorescência nos conidióforos (imagens C e D) não sendo possível distinguir se o aumento da fluorescência observado se deve a interações polímero-célula superficiais ou intracelulares

Figura 39: Imagens da microscopia do fungo nos diferentes meios. A: Controle (ausência de polímero); B: Q 40% DEAE; C: Q 40% DEAE 19% DOD 136 kDa e D: Q 40% DEAE 20% DOD 8 kDa.



Esquema representativo das estruturas da hifa obtido em:

<http://www.bemposta.net/cogumelos/cogfungos.htm>

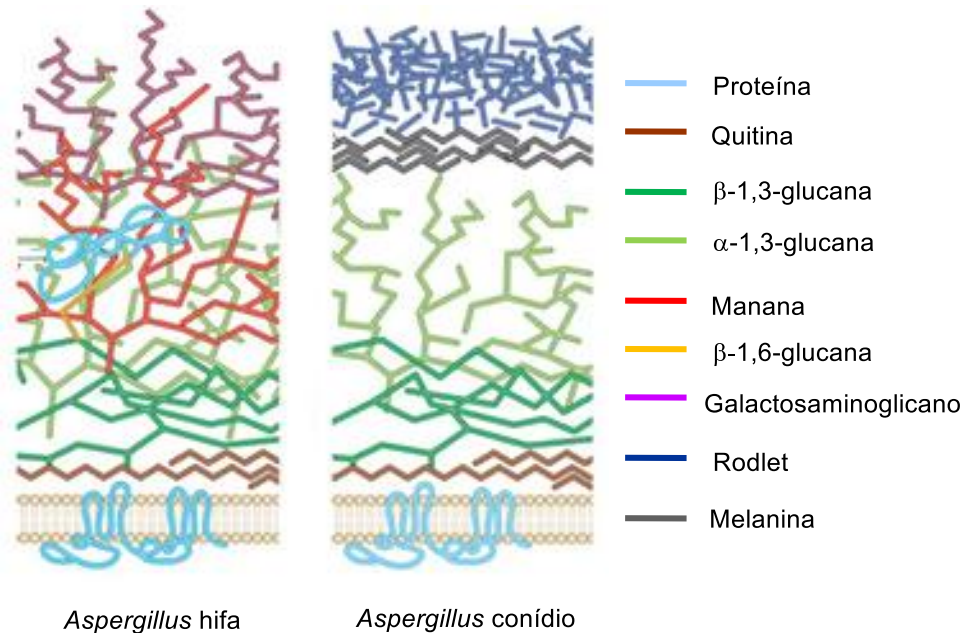
4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) tem sido muito empregada na obtenção de informações relativas à elucidação do mecanismo de ação de antimicrobianos (ZHANG et al., 2008; SHAO et al., 2013). Desta forma, para investigar o mecanismo de ação dos derivados, as células foram tratadas durante 3 dias com as quitosanas, e em seguida preparadas e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão.

Na figura 40, é exibido uma representação da estruturação dos constituintes da parede celular do *A. flavus* conídio e hifa. Uma explicação bastante provável para o mecanismo de inibição pode ser postulado considerando-se os efeitos de desestruturação causados pelas quitosanas anfifílicas na parede celular e possivelmente na membrana.

A hifa apresenta proteínas hidrofóbicas enoveladas na parede celular e membrana celular, além disso, os conídios possuem em sua superfície uma camada de “Rodlets” que tem como funções sugeridas a de atuar na proteção à desidratação além de evitar o reconhecimento pelo sistema imune, formadas essencialmente por estruturas denominadas hidrofobinas, que como o nome sugere, apresentam natureza hidrofóbica (KIM, 2016; AIMANIANDA et al., 2009). Portanto, nos conídios, os anfifílicos podem interagir fortemente com os Rodlets expondo a parede à interações hidrofóbicas que podem desfuncionalizar as células. Além disso, os polissacarídeos e glicoproteínas da parede celular podem interagir com a quitosana anfifílica eletrostaticamente, favorecendo a formação de agregados, culminando na desestruturação da parede celular (NOSANCHUK; STARK; CASADEVALL, 2015).

Figura 40: Representação da estruturação dos constituintes da parede celular do *A. flavus* conídio e hifa.



Fonte: Adaptado de ERWING e GOW, 2016.

Como mostrado nas figuras 41 A e B (célula sadia), as estrutura das hifas apresentam parede regular com seus componentes distribuídos de maneira uniforme ao redor da membrana. Entretanto o fungo tratado com a quitosana Q 40% DEAE (figuras 41 C e D) mostram estruturas mais agregadas, provavelmente decorrentes das interações acima mencionadas com os constituintes da parede celular. Esses mesmos agregados são observados ainda mais evidentemente para as células tratadas com os anfifílicos de 136 kDa (Figura 42 E, F) e de 8 kDa (Figura 42 G, H). Além disso, a imagem da Figura 42 F exibe uma possível desestruturação na membrana que sem dúvida afeta a viabilidade celular. Portanto, a interação da quitosana pode ter afetado as funções biológicas da célula pela desestruturação da parede celular visto sua importância, para proteção contra desidratação (principalmente nos conídios), adesão, sustentação celular e proteção contra o ataque de patógenos. (MADIGAN et al., 2010).

Figura 41: Imagens obtidas de Microscopia Eletrônica 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.

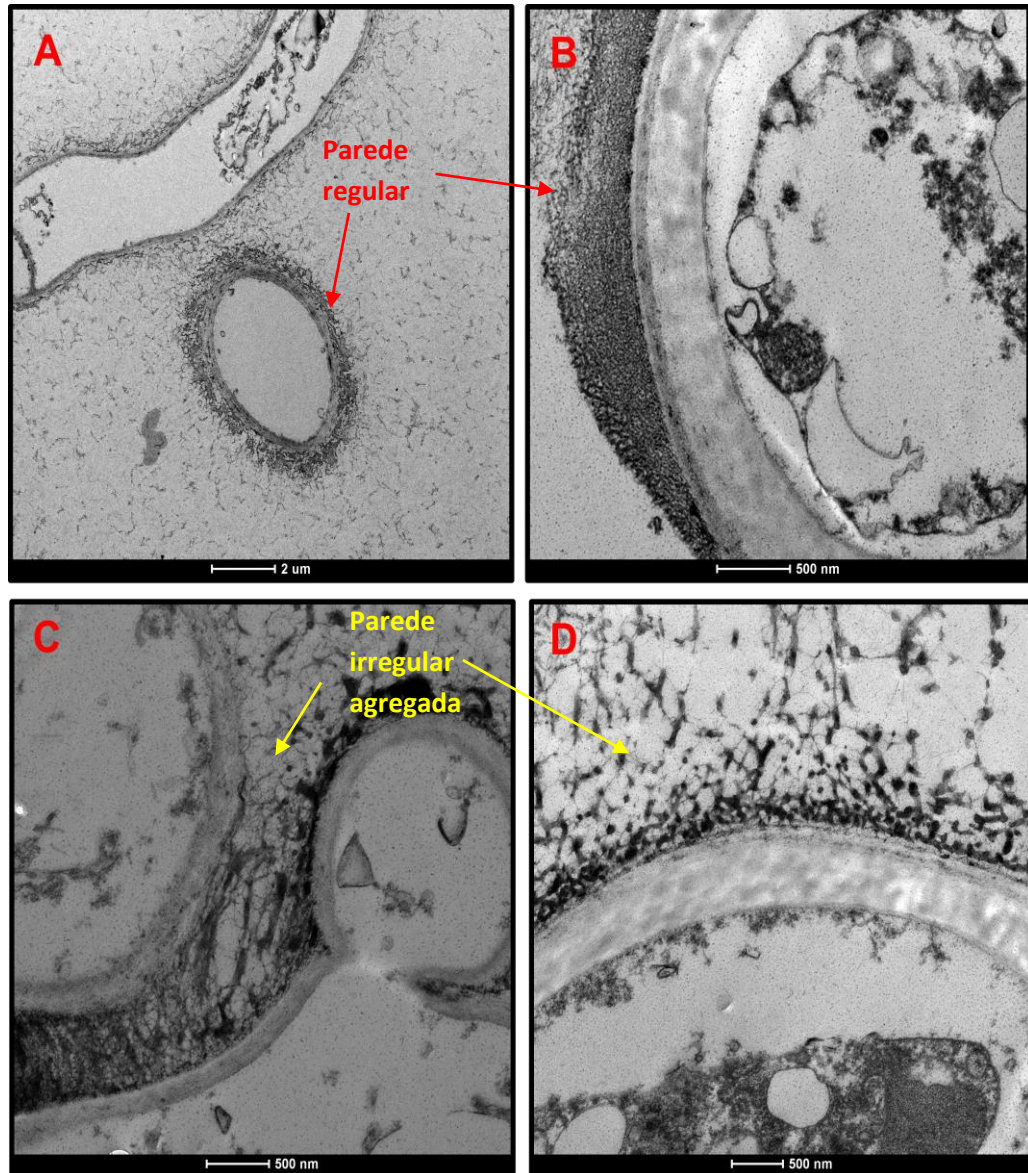
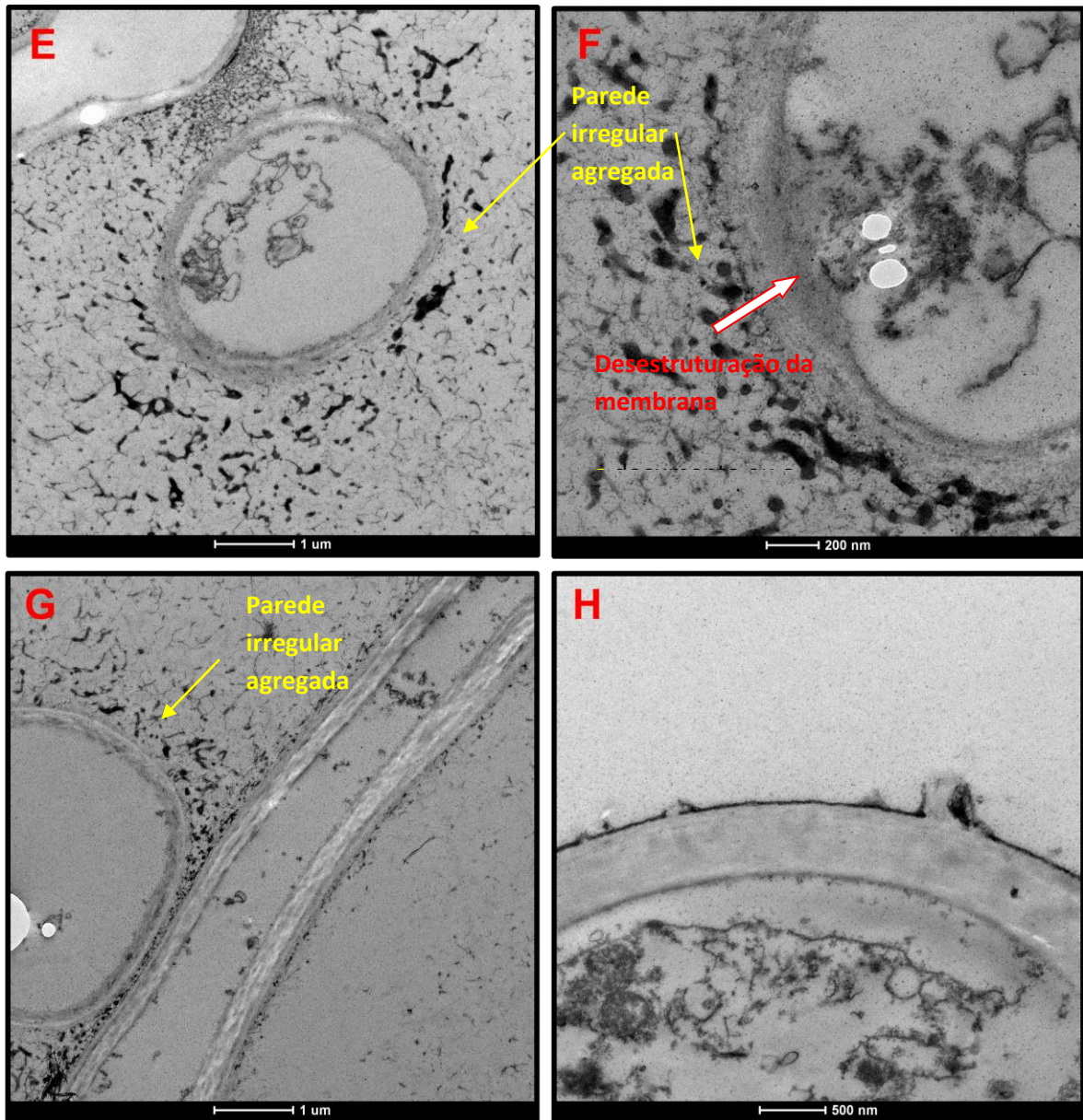


Figura 42: Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão das hifas do fungo *A. flavus* onde E e F são hifas crescidas na presença de Q 40% DEAE 19% DOD Mw 136 kDa e G e H na presença de Q 40% DEAE 20% DOD Mw 8 kDa.



5 CONCLUSÃO

A síntese dos derivados anfifílicos de quitosana ocorreu de maneira eficiente pelo ataque ao grupo nitrogênio das unidades desacetiladas de quitosana, portanto quitosanas com altos graus de desacetilação são interessantes para as reações propostas. As modificações foram confirmadas e mensuradas pelos espectros de FTIV e RMN¹H. A degradação da cadeia polimérica por oxidação em meio ácido mostrou-se viável e precisa, sendo confirmado pelos cromatogramas. Os estudos em solução dos derivados mostraram que quanto menor a cadeia polimérica maior a concentração de formação dos agregados de quitosana e esse fato pode estar diretamente relacionado á eficiência antifúngica já que os derivados com maiores CAC também apresentaram os melhores índices de inibição, estes também foram dependentes da concentração do polímero no meio.

Os estudos com modelos de membrana mostraram que os derivados de quitosana tendem a formar agregados grandes em concentrações abaixo da CAC e estabilizam as lipossomas em concentrações maiores. Os experimentos de indução do vazamento do conteúdo fluorescente confirmaram que a interação polímero-lipossoma não envolve ruptura da estrutura vesicular para as Mw estudadas.

A microscopia confocal a laser mostrou que a Q 40% DEAE interage preferencialmente com os conídios do *A. flavus* enquanto os derivados anfifílicos de quitosana interagem também com as hifas possivelmente pela intensificação das interações hidrofóbicas. A microscopia eletrônica de transmissão permitiu verificar que a ação efetiva dos derivados de quitosana ocorre por interações com a parede celular, mostrando que os polímeros agem por desfuncionalização da parede vulnerabilizando a célula.

6 REFERÊNCIAS

AIMANIANDA, V. et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. **Nature letters**, v. 460, n. 27, p. 1117-1121, 2009.

ANVISA a- Agência Nacional de Vigilância Sanitária- **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Copyright© 2014.

ANVISA b- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Limites para a presença de micotoxinas em alimentos, 2011**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/25_02.pdf. Acesso em 14 de abril de 2015.

ANVISA; UFPR 2012 apud **DOSSIÊ ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4ª ed. Viçosa: UFV, 2008.

ARCHILHA, N. L. **Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolípidios**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Física, Departamento de Física Aplicada, São Paulo, 2008.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais, **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest biology technology**, v. 51, p. 110-117, 2009.

BRASIL. **Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos)**. Brasília, Diário Oficial da União, 12 jul. 1989.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação da quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, p. 169-173, 2001.

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

COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. The use of tannic acidglutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technology**, v. 51, p. 7-11. 1976.

COUTINHO, W. M. et al. **Eficácia de Misturas de Fungicidas Químicos na Micobiota e na Qualidade Fisiológica de Sementes de Mamoneira**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, p. 07, 2012.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **European Biophysics Journal**, v. 37, p. 879-891. 2008.

DOSSIÊ ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

EMBRAPA, 2010- Disponível em:
http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/colpragas.htm Acesso em 20 de abril de 2015.

ERWING, L. P., GOW, N. A. R., Interations of fungal pathogens with phagocytes. **Nature Reviews microbiology**, v. 14, n. 3, p. 163-176. 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. As micotoxinas. Número 7, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>. Acesso em 15 de abril de 2015.

GABRIEL, J. S. **Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados Anfífilos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. Dissertação (Mestrado em Química – Área de concentração: Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2013.

GABRIEL, J. S. et al. Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl-Chitosan Against *Aspergillus flavus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5725-5731, 2015.

GURGEL, L. V. A., **Hidrolise ácida de bagaço de cana de açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

<http://www.bemposta.net/cogumelos/cogfungos.htm> acessado em: 25/08/2016

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L., 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. H. et al. A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. **Reactive and functional polymers**, v. 59, p. 41-51, 2004.

IGNATOVA, M. et al. Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly (vinyl alcohol). **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2098-2107, 2006.

KENAWY, E. R. et al. Biologically active polymers: VII. Synthesis and antimicrobial activity of some crosslinked copolymers with quaternary ammonium and phosphonium groups, **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 419-429, 2006.

KIM, K. W., High-resolution imaging of the microbial cell surface. **Journal of microbiology**, v. 54, n. 11, p.703-708, 2016.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of Fungi**, 10 ed. United Kingdom: Cabi Europe, p. 771, 2008.

KONG, M. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. **Frontiers of Material Science in China**, v. 2, p. 214-220. 2008.

KONG, M., CHEN, X. G., XING. K., PARK, H. J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 51-63, 2010.

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. 3, n. 74, p. 169-178, 2014.

LI, M. et al. Molecular weight-dependent antifungal activity and action mode of chitosan against *Fulviafulva*(Cooke) Ciffri. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, p. 3127-3135, 2011.

LIM, S.H., HUDSON, S. M., Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 313-319, 2004.

MA, O. et al. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. **Carbohydrate polymers**, v. 72, p. 616-624, 2008.

MACHADO, L. C. et al. LIPOSSOMAS APLICADOS EM FARMACOLOGIA:Uma revisão da literatura. **Estudos de biologia**. v. 29, n. 67, p. 215-224, 2007.

MADIGAN, M.T. et al. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALVERN, 2017- <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/> <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/zeta-potential/>
Acessado em: 06/04/2017.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. et al. Chitosan composite films: Thermal structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305-315, 2010.

MARTINS, L. R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química, Belo Horizonte, 2009.

MERTINS, O.; DIMOVA, R. Insights on the interactions of chitosan with phospholipid vesicles. Part II: Membrane stiffening and pore formation. **Langmuir**, v. 29, p. 14552-14559, 2013.

MI, L.; JIANG, S. Integrated Antimicrobial and Nonfouling Zwitterionic Polymers, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 1746- 1754, 2014

NAIK, B.S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Host growth characteristics influenced by seed inoculation with microorganisms. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.4, p.891-895, 2008.

NOGUEIRA, J.H.C. et al. *Ageratum conyzoides* essential oil as a toxin suppressor of *Aspergillus flavus*. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 137, p. 55-60, 2010.

NOSANCHUK, J. D.; STARK, R. E.; CASADEVALL, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? **Frontiers in microbiology**. v.6, p. 1463, 2015.

PEDRO, R. O. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, p. 50-55, 2013.

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

RABEA, E. I. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of action, **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

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

SAGGIORATO, A. G. et al. Antifungal Activity of Basil Essential Oil (*Ocimum basilicum* L.): Evaluation In Vitro and on an Italian-type Sausage Surface. **Food Bioprocess Technology**, v.5, p. 378-384, 2012.

SANTOS, J. E. **Preparação, caracterização e estudos termooanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. 124f. Tese (Doutorado em) - Departamento de Química, Universidade federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2004.

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, p. 139-148, 2008.

SHAO, X. The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1642-1649, 2013.

SIGMA: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p3556?lang=pt®ion=BR>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8318?lang=pt®ion=BR> Acessado em 06/04/2017.

SOUSA, A. S. **Cromatografia de permeação em gel em escala semi-preparativa aplicada à caracterização, purificação e fracionamento do ácido hialurônico produzido por cultivo de microorganismos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Fortaleza- CE, 2007.

TAKAKI, M. **Estudo físico-químico da atividade fungicida de derivados anfifílicos de quitosana contra fungos do gênero *Aspergillus*: interação com modelos de membranas**, Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto - SP, 2015.

TAKAKI, M. et al. Synthesis, characterization and study of quaternary derivatives of chitosan: in vitro study against *Aspergillus flavus*. In: **Advances in Chitin Science** , v. XIV. p. 205-210, 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>> Acesso em: 10 outubro de 2016.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions, **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3151-3156, 2006.

TOMMERAAS, K. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

ZHANG, J. L, WU, X., ZHANG, S.Q., Antifungal mechanism of antibacterial peptide, ABP-CM4, from *Bombyx mori* against *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 12, p. 2157-2163, 2008.