

# RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/07/2022.



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

Renan Surian de Oliveira

**Desenvolvimento de um anfílico de quitosana:**  
estudo da atividade antimicrobiana e antioxidante

São José do Rio Preto  
2021

Renan Surian de Oliveira

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

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto  
2021

O48d

Oliveira, Renan Surian de

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

92 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Renan Surian de Oliveira

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

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

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal  
USP Ribeirão Preto - Faculdade de Farmácia

São José do Rio Preto  
08 de julho de 2021

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

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

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

Ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP.

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

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

## RESUMO

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

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

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



## ABSTRACT

The present research project aimed to synthesize, characterize and evaluate the antifungal activity of amphiphilic derivatives of chitosan modified with different amounts of vanillin against species of the genus *Candida*, a class of fungi caused by infections that impact the health system and recently its resistance by commercial antifungals making their treatment more difficult. Many antimicrobials, such as antifungals, belong to the same class of drugs, which means that resistance to a specific antifungal generates resistance to all related classes. These facts culminate in the decrease in the effectiveness of common treatments and a series of problems in the health area, such as increased mortality, decreased protection for patients in surgical procedures and increased costs for the sick. The polymers were also tested to evaluate a scavenging activity against the cation radical of ABTS. Free radicals are chemical compounds derived from different species. These species cause oxidation by removing electrons from chemical species present in the body, making them extremely reactive. Although the fight against these free radicals occurs naturally with endogenous antioxidants, there may be an imbalance between species, which would cause an increase in free radicals, which could reach cellular macromolecules causing several problems to human health. The synthesis of amphiphilic derivatives of chitosan with low and high molecular weight (Mw) was performed with different portions of vanillin. The most important parameters were identified to maximize the fungicidal and scavenging activity of the derivatives. The polymeric degradation was carried out through the reaction with sodium nitrite and confirmed by GPC. The degree of substitution (DS) and the degree of deacetylation (DD) were evaluated by RMN- $^1\text{H}$  spectroscopy. The cytotoxicity of the polymers was evaluated following the colorimetric method (MTS) with NIH3/3T3 fibroblast cells, results obtained with low toxicity for these cells, with cell viability above 70% for all the polymers. The antimicrobial effects were studied by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and fungistatic/fungicide assay. The antioxidant activity was analyzed by the absorbance of the radical in contact with the derivatives. The deacetylation of the polymers reached 97% of the free amino groups in the monomers and the polymeric degradation decreased by up to 27 times the chains of the ChDD polymer and 23 times for the ChCD (deacetylated and acetylated polymer, respectively). The results obtained from the ChCD and ChDDSV46 polymers, which demonstrated antifungal activity for the strain of *C. albicans* ATCC and the vanillin-chitosan derivatives (ChDDV46 and ChDV52) which demonstrated activity against

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

BS= Base de Schiff

CFM= Concentração fungicida mínima

ChC= Quitosana comercial

ChCD= Quitosana comercial degradada

ChCDV18= Quitosana comercial degradada com 18% de vanilina

ChD= Quitosana desacetilada

ChDD= Quitosana desacetilada degradada

ChDDV46= Quitosana desacetilada degradada com 46% de vanilina

ChDV52= Quitosana desacetilada com 52% de vanilina

CIM= Concentração inibitória mínima

CNA= *Candida não-albicans*

DD= Dodecil

DEAE= Dietilaminoetil

DMEM= Dulnecco's Modified Eagle's Medium

ERN= Espécie reativa de nitrogênio

ERO= Espécie reativa de oxigênio

GD= Grau de desacetilação

GPC= Cromatografia de permeação em gel

GS= Grau de substituição

kDa= Quilodalton

Mn= Peso molecular médio em número

MOPS= Ácido morfopropileno sulfônico

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

Mw= Peso molecular médio em peso

NAG= N-acetilglicosamina

OMS= Organização mundial da saúde

pH= Potencial hidrogeniônico

RMN-H<sup>1</sup>= Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI= Roswell park memorial institute

UTI= Unidade de tratamento intensivo



## SUMÁRIO

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

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

<b>5.5</b>	<b>Testes da atividade antioxidante dos derivados anfifílicos frente ao radical cátion ABTS<sup>•+</sup></b> .....	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

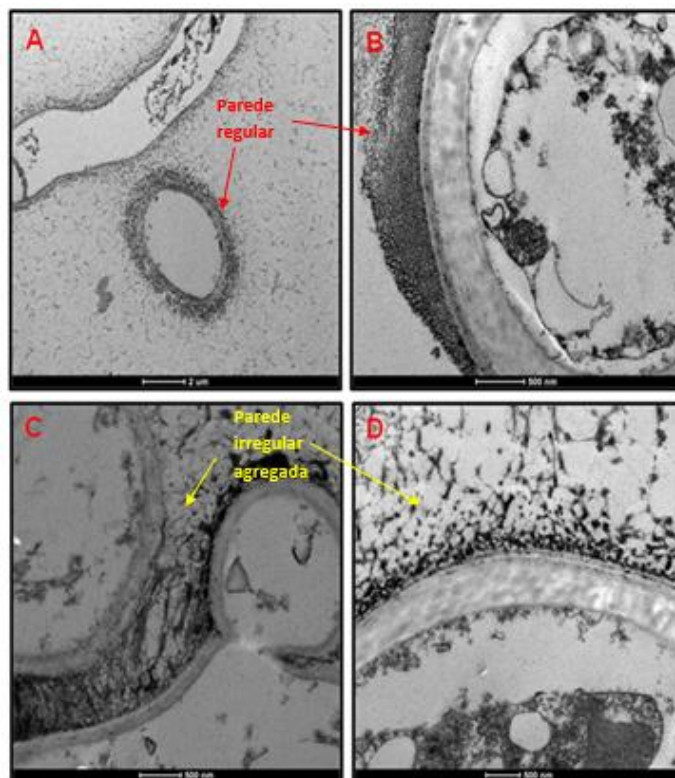
Nesse sentido, estudos realizados pelo grupo de Biomateriais e Nanotecnologia do Ibilce-UNESP, tem demonstrado o efeito da atividade fungicida de derivados de quitosana com diferentes conteúdos de grupos hidrofóbicos contra os fungos do genero *Aspergillus*. Os resultados desses trabalhos mostraram que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

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

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

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

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



Fonte: Adaptado de DIAS et al., 2018

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

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

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

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

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

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

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

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



## 6. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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