



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

Tullio Henrique Cano de Haro Barros

**Avaliação Antimicrobiana de Derivados Anfílicos de Quitosana:
Estudo in vitro contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria
alternata* e *Penicillium expansum***

São José do Rio Preto, SP
2018

Tullio Henrique Cano de Haro Barros

**Avaliação Antimicrobiana de Derivados Anfílicos de Quitosana:
Estudo in vitro contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria
alternata* e *Penicillium expansum***

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.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
Co-orientadora: Dr. Aline Margarete Furuyama Lima

São José do Rio Preto
2018

Barros, Tullio Henrique Cano de Haro.

Avaliação antimicrobiana de derivados anfílicos de quitosana: estudo in vitro contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* / Tullio Henrique Cano de Haro Barros . -- São José do Rio Preto, 2018

61 f. : il., tabs.

Orientador: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

Coorientador: Aline Margarete Furuyama Lima

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

1. Química. 2. Fungos. 3. Quitosana. 4. Biopolímeros. 5. Produtos de ação antimicrobiana. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 582.28

Tullio Henrique Cano de Haro Barros

**Avaliação Antimicrobiana de Derivados Anfílicos de Quitosana:
Estudo in vitro contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria
alternata* e *Penicillium expansum***

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.

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

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Eny Maria Vieira
USP – São Carlos

Profa. Dra. Márcia Cristina Bisinoti
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de junho de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente minha mãe, Daniela Barros, e meu pai, Josuel Barros, pelo amor, pelo incentivo, paciência e ensinamentos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Vera Tiera, por ter me aceitado como aluno orientando. E sua dedicação, profissionalismo, compreensão e paciência.

A minha co-orientadora, Dra. Aline Margarete Furuyama Lima, pela sua dedicação, profissionalismo, compreensão e paciência.

A todos os meus amigos, principalmente a Claudio Fujita pela amizade, lealdade, motivação e colaboração

As professoras do IFSP Gabriela Salvador e Joanita Nakamura Granato pela colaboração, pela motivação e incentivo.

Os meus companheiros do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, pela paciência e colaboração.

Os professores e funcionários do Departamento de Química e Ciências Ambientais da UNESP - SJRP por toda ajuda.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

Obrigado!

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a síntese e caracterização de dietilaminoetil-quitosana (QHdDEAE) e dodecil-dietilaminoetil-quitosana (QHdDEAEDOD) de baixa massa molar (Mw), para avaliar suas atividades antifúngicas contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*, que provoca um grande impacto na produção e preservação de alimentos processados e minimamente processados. Os derivados de baixa massa molar (Mw) foram obtidos por reação de degradação de quitosana desacetilada com nitrito de sódio, seguido pela inserção de grupos DEAE e Dodecil na estrutura do polímero. O grau de desacetilação (DD) e de substituição (DS) por grupos dietilaminoetil (DEAE) e dodecil foram determinados usando ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H) e caracterizados por infravermelho (IR). O grau de desacetilação e o grau de substituição por grupos DEAE foram de 94,8% e 39,8%, respectivamente. Os derivados hidrofóbicos obtidos foram substituídos com 15% e 39,8% de grupos dodecil, conforme determinado por RMN-H. As massas molares foram determinadas usando Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e um Mw de 9,2 kDa foi obtido para quitosana desacetilada degradada. Ensaio in vitro contra os fungos *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* e *Alternaria solani* foram realizados. Na concentração de 0,5g·L⁻¹, QHdDEAEDOD e QHdDEAE foram mais eficazes que as quitosanas comercial e desacetilada e apresentaram inibições de 80% contra *Alternaria alternata* e *Alternaria solani*. A quitosana deacetilada degradada foi mais eficiente na inibição do crescimento fúngico de *Penicillium expansum* e para 0,5 g·L⁻¹ atingiu cerca de 80% de inibição. Todos os derivados apresentaram viabilidade celular superior a 70% em células 3T3, demonstrando uma boa citocompatibilidade e potencial para aplicações na conservação de alimentos.

Palavras-chave: *Derivados, anfifílicos, hidrofílicos, biopolímero, citocompatibilidade*

ABSTRACT

*This study aimed at the synthesis and characterization of Diethylaminoethyl-Chitosan (QHdDEAE) and Dodecyl-Diethylaminoethyl-Chitosan (QHdDEAEDOD) of low molar mass (M_w), to evaluate their antifungal activities against the fungi **Alternaria solani**, **Alternaria alternata** and **Penicillium expansum**, which causes a great impact on the production and preservation of processed and minimally processed foods. The low M_w derivatives were obtained by degradation reaction with sodium nitrite, followed by the insertion of DEAE and Dodecyl groups on the polymer backbone. The degrees of deacetylation (DD) and substitution (DS) for DEAE and Dodecyl groups were determined using nuclear magnetic resonance of hydrogen ($^1\text{H-NMR}$) and characterized by FTIR. The degree of deacetylation and degree of substitution by DEAE groups were 94,8% and 39,8%, respectively. The obtained hydrophobicized derivatives were substituted with 15% and 39,8% of dodecyl groups as evaluated by $^1\text{H-NMR}$. The molar masses were determined by using Gel Permeation Chromatography (GPC) and a M_w of 9,2kDa was obtained for deacetylated chitosan. In vitro assays against the fungi **Alternaria alternata**, **Penicillium expansum** and **Alternaria solani**. At the concentration of $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ both, QHdDEAEDOD and QHdDEAE were more effective than commercial and deacetylated chitosans and exhibited inhibitions of 80% against **Alternaria alternata** and **Alternaria solani**. Degraded deacetylated chitosan was more efficient in inhibiting the fungal growth of **Penicillium expansum** and for $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ reached around 80% of inhibition. All the derivatives presented cell viabilities higher 70% on 3T3 demonstrated a good cytocompatibility and potential for applications in food preservation.*

Keywords: derivatives, amphiphilic, hydrophilic, biopolymer, cytocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1- Esquema da Estrutura da Quitina (Y>X) e Quitosana (X>Y).</i>	16
<i>Figura 2 - Estrutura de derivados anfifílicos de quitosana sintetizados no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia.</i>	21
Figura 3 - Fluxograma do preparo das placas	28
Figura 4 - Representação do mecanismo de reação de desacetilação da Quitosana	30
Figura 5 - Curvas Potenciométricas obtidas pela titulação da solução com quitosana por adição de hidróxido de sódio.	32
Figura 6 - Espectro de RMN-H da quitosana desacetilada em D ₂ O/DCI a 70	34
Figura 7 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (QC) e desacetilada (QH)	35
Figura 8 - Esquema da Reação de Degradação	36
Figura 9 - Cromatograma de Quitosana Desacetilada e Quitosana Desacetilada e Degradada	37
<i>Figura 10 - Representação do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE</i>	39
Figura 11 - Espectro de RMN H de Quitosana com grupo DEAE	40
Figura 12 - Espectros de absorção na região do infravermelho da quitosanas desacetilada (QH) e da substituída com grupo DEAE (QH-DEAE).	41
Figura 13 - Representação do mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos anfílicos da quitosana	43
Figura 14 - Espectros de RMN H da Quitosana desacetilada e seus Derivados substituídos com grupos DEAE e DODECIL	45
Figura 15 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (desacetilada (CH) e seus derivados (CH-DEAE) e CH-(DEAE-DOD).	46
Figura 16 - Diferença da Transmitância dos poços contendo fungo <i>Alternaria alternata</i> na presença de Quitosana Comercial em relação ao início da incubação	48
Figura 17 - Índice de inibição do fungo <i>A. Alternata</i> na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE	50

(QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD).

Figura 18 - Índice de inibitório do fungo *A. solani* na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD). **51**

Figura 19 - Índice de inibitório do fungo *P. expansum* na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) **53**

Figura 20 - Viabilidade Celular de células 3T3 na presença de concentrações crescentes de Quitosana comercial (QC), quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd), quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD). **54**

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Reagentes utilizados	24
Tabela 2 - Comparativo entre os valores de massa de QH e QHd	40
Tabela 3 - Valores de massa, polidispersividade e tempo de retenção da Quitosana e seus derivados	44
Tabela 4 - Características dos Polímeros Sintetizados	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA - Batata Dextrose Agar

QC - Quitosana comercial

QH - Quitosana desacetilada

QHd- Quitosana desacetilada e de baixa massa molecular

QHdDEAE - Quitosana desacetilada de baixa massa molecular contendo 40% de grupos DEAE

QHdDEAE-DOD - Quitosana desacetilada de baixa massa molecular contendo 40% de grupos DEAE e 15% de grupos dodecila

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

IR - Espectroscopia no Infravermelho

GD- Grau Médio de Desacetilacao

GPC - Cromatografia de Permeação em Gel

GS_{DEAE} - Grau de Substituição de grupos DEAE

GS_{DOD} - Grau de Substituição de grupos dodecil

RMN-H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Fungos do Gênero <i>Alternaria</i>	13
2.2 O fungo <i>Penicillium expansum</i>	14
2.3 Quitina e Quitosana	16
2.4 Quitosana: Ação Antimicrobiana	17
2.5 Antimicrobianos Derivados de Quitosana	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos Gerais	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
4.1 Reagentes	22
4.2 Sínteses dos Derivados de Quitosana	23
4.2.1. Reação de desacetilação da quitosana	23
4.2.2 Reação de degradação da quitosana	23
4.2.3 Síntese da quitosana substituída com cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietilaminoetila (DEAE)	23
4.2.4 Síntese de derivado de quitosana dodecilado	24
4.3 Caracterização da quitosana e seus derivados sintetizados	24
4.3.1 Titulação Potenciométrica	24
4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H)	25
4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho	25
4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel (CPG)	26
4.4 Análises Microbiológicas	26
4.4.1 Preparo da suspensão de conídios	27
4.4.2 Preparo das soluções estoque dos polímeros	27
4.4.3 Preparo do meio de cultura BDA	27
4.4.4 Preparo e análise das placas contendo os fungos: <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> e <i>Penicillium expansum</i>	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Reação de Desacetilação da Quitosana	30

5.1.1	Análise Potenciométrica	31
5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)....	33
5.1.3	Infravermelho (IR)	34
5.2	Reação de Degradação da Quitosana	35
5.2.1	Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR)	36
5.3	Síntese do Derivados de Quitosana Hidrofílico	38
5.3.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)....	39
5.3.2	Infravermelho (IR)	40
5.3.3	Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR)	41
5.4	Síntese do Derivado Anfílico.....	42
5.4.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)....	43
5.4.2	Infravermelho (IR)	46
5.5	Atividade antifúngica	47
5.5.1	Atividade Antifúngica contra o fungo <i>Alternaria alternata</i>	49
5.5.2	Atividade Antifúngica contra o fungo <i>Alternaria solani</i>	50
5.5.3	Atividade Antifúngica contra o fungo <i>Penicillium expansum</i>	52
5.6	Viabilidade Celular de Células 3T3 na Presença de Quitosana e seus derivados	53
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o desenvolvimento de novas tecnologias agrícolas levou a um grande aumento na eficiência de produção, este sendo propiciado, principalmente no início do século, pelo desenvolvimento de maquinário e de defensivos agrícolas. Este último tendo grande relevância para a manutenção de grandes lavouras. (PERES, et. al., 2003)

Entretanto muitos desses defensivos se mostraram posteriormente nocivos a saúde humana e ao meio ambiente, tendo como destaque os organofosforados e cúpricos, que quando manejados de maneira incorreta podem prejudicar a qualidade do alimento e contaminar o meio ambiente (TÖFOLI et. al., 2015).

Dessa forma é evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologias sustentáveis que não causem danos ao meio ambiente e a saúde humana. Os biofungicidas se destacam por possuírem potencial para combater pragas. Estes por serem substâncias que se degradam com facilidade, e podem ser considerados substâncias viáveis para substituir os defensivos tradicionais (XING et. al., 2014)

Dentre essas substâncias a quitosana se destaca por ser obtida a partir de fontes naturais. A principal fonte natural de quitina é os exoesqueletos de frutos do mar, onde existe o reaproveitamento do refugo originário da indústria pesqueira, tal característica gera um baixo custo na produção do biopolímero. Em 2014 a produção mundial de quitina foi superior a 10^7 toneladas, destacando-se como maiores produtores Japão, EUA e China, e em menor escala, Índia, Noruega, Canadá, Itália, Polônia, Chile e Brasil (KOMI; HAMBLIN, 2016).

A quitosana e seus oligômeros apresentam um amplo espectro de aplicações, dentre as quais se destacam seu uso como fungicidas e bactericidas biodegradáveis. A atividade de quitosana contra diferentes microrganismos tais como bactérias, fungos e leveduras tem recebido uma atenção especial nos últimos anos. Uma das potenciais aplicações encontra-se no controle dos fungos que atacam diferentes tipos de grãos como o amendoim, soja, milho, centeio, cevada e outros cereais, sementes oleaginosas, nozes, castanha-do-brasil e produtos curados, dentre outros (XING et. al., 2014).

Dentro deste contexto, o presente trabalho apresenta o estudo da atividade antifúngica da quitosana e de seus derivados anfílicos de dietilaminoetil contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos do Gênero *Alternaria*

As doenças causadas por fungos do gênero *Alternaria* são comuns e altamente danosas em várias solanáceas, apiáceas, aliáceas, crucíferas, cucurbitáceas, asteráceas e chichoriáceas. Afetando essas culturas principalmente em áreas tropicais e subtropicais, podendo causar perdas que variam de 6 a 100%, caso não sejam aplicadas medidas de controle. Devido ao aumento da agressividade da doença e também ao surgimento de novas espécies e subespécies as alternarioses tem exibido muita atenção na última década (TÖFOLI et al., 2015).

As espécies patogênicas mais conhecidas desse gênero são a *A. Solani*, *A. Alternata*, *A. grandis*, *A. tomatophila*, *A. radicina*, *A. cucumerina*. As doenças causadas por *Alternarias* apresentam como sintomas, nas folhas lesões necróticas pardo escuras, estas em formato anelar que ocorrem de maneira isolada ou em grupos. Nos caules podem ocorrer lesões alongadas e deprimidas. Já nos frutos ocorrem manchas escuras, deprimidas e com anéis concêntricos, localizadas na região do pedúnculo. Estes sintomas geram grande diminuição na produção. Outro agravante é que as sementes infectadas geram plantas frágeis que costumam morrer em poucas semanas. (PEREIRA et. al., 2013)

Os fungos do gênero *Alternaria* são anamórficos e apresentam pigmentação parda, ouro claro ou palha, em sua maioria apresenta 9 a 11 septos transversais. Seus conidióferos são septados retos ou sinuosos, que ocorrendo isolados ou em grupos, com 6 a 10 μM de diâmetro e 100 a 110 μM de comprimento, onde estão inseridos os conídios, da qual possui a mesma coloração. Seus conídios medem de 150 a 300 μM de comprimento e 15 a 19 μM de largura, são individuais ou raramente catenulados, retos ou levemente curvo. O corpo é oblongo ou elipsoidal e

afina em direção ao ápice, possui bico comprido, sinuoso ou ramificado com 2,5 a 5,0 μM de comprimento (PEREIRA et al., 2013)

As populações de *Alternaria spp.* apresentam morfologia heterogênea, excluindo diferenças em relação a produção de pigmentos, presença ou ausência de esporulação e coloração do micélio em condições de laboratório, além de variações quanto a patogenicidade e agressividade. É comumente observado em algumas espécies de *Alternaria* baixa capacidade ou mesmo ausência de esporulação em meio de cultura, havendo um grande número de trabalhos indicando diversos métodos para induzir esporulação com variações luz utilizada, meios de cultura, ferimentos do micélio, temperaturas e idades das colônias. (TÖFOLI et al., 2015)

Os fungicidas apresentam 4 tipos de ação; protetora, curativa, anti-esporulante e residual. A ação protetora é realizada ao se aplicar fungicida antes do processo infeccioso da planta. A ação curativa é definida como a capacidade do fungicida limitar o desenvolvimento do fungo, sendo aplicado no período latente, antes do aparecimento dos primeiro sintomas. A atividade antiesporulante consiste na capacidade do fungicida em limitar a reprodução ou inviabilizar as estruturas reprodutivas do patógeno. Já a ação residual refere-se à proteção proporcionada pelo produto após a sua aplicação, sendo dependente da estabilidade da molécula, tenacidade, crescimento da planta e ocorrência de intempéries (TÖFOLI et al., 2015).

Os grupos de defensivos mais usados atualmente para inibir *Alternaria ssp.* são os Cúpricos, Ditiocarbamatos, Cloronitrilas, Dinitroanilina, Estrobilurinas e Oxazolidinediona, Carboximidás, Triazóis e Dicarboximidás. Também existem fungicidas biológicos pelo meio do uso do *Bacillus subtilis* e indutores de resistência como o acibenzolar-s-metilico (ASM). (TÖFOLI; et al., 2015)

2.2 O fungo *Penicillium expansum*

O gênero *Penicillium* é constituído por 11 espécies de fungos patogênicos, a reprodução desses fungos é realizada por liberação de esporos. O *Penicillium expansum* atinge plantações de maçã, tomate e uva (BAERT et al., 2008).

A contaminação por *P. Expansum* ocorre quando algum tipo de dano na parte mais externa da planta entra em contato com esporos do fungo. Após a

contaminação ocorre a formação de uma mancha aquosa e translúcida, na polpa forma-se uma mancha bege clara. Em condições de alta umidade, a parte externa contaminada adquire tonalidades brancas e azuis, que são os micélios e esporos do fungo. A podridão cresce rapidamente e os esporos, quando liberados contaminam mais frutos (SANHUEZA, 2011).

O patógeno também produz a Patulina, 4-hidróxi-4Hfuro[3,2-c]piran-2(6H)-ona, um metabólito secundário que é tóxico para o ser humano e os animais. Este metabólito pode causar hiperemia, congestão e lesões hemorrágicas, particularmente no trato gastrointestinal, náuseas e vômitos. Também existem estudos associando propriedades mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas a Patulina (CANAVAR; PIERO, 2011).

Devido a essas características o *Food and Drug Administration* (FDA) e a União Europeia proíbem a venda de frutas ou quaisquer derivados que apresentem concentração de Patulina superior a $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000; EUROPEAN COMMUNITY, 2003)

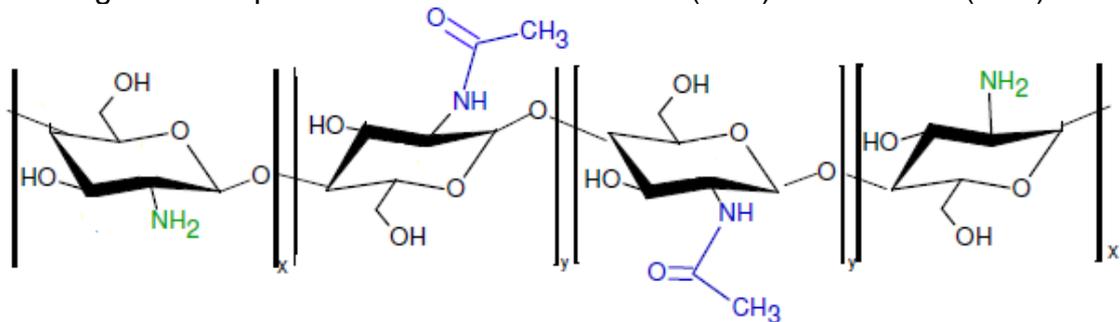
O controle do *P. expansum* é realizado pré e pós colheita, na pré colheita é utilizado fungicidas como o iprodione ou o imazalil. Após a colheita os frutos são emersos em solução de hipoclorito de sódio ou dióxido de cloro. Entretanto, a preocupação dos consumidores e produtores quanto à presença de agrotóxicos em produtos agrícolas e o possível acúmulo dessas substâncias no ambiente, além do efeito dos mesmo para saúde humana, têm estimulado a busca por métodos alternativos de controle de doenças (CANAVAR; PIERO, 2011).

Dessa forma a quitosana é uma alternativa de baixo custo e baixa toxicidade para controle de fungos. Devido a sua ação fungicida e não oferecer risco ao meio ambiente ou a saúde humana. Nos frutos, a quitosana adere sobre a superfície externa do mesmo, atuando como um filme protetor diminuindo a suscetibilidade da fruta em se contaminar pelo fungo. A quitosana também apresenta ação antifúngica inibindo a germinação de esporos de fungos, como o *P. expansum* com quitosana 85% a 90% desacetilada com concentração superior a 0,3% (m/v). (CANAVAR; PIERO, 2011, YU et al., 2007)

2.3 Quitina e Quitosana

A quitosana possui fórmula molecular 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e é produzido pela desacetilação da quitina, processo que consiste em se remover os grupos acetilo da estrutura. Sendo utilizado o grau de desacetilação (GD) como forma de se classificar a quitina e a quitosana, onde a quitosana apresenta GD superior a 50%, Figura 1 (KUMARI; RATHB, 2014).

Figura 1- Esquema da Estrutura da Quitina ($Y > X$) e Quitosana ($X > Y$).



Fonte: Autoria Própria

A quitina é um importante polímero, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Dentre suas propriedades, apresenta baixa toxicidade, biodegradabilidade e é produzido por fontes naturais renováveis. Este polissacarídeo possui estrutura linear, sendo formado por unidades de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ (KUMIRSKA et al., 2011).

Na natureza a quitina constitui os exoesqueletos dos animais marinhos juntamente com carbonato de cálcio (CaCO_3), proteínas, lipídios e pigmentos. Dentre os animais marinhos que mais possuem quitina em relação a sua massa estão o caranguejo (75%), a lagosta (69,8%) e o lepas (58%) (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Na extração de quitina, o polímero é separado dos demais componentes dos exoesqueletos de crustáceos por uma etapa de desmineralização e desproteinização, por meio de soluções diluídas de HCl e NaOH, sendo posteriormente realizado a descoloração com permanganato de Potássio (KMnO_4) e ácido oxálico (KUMARI; RATHB, 2014).

Um dos derivados de maior relevância comercial da quitina é a quitosana. Algumas das principais áreas de aplicação da quitosana são: na agricultura (defensivos agrícolas e adubo para plantas), tratamento de água (utilização como polímero floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores), na indústria alimentícia (utilização como fibras dietética, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida e recobrimento de frutas), na indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e na indústria biofarmacêutica (agente imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Porém sua maior aplicação é na área biomédica (implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais) (KOMI; HAMBLIN, 2016).

O biopolímero quitosana possui essa grande gama de usos devido a seus grupos amino (NH_3) e hidroxila (OH^-) que propiciam à quitosana solubilidade em diversos solventes e serem passíveis a modificações, permitindo a produção de diversos derivados de quitosana (KUMIRSKA et al., 2011)

2.4 Quitosana: Ação Antimicrobiana

O grau de desacetilação (GD) está diretamente relacionado com a solubilidade da quitosana em soluções aquosas. Dessa forma elevados graus de desacetilação, disponibiliza grupos amina (NH_3) proporcionando maior solvatação das cadeias, conferindo-lhe maior solubilidade (KUMARI; RATHB, 2014).

Dessa maneira as quitosanas com altos GD possuem maior solubilidade, e maior número de grupos funcionais livres (aminas e hidroxilas) que permitem o aumento de sua reatividade possibilitando a obtenção de um grande número de derivados pela reação com diferentes substituintes (KUMIRSKA et al., 2011).

Essas modificações alteram a solubilidade do biopolímero e também podem potencializar a interação do polímero com microrganismos. Essa característica aumenta a abrangência do uso da quitosana como fungicida e bactericida. O potencial antimicrobiano da quitina, quitosana e seus derivados são descritos desde a década de 80, entretanto ainda não existe um consenso como ocorre a ação desses compostos em diferentes microrganismos. (XING et al, 2014)

A ação antimicrobiana da quitosana está ligada diretamente ao seu grau de desacetilação e massa molecular (Mw). Ambos os parâmetros afetam a atividade antimicrobiana da quitosana de forma independente, embora estudos indiquem que o Mw influencie mais a atividade antimicrobiana que o grau de desacetilação. O tamanho reduzido do polímero possibilita maior mobilidade, atração e interação iônica das cadeias, facilitando a interação com a superfície da membrana. De forma semelhante, mas em intensidade diferente, a eficácia antimicrobiana de quitosana é melhorada à medida que o grau de acetilação é menor. Portanto, quanto maior o grau de desacetilação, maior a disponibilidade de grupos amina e hidroxila, sendo estes sítios ativos na ação antimicrobiana. (KUMIRSKA et al., 2011)

Quanto a forma de ação da quitosana existe três modelos, sendo o mais aceitável a interação entre esses polímeros carregados positivamente e membranas de células microbianas carregadas negativamente. Neste modelo, os íons protonados de NH_3^+ competem, possivelmente, com os íons de cálcio (Ca^{2+}) nos sítios eletronegativos da membrana celular. Esta interação eletrostática tem como resultado a hidrólise dos peptidoglicanos na membrana celular do microrganismo, causando o vazamento de material intracelular, como íons potássio e outros constituintes de maior massa molecular como proteínas, ácidos nucleicos, glicose e lactato desidrogenase. (GOY et al., 2009)

A interação da quitosana com a parede celular foi descrito por Raafat et al. (2008) que constatou por meio de microscopia eletrônica de transmissão as mudanças estruturais de células após exposição a quitosana. Com o uso dessa técnica foi observado que a membrana celular se separou da parede celular, rompendo e liberando constituintes celulares (íons e água). Este mecanismo de interação da quitosana com a parede celular é baseado nas interações eletrostáticas, entre o polímero, positivamente carregado, e macromoléculas com resíduos de carga negativa como lipossacarídeos.

Segundo Kumirska e colaboradores (2011), a eficácia da quitosana in vitro é maior em fungos e bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas, produzindo mudanças morfológicas maiores nesses microrganismos. Isso se deve, possivelmente, pelo fato das bactérias gram negativas possuírem membrana externa rica em lipolisacarídeos que contém grupos fosfato e pirofosfato, formando uma superfície densamente eletronegativa.

Outro mecanismo de ação da quitosana contra microrganismo, supõe que a quitosana seria capaz de penetrar a parede celular e atingir a membrana plasmática, o citoplasma e o núcleo da célula. Ao penetrar na célula a quitosana pode se ligar com o DNA microbiano, inibindo a síntese de mRNA e proteínas. Tal teoria é baseada na observação por microscopia confocal de varredura a laser que confirmou a presença de oligômeros de quitosana dentro de algumas espécies de bactérias. Esse mecanismo justifica que quitosanas com menor massa molecular geralmente possuem maior ação antimicrobiana contra fungos e bactérias (GOY et al., 2009).

O terceiro mecanismo é a quelação de metais e outros nutrientes que são essenciais para o crescimento microbiano. Isso ocorre devido aos grupos amina das moléculas de quitosana possuírem capacidade de complexar cátions metálicos por quelação. Sendo um mecanismo mais eficiente em pH elevado para evitar a protonação do nitrogênio da amina que por sua vez se liga aos íons metálicos. No entanto, esta é, evidentemente, não uma ação antimicrobiana determinante uma vez que os locais disponíveis para interação são limitados e a complexação atinge a saturação em função da concentração de metal (GOY et al., 2009).

2.5 Antimicrobianos Derivados de Quitosana

A modificação química da estrutura da cadeia polimérica da quitosana é uma alternativa para aumentar a ação antifúngica deste polissacarídeo. Derivados de quitosana são uma alternativa para tornar a ação antifúngica do polímero mais eficiente. Segundo Goy e colaboradores (2009), diversos trabalhos visam acrescentar a cadeia da quitosana grupos que modifiquem a suas características físico-químicas, aumentando solubilidade e interação com fungos patógenos de plantas e animais. Dentre eles se encontra o trabalho de Bezerra (2011) que modificou quitosana com alto grau de desacetilação e baixa massa molecular produzindo N-succinil-quitosana e 2-carboxibenzamido-quitosana que mostrou aumento da ação contra a bactéria *Eschenchia coli*.

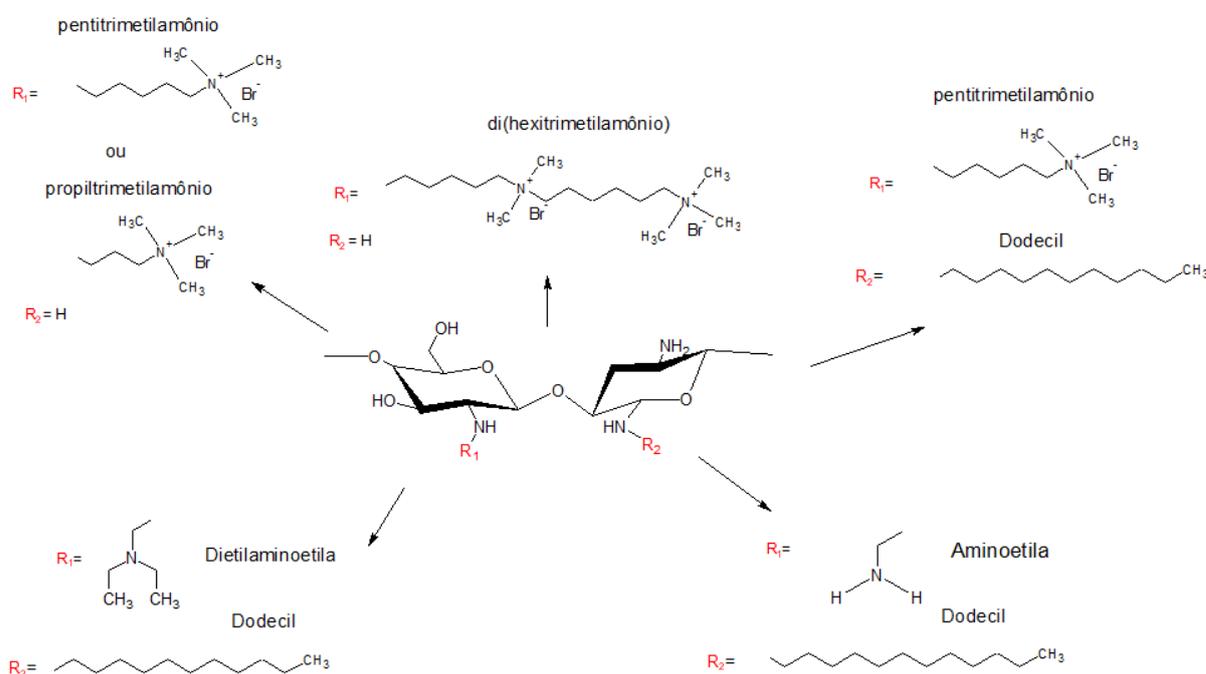
No trabalho de Xing e colaboradores (2016) é utilizado o derivado oleoil-quitosana contra os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Botryosphaeria sothidea*, *Nigrospora sryzae* e *Alternaria senuissima*, *Gibberella seae* e *Fusarium culmorum* registrando aumento do índice inibitório em todos os patógenos. Na área de saúde

podemos citar os trabalhos de Kloster (2011) que desenvolveu um gel bucal obtido de quitosana e cloroxidina para o tratamento de infecções causadas pelas bactérias *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Além da pesquisa de Soliman e colaboradores (2015) que produziu um gel com quitosana que foi utilizado no tratamento de ratos contaminados com bactérias *Candida albicans*.

Trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa utilizando derivados anfifílicos de quitosana (figura 2), mostraram excelente atividade de inibição contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Nesses trabalhos os derivados substituídos com diferentes conteúdos de grupos dodecila e grupos hidrofílicos como propiltrimetilamônio (VIEGAS et al, 2013), pentiltrimetilamônio (PEDRO et al., 2014) e dietilaminoetil (DEAE), apresentaram elevados índices de inibição. Em geral, os resultados revelaram que a atividade antifúngica é fortemente dependente da massa molecular, do conteúdo hidrofóbico e da concentração dos polímeros.

Dessa forma, o presente estudo teve como referência estudos realizados por Gabriel e colaboradores (2015) com o objetivo de selecionar um derivado minimamente modificado e com amplo espectro de aplicações na área de alimentos. Portanto, foi proposto a síntese de derivados anfifílicos de quitosana de baixa massa molecular com o objetivo de investigar sua ação antifúngica contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium Expansum* que também impactam na produção de grãos, frutas e legumes.

Figura 2 - Estrutura de derivados anfífilos de quitosana sintetizados no Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia.



Fonte: Autoria Própria

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O principal objetivo desse trabalho foi sintetizar, caracterizar e estudar a ação de derivados anfífilos de quitosana contra os fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* que impactam na produção e conservação de alimentos.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Sintetizar e caracterizar derivados anfífilos de quitosana de baixa massa molecular (10 kDa) substituídos com 40% de grupos DEAE e 15 % de grupos dodecila.
- II. Realizar e comparar os ensaios microbiológicos da quitosana e seus derivados contra *Penicillium expansion*, *Alternaria solani* e *Alternaria alternata*.

- III. Realizar ensaios de viabilidade celular da quitosana e seus derivados como forma de avaliar a sua citocompatibilidade

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Na Tabela 1 estão listados os reagentes utilizados no presente estudo.

Tabela 1 – Reagentes utilizados.

Reagentes	Procedência
Ácido clorídrico (P. A.)	Synth
Borohidreto de sódio (P. A.)	Aldrich Chemical Co
Cloreto de deutério (P. A.)	Aldrich Chemical Co
Cloreto de sódio (P. A.)	Dinamica
Dodecanal (P. A.)	Fluka
Etanol (P. A.)	Synth
Hidróxido de sódio (P. A.)	Synth
Meio de cultura batata dextrose ágar (P. A.)	Himedia
Óxido de deutério (P. A.)	AldrichChemical Co
Quitosana comercial (P. A.)	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda
Nitrito de sódio (P. A.)	Synth
Cloreto de 2-cloro-N,N- dietil etil amino (P. A.)	AldrichChemical Co

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada obtida em um sistema purificador de água da Gehaka modelo DG.

4.2 Sínteses dos Derivados de Quitosana

4.2.1. Reação de desacetilação da quitosana

A desacetilação da quitosana foi feita utilizando uma amostra de quitosana comercial de média massa molecular da Polymar Ind. Com. Exp. Ltda. No processo de desacetilação, utilizou-se 50g de polímero disperso em 2,5 litros de solução aquosa de ácido acético. Esta solução foi preparada com 2,5 litros de água desionizada e 50mL de ácido acético glacial PA sob agitação magnética. Posteriormente, verteram-se 587,5 gramas de hidróxido de sódio disperso em 625 mL de água desionizada, a reação ocorreu em atmosfera de nitrogênio a 80°C, sendo interrompida após 90 minutos. A suspensão foi transferida para 6 béqueres com 4 litros de água desionizada. O precipitado obtido foi decantado e lavado com água desionizada até atingir o pH neutro, em seguida passou por filtração a vácuo e liofilização. O procedimento seguiu a metodologia descrita por Tiera e colaboradores (2006).

4.2.2 Reação de degradação da quitosana

Para a degradação da quitosana foi utilizado o método descrito por Tommeraas et al. (2001), onde ocorre o rompimento das ligações glicosídicas por nitrito de sódio em meio ácido. A massa de 15,0 g da quitosana foi dispersa em 750 mL solução de ácido acético a concentração de 12% em agitação magnética.

Posteriormente foi adicionada 813,0 mg de nitrito de sódio previamente solubilizados em 10 mL de água deionizada. Após 1 hora sob agitação constante a reação foi interrompida e purificada por diálise por 5 dias, em seguida foi recuperado por meio de liofilização. A massa molar do polímero foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).

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

A quitosana degradada foi submetida a reação com cloreto de 2-cloro, *N,N*-dietilaminoetila (DEAE), afim de se inserir um grupo hidrofílico na estrutura da

mesma. Para obtenção de quitosana com 40% de substituição uma massa de 5,0 gramas de quitosana foi solubilizada em 157 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ de ácido clorídrico por 24 horas sobre agitação constante.

Posteriormente adicionou-se 2,22g de DEAE a solução de polímero e o pH foi ajustado e mantido em 8,0 por adição de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹. A reação ocorreu a 65 °C, durante 2 horas sobre agitação constante.

Para purificar o produto foi realizado diálise contra hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹, por 24 horas, e contra água desionizada por 3 dias utilizando membrana de diálise MWCO 3 kDa. O polímero foi recuperado com uso de liofilização e caracterizado por Infravermelho (IR) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H).

4.2.4 Síntese de derivado de quitosana dodecilado

A alquilação da quitosana foi feita em duas etapas. Inicialmente a reação dos grupos amina de quitosana com dodecil aldeído para formação da base de Schiff, seguida da redução utilizando-se borohidreto de sódio, segundo método descrito por Desbrieres et al. (1996). Nesse estudo foi produzido um derivado de quitosana contendo 20% de grau de substituição de grupos dodecila. Foram pesado 2,5 gramas de quitosana e solubilizada em 135,5 mL de ácido acético a 0,2 mol L⁻¹, após 12 horas de agitação foi acrescentado 190 mL de etanol. Ajustou-se o pH para 5,1 através de solução de hidróxido de sódio e em seguida adicionou-se 0,69 mL de cloreto de dodecila em agitação magnética vigorosa durante 1 hora. Em seguida foi adicionado 5,24 gramas de boroidreto de sódio, e após decorrido 24 horas a reação foi interrompida. O derivado foi purificado por diálise contra água desionizada por 3 dias, realizando 3 trocas de água por dia com até se obter pH 7.

4.3 Caracterização da quitosana e seus derivados sintetizados

4.3.1 Titulação Potenciométrica

Para se calcular o grau médio de desacetilação da quitosana foi usado técnica de potenciometria seguindo o método de Tolaimate et al (2000), que consiste em detectar a o GD através da detecção do consumo de prótons de uma solução de

quitosana em excesso de ácido. Nesse trabalho foram realizadas duas titulações potenciométricas nas quais foram pesados uma massa de 40,0 mg da amostra, previamente seca na estufa a vácuo a 50°C para garantir a ausência de água na amostra, foi dissolvida em 10,0 mL de ácido clorídrico 0,096 mol L⁻¹. Posteriormente, a solução resultante foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,099 mol L⁻¹. Durante a titulação o pH foi monitorado utilizando um pHmetro Analion modelo PM 608 com eletrodo de vidro Ag/AgCl Digimed. Os resultados foram apresentados na forma de um gráfico de pH em função do volume de hidróxido de sódio. O gráfico da derivada primeira em função do volume da base ($\Delta\text{pH}/\Delta V$) foi utilizado para obter o volume de base necessário para desprotonar os grupos amino e assim calcular o GD.

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H)

O grau de desacetilação e grau de substituição da quitosana e seus derivados foram caracterizados por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) em D₂O/DCI a 70 °C. O espectro de RMN da quitosana e seus derivados apresentam picos distintos possibilitado identificação e caracterização dos graus de desacetilação e substituição (LAVERTU, et al., 2003)

As amostras foram preparadas para as análises de RMN-H pela dissolução de aproximadamente 10,0 mg dos polímeros em 1,0 mL de óxido de deutério com adição de 10,0 µL de cloreto de deutério para solubilização do polímero. Seguido pela agitação magnética até completa solubilização. Os espectros de RMN-H foram obtidos no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, da marca Bruker de 500 MHz a temperatura de 70 °C, da Embrapa.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho

A modificação química da quitosana foi analisada espectroscopicamente, tendo como referência a quitosana precursora, utilizando a técnica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em espectrômetro Bruker Vertex 70 (Bruker Co., Billerica, EUA). Os espectros foram obtidos a partir de leituras pontuais, no

modo absorvância tomando a média de 40 varreduras na região de 4000 a 400 cm^{-1} em sistema ATR (reflectância total atenuada).

4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel (CPG)

As massas moleculares média da quitosana comercial e degradada foram determinadas por Cromatografia de Permeação em Gel (CPG) no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), em colaboração com a Prof^a Dr^a Carla Cristina Schmitt Cavaleiro. Os procedimentos foram executados em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20), utilizando um detector por índice de refração modelo RID-10^a. Na análise foi utilizado como eluente a solução tamponante ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,5), a temperatura de 35 °C e o fluxo foi de 0,8 mL·min⁻¹. O processo de calibração consiste na injeção de um polímero padrão conhecido, produzindo uma curva de calibração convencional baseado no tempo de retenção. Dessa forma, a massa molar média obtida é relativa ao padrão, nessas análises foram utilizados padrões Pullulan, um α -glicano constituído de unidades repetidas de glicose unidas por ligação glicosídica do tipo α (1→6) e α (1→4) de Mw 805.000 a 6.200 Da. em colunas com tamanhos de 8 mm x 300 mm.

4.4 Análises Microbiológicas

A cepa dos fungos *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Penicillium expansum* foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Foi seguido a metodologia descrita por Oliveira et al. (2012). As culturas dos fungos foram preparadas em poços de placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (Roth®), o crescimento dos fungos foi acompanhado por 6 dias por meio de absorvância de ultravioleta com comprimento de onda de 405nm.

O tempo de exposição e pH do meio ideal para os fungos foi escolhido tendo como referência os trabalhos de Reddy e colaboradores (2010), Liu e colaboradores (2007) e Chen e Colaboradores (2014) para o fungo *Alternaria alternata*. Para o fungo *Alternaria Solani* foi utilizado como referência os trabalhos de Rodrigues e colaboradores (2010) e Coqueiro e colaboradores (2011). E para o fungo *Penicillium*

expansum teve como referência os trabalhos de Yu e colaboradores (2006) e Canaver e colaboradores (2011). Através da análise desses trabalhos foi utilizado como meio de cultura BDA e pH 5.

4.4.1 Preparo da suspensão de conídios

Com auxílio de uma alça metálica foi transferido uma quantidade de conídios para um tubo tipo Eppendorf contendo aproximadamente 1,5 mL de água deionizada estéril. A suspensão foi agitada manualmente para a dispersão dos conídios. Posteriormente, 5,0 µL dessa solução foram transferidos, com auxílio de uma micropipeta com ponteira estéril, para cada um dos poços de cada placa contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA). Em seguida as placas foram incubadas por 6 dias a 25 °C.

4.4.2 Preparo das soluções estoque dos polímeros

As soluções estoque de quitosana e seus derivados foram preparados ao solubilizar 240 mg de polímero em 15 mL de ácido acético 1% (v/v), obtendo-se uma solução final de concentração de 16,0 g·L⁻¹. O pH foi ajustado para 5 por adição de NaOH. Em seguida as soluções foram esterilizadas através de luz ultravioleta na capela de fluxo laminar durante 30 minutos. As alíquotas dessa solução estoque foram dispersar em cada um dos poços de com volume específico a fim de se obter as concentrações desejadas

4.4.3 Preparo do meio de cultura BDA

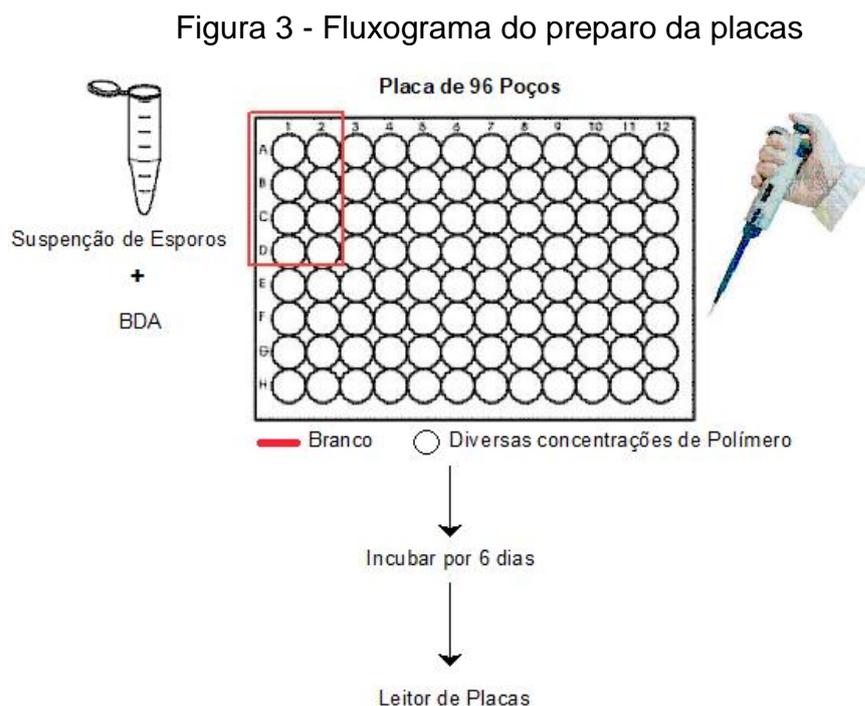
As soluções de meio de cultura BDA foram preparadas em erlenmeyers adicionando-se aproximadamente 1,26 g do meio de cultura em 15 mL de água deionizada. Posteriormente as soluções foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. Em cada poço foi depositado 100 µL de solução BDA.

4.4.4 Preparo e análise das placas contendo os fungos: *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Peniciliun expansum*

As culturas de fungos foram preparadas em poços de placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços (Roth®), Figura 3. Em cada um dos poços foi depositado 10 μL de uma suspensão de esporos do fungo teste em 100 μL de BDA. A quitosana foi adicionada nos poços de forma a se obter as concentrações de 0,5 a 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. O restante do volume de 200 μL foi completado quando necessário por tampão Ácido Acético/Acetato pH 5. Foram realizadas quadruplicadas para cada uma das concentrações. Todas as placas foram incubadas a 25°C em BOD.

As culturas de fungos foram tratadas com os seguintes polímeros: quitosana comercial ($M_w=184,9$ kDa e $\text{GD}=72\%$), quitosana desacetilada ($M_w=184,9$ kDa e $\text{GD}=94,8\%$) e para quitosana desacetilada e degradada ($M_w= 9,3$ kDa e $\text{GD}=94,8\%$) e de quitosana substituídas com DEAE ($\text{GS}_{\text{DEAE}}=40\%$) e quitosana anfífilica ($\text{GS}_{\text{DEAE}}=40\%$ e $\text{GS}_{\text{Dod}}=15\%$).

O crescimento fúngico foi avaliado medindo a densidade óptica do meio de cultura a 405 nm em intervalos de 24, 72 e 144 horas, o índice inibitório foi calculado ao se comparar o crescimento do controle com o crescimento nos poços com diferentes concentrações de polímero (OLIVEIRA et al., 2012)



Fonte: Autoria Própria

4.5 Viabilidade Celular

Para avaliar a viabilidade celular da quitosana e seus derivados foi seguido metodologia descrita por Barbosa e colaboradores (2016).

Foram utilizadas células de fibroblasto 3T3 cultivadas em meio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina-estreptomicina em uma atmosfera de CO₂-O₂, com proporção respectiva de 5 e 95% a 37°C. As células foram semeadas em triplicatas em placas de cultura de 96 poços a uma densidade de aproximadamente 1X10⁴ células/mL em 200 µl de meio de cultura celular por poço.

Após a inoculação as células foram cultivadas durante 24 h a 37 ° C. Posteriormente foram expostas a concentrações de 0,02 à 1,0 g·L⁻¹ de Quitosana Comercial (QC), Quitosana Desacetilada (QH), Quitosana Degradada e Desacetilada (QHd), Quitosana Degradada Desacetilada e com DEAE (QHdDEAE) e Quitosana Desacetilada Degradada e com DEAE e Dodecil (QHdDEAE-Dod) e depois incubados durante um período de 24 h. A viabilidade celular foi avaliada com um ensaio colorimétrico de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). A absorbância foi medida a 570 nm com um ELX 808 universal Leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

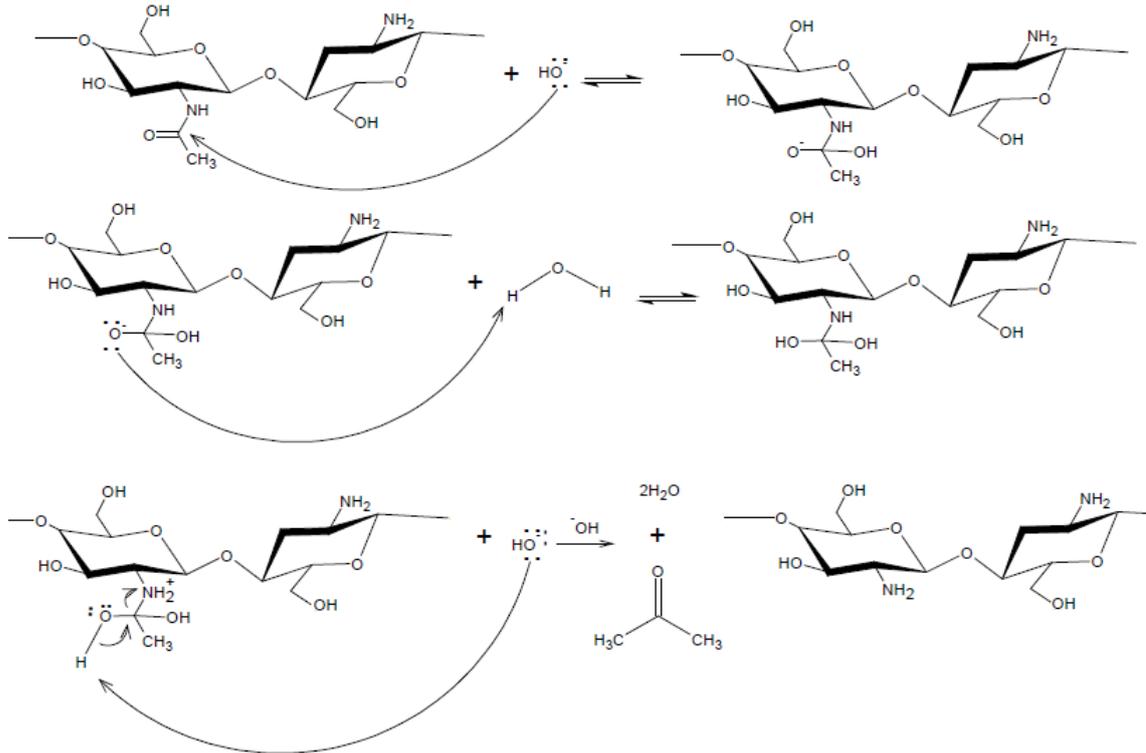
Com o objetivo de avaliar o efeito dos derivados de quitosana na inibição dos fungos *Alternaria solani*, *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum*, foram sintetizados derivados com proporções fixa dos grupos dietilaminoetil e dodecil com massa molecular de 9,3 kDa. O primeiro passo foi realizado utilizando-se quitosana altamente desacetilada (CH, GD = 93,3%), a qual foi ainda modificada para obter um primeiro derivado contendo apenas grupos DEAE com um grau de substituição (DS_{DEAE}) de cerca de 39,8%, seguido da reação de alquilação obtendo DS_{DOD}= 15%. É importante salientar que derivados com proporções similares foram sintetizados e testados como biofungicidas contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, obtendo-se excelentes resultados (GABRIEL, 2015; DIAS, 2018).

5.1 Reação de Desacetilação da Quitosana

A reação de desacetilação da quitosana ocorreu por hidrólise básica da amida, como mostrado na Figura 4. Nesse processo o íon hidroxila ataca o carbono da carbonila da amida, se caracterizando como uma adição nucleofílica da hidroxila ao grupo carbonila. Devido à reação ser realizada em meio aquoso, ocorre transferência de prótons H^+ do meio para o intermediário tetraédrico aniônico.

Posteriormente, sucede-se a protonação do nitrogênio amino e um ataque de hidroxila ao hidrogênio ligado ao álcool do intermediário tetraédrico. Tal processo tem como consequência a clivagem entre o carbono e o nitrogênio, formando assim a estrutura da quitosana com mais grupos amina livres (TIERA et al., 2006).

Figura 4 - Representação do mecanismo de reação de desacetilação da Quitosana



Fonte: Autoria Própria

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por meio de análise potenciométrica e Ressonância Magnética Nuclear (RMN-H). Os espectros de infravermelho confirmou a reação.

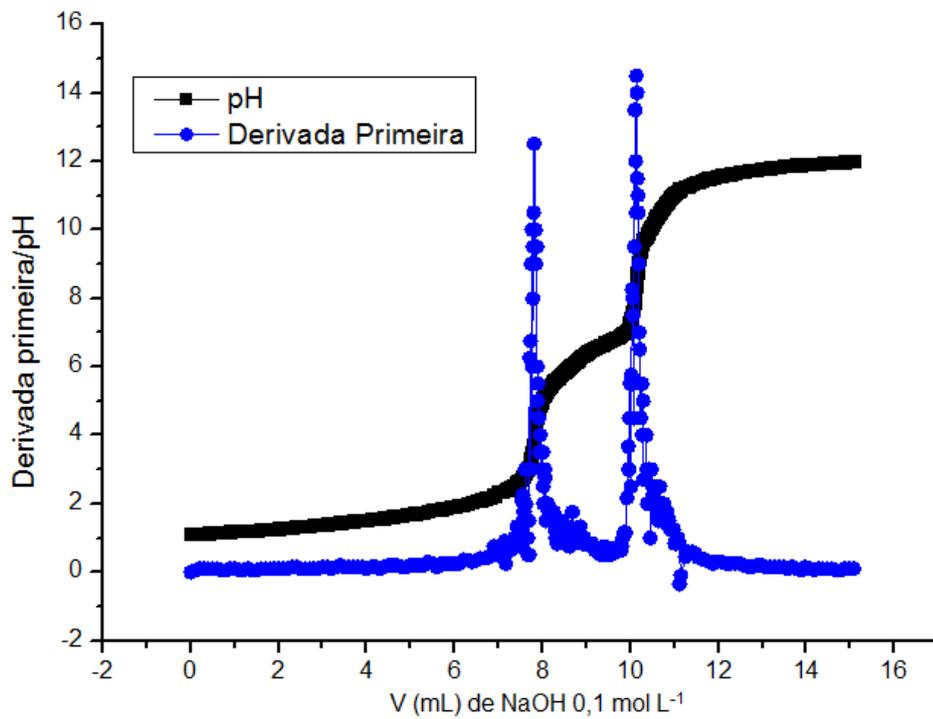
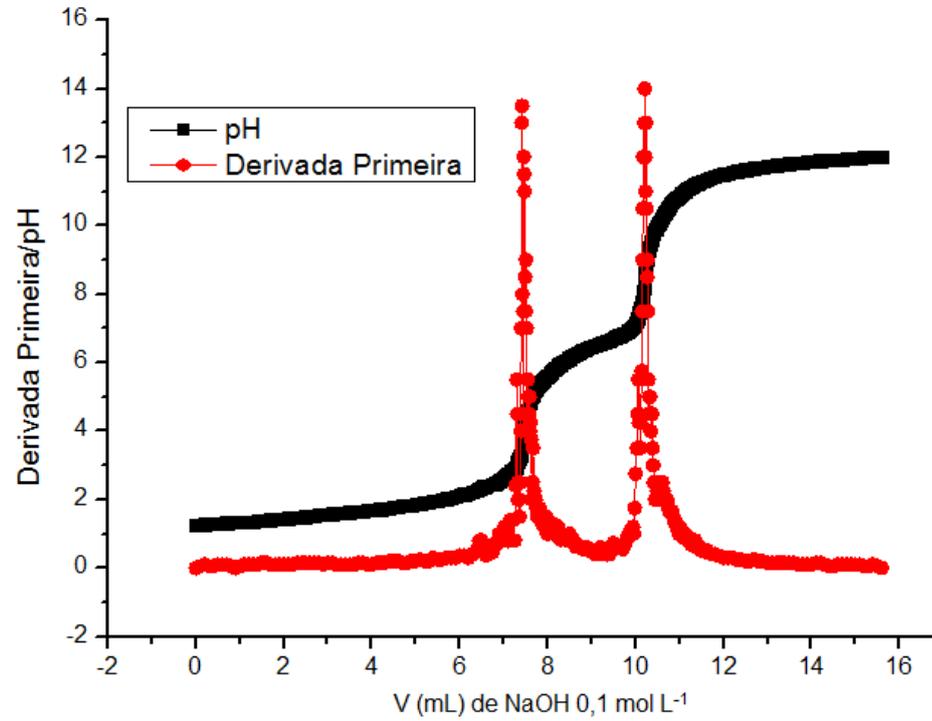
5.1.1 Análise Potenciométrica

Segundo Tolaimate e colaboradores (2000), na titulação potenciométrica é realizado um aumento gradual do pH pela da adição de hidróxido de sódio, indicando o consumo de prótons em excesso de ácido clorídrico. As alterações devido ao consumo dos prótons em solução são observadas ao integrar as alterações de pH pelo volume consumido de NaOH, como observado na Figura 5. O primeiro pico é proveniente do consumo do excesso de ácido e o início da desprotonação dos grupos amino. O segundo é resultado do termino da desprotonação desses grupos. Por meio do volume de hidróxido de sódio consumido para desprotonação dos grupos amino da quitosana é possível calcular o grau médio de desacetilação com uso da equação 1.

$$\overline{GD} = \frac{V_{NaOH} \times M_{NaOH}}{(V_{NaOH} \times M_{NaOH}) + \frac{m_T - (V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times 161,22)}{203,24}} \quad (1)$$

Onde m_T representa a massa de quitosana utilizada na análise; 161,22 a da unidade repetitiva de quitosana totalmente desacetilada e 203,22 a massa da unidade repetitiva da quitosana totalmente acetilada; V_{NaOH} o volume utilizado de base na titulação; M_{NaOH} a concentração molar base. Na primeira análise foi obtido $GD=97,8\%$ e na segunda $GD=94,8\%$.

Figura 5 - Curvas Potenciométricas obtidas pela titulação da solução com quitosana por adição de hidróxido de sódio.

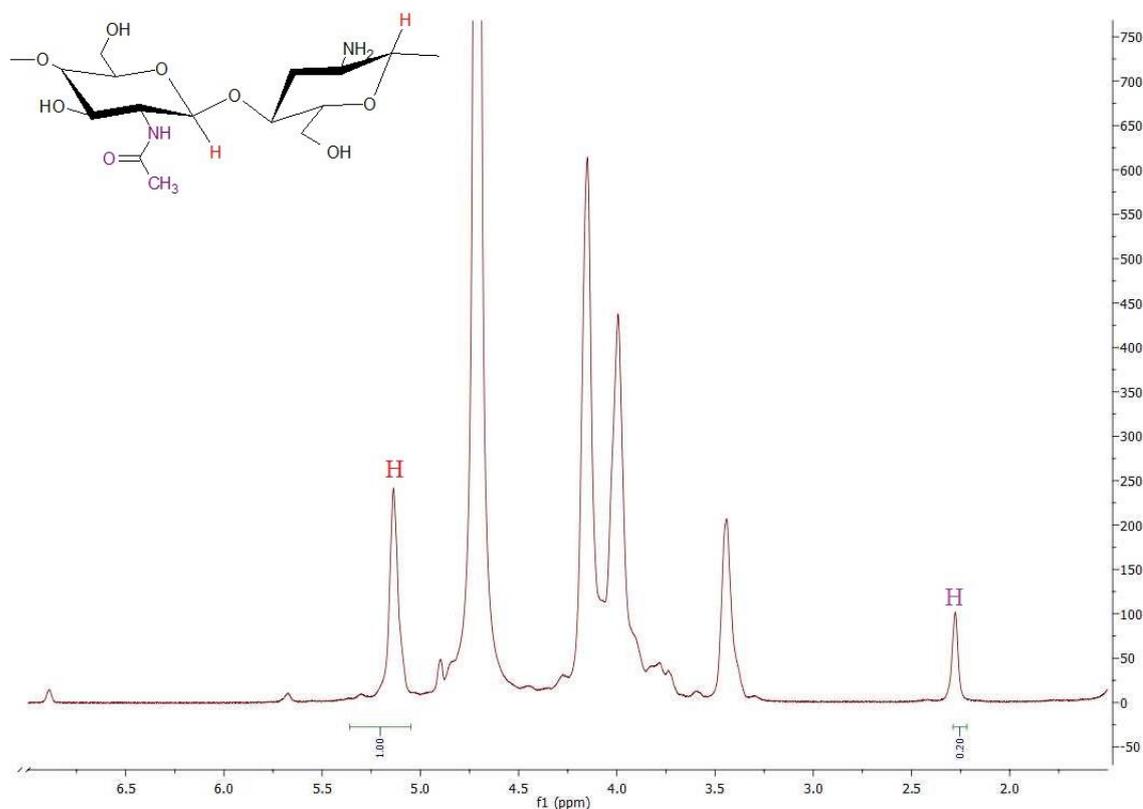


5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)

A determinação do grau médio de desacetilação da quitosana por RMN-H foi realizada segundo o método de Lavertu, et al., (2003). A Figura 6 apresenta o espectro de RMN-H da quitosana desacetilada. O sinal dos hidrogênios pertencentes ao grupo acetamido é apresentado em 2,28 ppm. Os sinais dos carbonos ligados ao anel são observados em 3,45 ppm, na região de 3,68-4,33ppm e em 5,14ppm. Os hidrogênios ligados ao carbono 2 em 3,45 ppm, na região de 3,68-4,33 ppm os hidrogênios ligados aos carbonos 3,4,5 e 6; já o hidrogênio anomericos do monômero aparece na região de 5,14 ppm. Por meio da integração dos picos presentes em 5,14 ppm e 2,28 ppm e a utilização da equação e foi possível determinar os graus médios de desacetilação. Na equação 1, A_{H3} representa sinal dos hidrogênios pertencentes ao grupo acetamido e A_{H1} representa o sinal dos hidrogênios anomericos do monômero. Portanto, pela equação 1, obteve-se 93,3% para o grau de substituição.

$$\overline{GD} = 1 - \frac{A_{H3}}{3A_{H1}} \quad (2)$$

Figura 6 - Espectro de RMN-H da quitosana desacetilada em D₂O/DCI a 70°C



5.1.3 Infravermelho (IR)

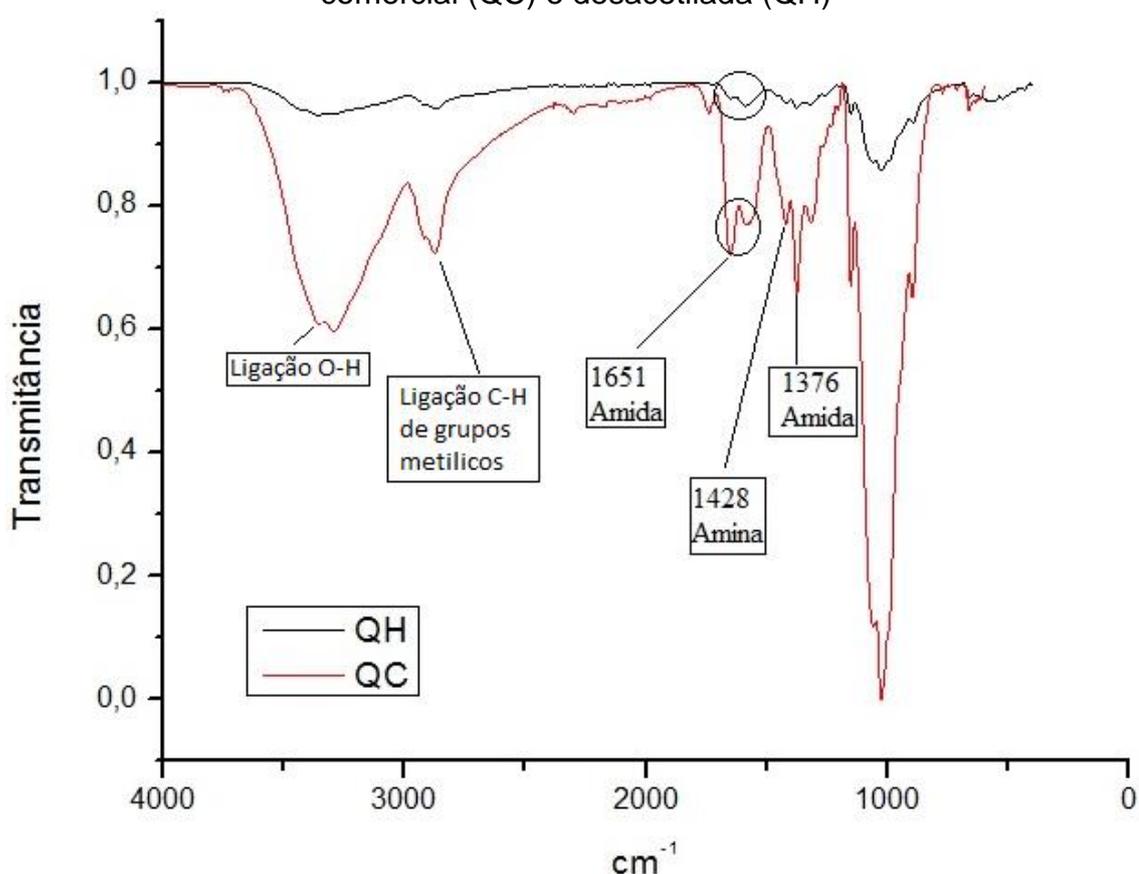
Os espectros de IR obtidos das quitosanas comercial e desacetilada se encontram na Figura 7. Neste espectro observa-se que ambas quitosanas possuem banda de vibração de estiramento axial dos grupos hidroxila na região de 3400 cm^{-1} , estando sobreposto o estiramento das ligações nitrogênio-hidrogênio.

Segundo Dos Santos e colaboradores (2003) a banda do grupo amida do substituinte apresenta um pico discreto em 1625 cm^{-1} e um intenso em 1650 cm^{-1} . Devido ao elevado grau de acetilação a quitosana comercial apresenta esses picos de maneira bem evidente, já na quitosana desacetilada esses picos são pouco evidentes.

Também é possível diferenciar os dois tipos de quitosana analisando a região entre 1450 a 1300 cm^{-1} . Onde na região de 1308 a 1385 cm^{-1} ocorre a deformação axial da ligação carbono-nitrogênio do grupo amida, enquanto a deformação da ligação carbono-nitrogênio presente no grupo amino ocorre por volta de 1425 cm^{-1} (DOS SANTOS et al., 2003).

Na Figura 7 observa-se os picos 1376 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} e 1651 cm^{-1} , onde a quitosana desacetilada sintetizada apresenta picos brandos em comparação com a quitosana comercial.

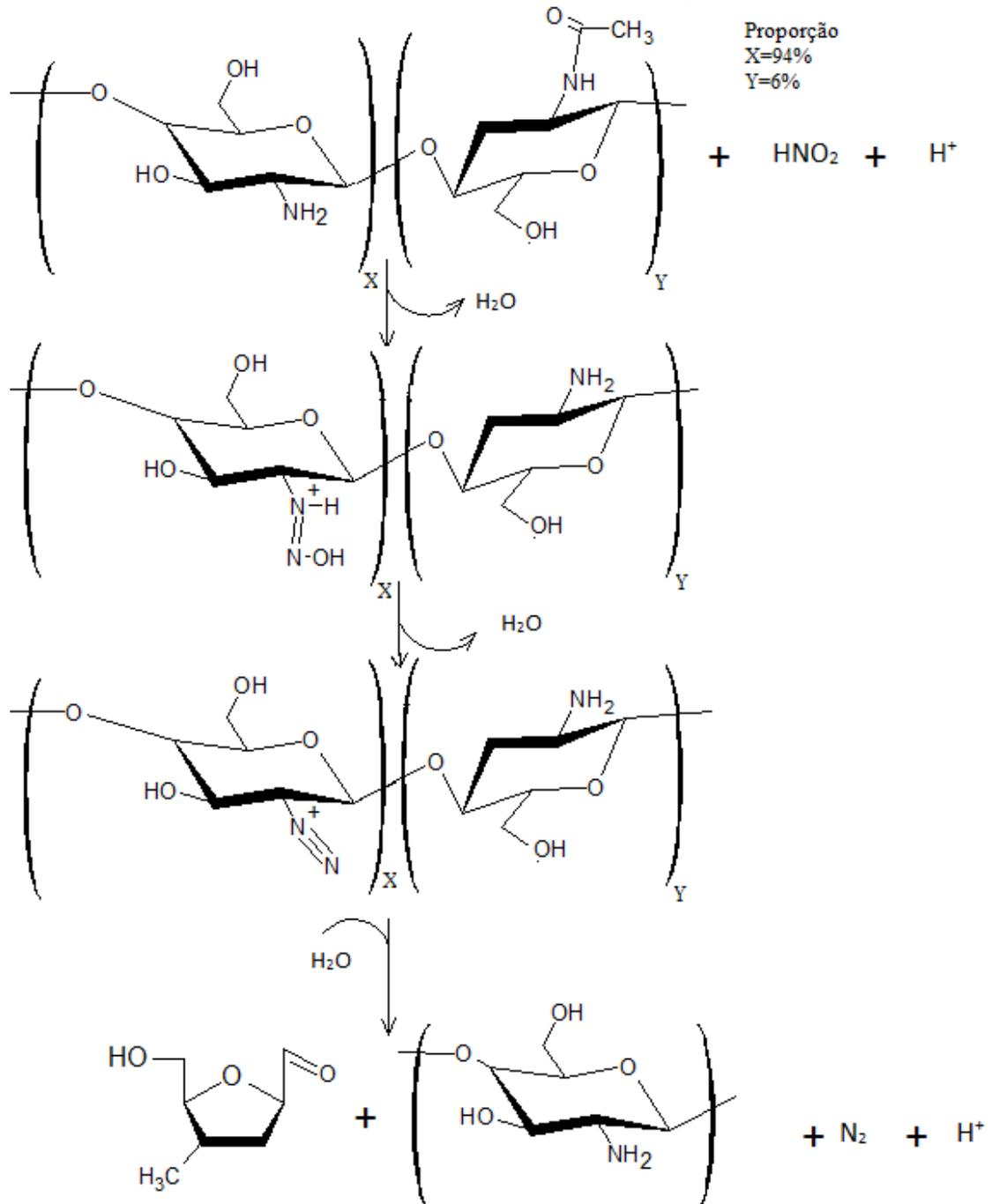
Figura 7 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (QC) e desacetilada (QH)



5.2 Reação de Degradação da Quitosana

Como mostrado na Figura 8, a reação de degradação ocorreu por reação com nitrito de sódio, na qual foram rompidas as ligações glicosídicas do polímero, produzindo assim quitosana de menor massa molecular. A reação ocorreu por meio da desaminação de uma unidade da quitosana e formação de 2,5 anidro-D-manose como unidade redutora final. O procedimento ocorreu em meio ácido utilizando o procedimento descrito por Tommeraas et al.,2001).

Figura 8 - Esquema da Reação de Degradação



Fonte: Autoria Própria

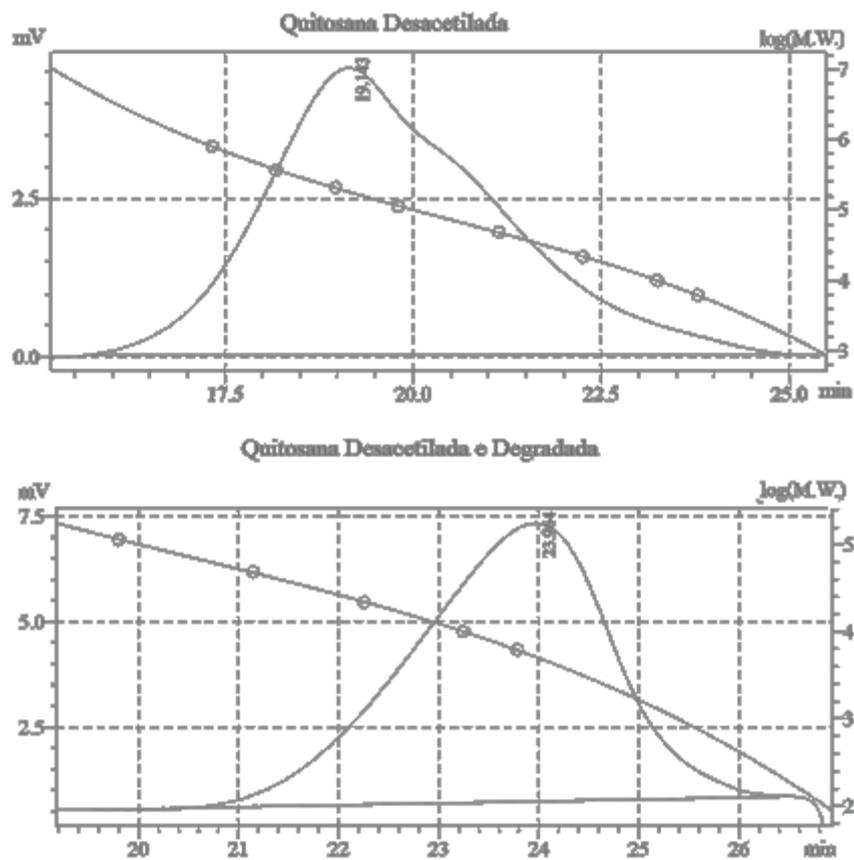
5.2.1 Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR)

Com o uso da técnica de GPC foi possível determinar a massa molar ponderal média (M_w) e a massa molar média (M_n), e por meio da relação M_w/M_n

obteve-se a polidispersividade (PD), que por sua vez propiciaram avaliar a amplitude da distribuição das massas molares dos polímeros.

A partir dos cromatogramas das quitosanas desacetiladas (QH) e quitosanas desacetiladas degradadas (QHd), Figura 9, é possível observar que as quitosanas QHd apresentam tempo de retenção superior às quitosana QH, indicando processo de degradação da cadeia. Esta análise está baseada no processo de separação que utiliza coluna de material poroso, o qual permite a eluição de moléculas maiores mais rapidamente que as moléculas menores.

Figura 9 - Cromatograma de Quitosana Desacetilada e Quitosana Desacetilada e Degradada



Os resultados mostrados na Tabela 2 indicam que o processo de degradação da quitosana reduziu Mw de 184,9 kDa para 9,3 kDa, também ocorrendo uma diminuição na polidispersividade do polímero diminuindo a sua heterogeneidade. Através da divisão dos valores de Mw/Mn é possível calcular a polidispersividade dos polímeros.

Tabela 2 - Comparativo entre os valores de massa de QH e QHd

Amostras	Mn (kDa)	Mw (kDa)	PD	Tempo de Retenção
Quitosana Desacetilada	62417	184909	2,96	19,1 min
Quitosana Degradada	4294	9338	2,17	23,9 min

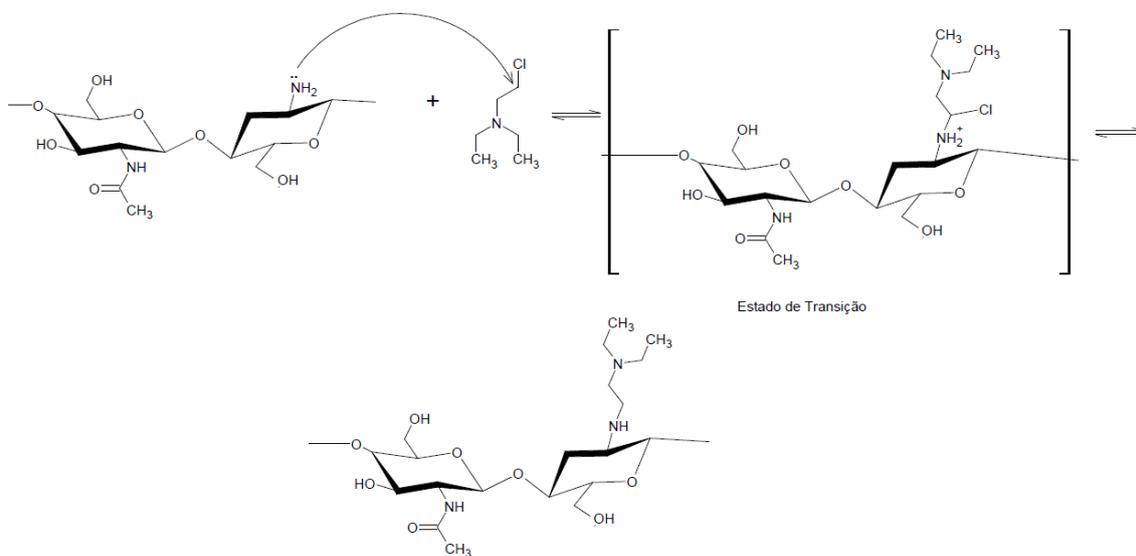
*A massa molar média, **Massa Molecular Ponderal Média, ***Polidispersividade

Utilizando a Tabela 2 é possível notar que após o processo de degradação houve uma diminuição da polidispersividade e aumento do tempo de retenção do polímero após a degradação do polímero. A redução da polidispersividade indica que houve uma homogeneização do polímero. O aumento do tempo de retenção pode ser um indicativo da efetividade da reação de degradação onde o polímero degradado, por possuir baixa massa molecular, fica mais tempo retido na coluna cromatográfica.

5.3 Síntese do Derivados de Quitosana Hidrofílico

A síntese da quitosana com dietilaminoetila (DEAE) consiste em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN_2), onde o nucleofilo amina da quitosana ataca o carbono ligado ao cloro da molécula cloro-N,N-dietilaminoetila (DEAE). Sendo formado um estado de transição seguido do rompimento da ligação C-Cl e a formação de ligação N-C. O mecanismo de reação é mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Representação do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.



Fonte: Autoria Própria

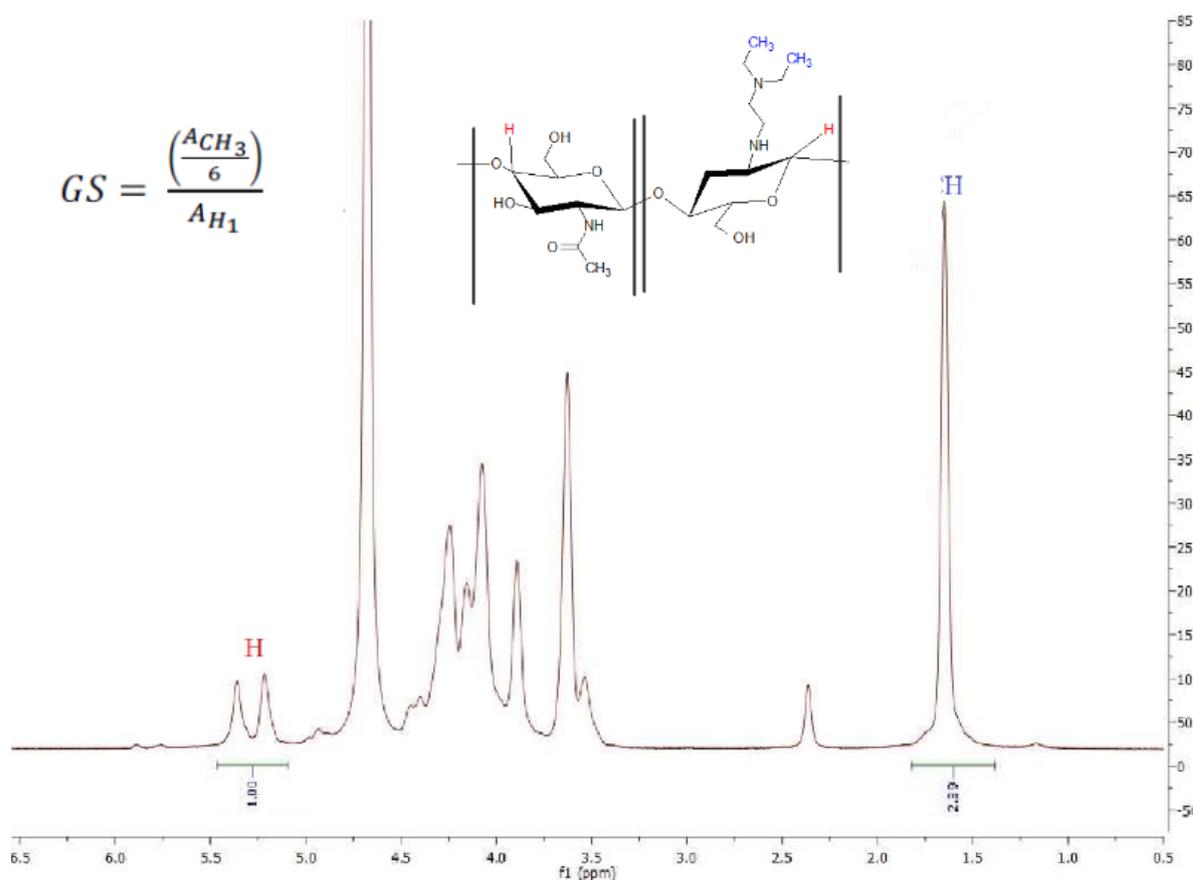
5.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)

Utilizou-se a Técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H) para determinar o grau de substituição (GS). O espectro da quitosana substituída com grupos DEAE, apresentado na Figura 11, indicou um pico em 1,63 ppm que é característico de hidrogênio do grupo metila pertencente ao grupo DEAE. Para efetuar os cálculos do grau de substituição foi realizada a integração dos picos do RMN da Figura 11 e aplicado na equação 3:

$$GS = \frac{\left(\frac{A_{CH_3}}{6}\right)}{A_{H_1}} \quad (3)$$

Onde, A_{CH_3} refere-se a área dos hidrogênios dos grupamentos metila presentes na cadeia do DEAE e A_{H_1} refere-se a área correspondente aos hidrogênios anoméricos da cadeia polimérica da quitosana. Utilizando esses cálculos obteve-se o grau de substituição de 39,83%.

Figura 11 - Espectro de RMN H de Quitosana com grupo DEAE



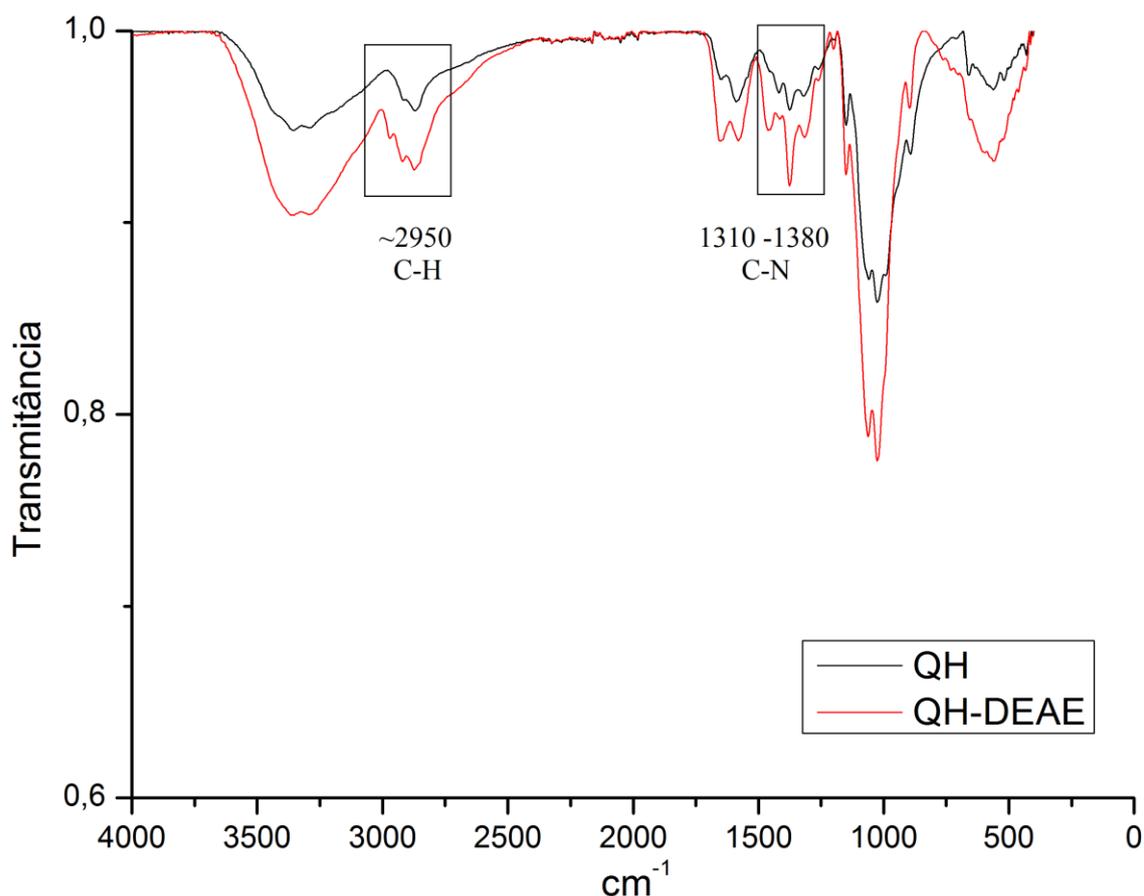
5.3.2 Infravermelho (IR)

Foi utilizado a técnica de espectroscopia por infravermelho (IR) para se analisar a quitosana modificada apenas por grupos DEAE, Figura 12. Por meio da comparação dos espectros de quitosana + DEAE com quitosana desacetilada observa-se presença de bandas na quitosana modificada que não estão presentes na CH. O derivado apresentou pico em 2950 cm^{-1} , esta banda é característica de deformações axiais da ligação C-H, também sendo observado bandas características de deformações axiais das ligações C-N presentes na estrutura molecular do DEAE no intervalo de 1310-1380. (YOO et al., 2005).

Os espectros de FTIR da quitosana desacetilada (CH) e do polímero modificado apenas com grupos DEAE (CH-DEAE) são apresentados na Figura 12. A partir da comparação dos espectros é possível observar a presença de bandas no espectro do derivado CH-DEAE que estão ausentes no espectro da CH. Para o derivado CH-DEAE é observada a presença das bandas características oriundas das

deformações axiais da ligação C-H por volta de 2950 cm^{-1} além das bandas características presentes no intervalo de $1310\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$ que correspondem às deformações axiais das ligações C-N presentes na estrutura molecular do DEAE (YOO et al., 2005).

Figura 12 - Espectros de absorção na região do infravermelho da quitosanas desacetilada (QH) e da substituída com grupo DEAE (QH-DEAE).



5.3.3 Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR)

Os estudos referentes à capacidade antimicrobiana da quitosana e dos seus derivados, extraídos de diversas fontes e sob diferentes condições, são inúmeros. Observa-se em muitos trabalhos uma grande discrepância nos resultados obtidos, o que é muito comum, uma vez que a atividade da quitosana 'in vitro' é dependente de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, que estão relacionados com a massa molecular, o grau de desacetilação, viscosidade, solventes e concentração ou com

fatores abióticos como o tipo de microrganismo, o meio de cultura, pH, temperatura, força iônica, e presença de íons metálicos (GABRIEL et al., 2015).

Um dos fatores mais importantes que afetam a atividade antimicrobiana da quitosana é a massa molecular (KONG, et al., 2010). A quitosana pode ter diferentes origens e sua massa molecular depende do processo de extração e purificação. Portanto, a avaliação da massa molar é necessária uma vez que a atividade antimicrobiana tem se mostrado dependente desse parâmetro. Por meio da técnica de GPC determinou-se a massa molar ponderal média (Mw) e a massa molar média (Mn), e por meio da relação Mw/Mn obteve-se a polidispersividade (PD) e são listadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de massa, polidispersividade e tempo de retenção da Quitosana e seus derivados

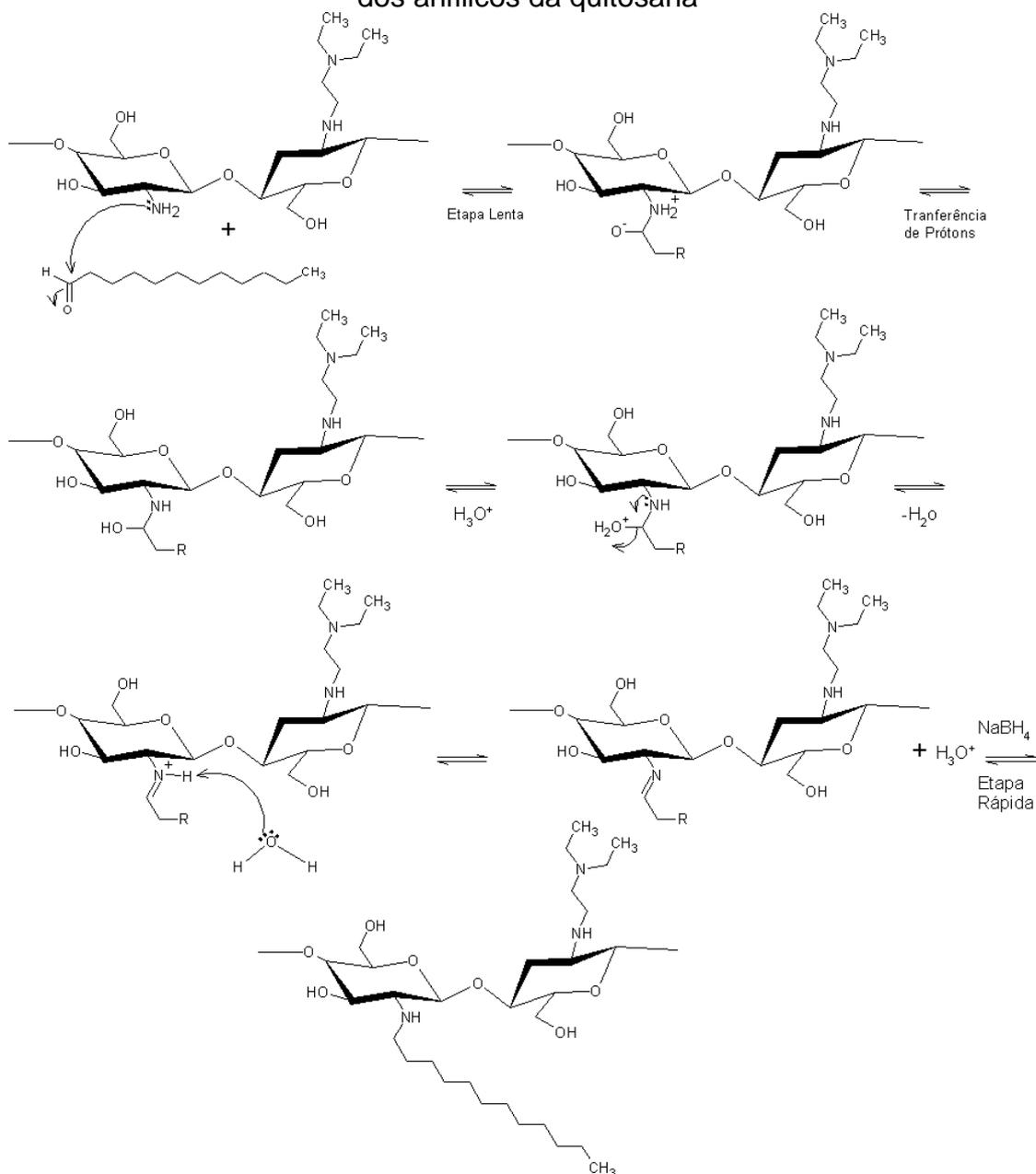
Polímeros	*Mn (Da)	**Mw(kDa)	***PD	Tempo de Retenção
Quitosana Desacetilada	62417	184,9	2,96	19,1 min
Quitosana Degradada	4294	9,3	2,17	23,9 min
Quitosana + DEAE	4185	8,8	2,11	23,9 min

*A massa molar média, **Massa Molecular Ponderal Média, ***Polidispersividade

5.4 Síntese do Derivado Anfifílico

A alquilação da quitosana consistiu em um processo de duas etapas. Na primeira etapa ocorreu a adição nucleofílica envolvendo dois passos: primeiramente há uma etapa lenta na qual ocorre a formação da imina (base de schiff) entre o nitrogênio presente na quitosana e o carbono da carbonila do aldeído. O segundo passo ocorre rapidamente a redução da dupla ligação da base de *schiff*. Tal processo está esquematizado na Figura 13.

Figura 13 - Representação do mecanismo de reação de alquilação para a síntese dos anfilicos da quitosana



Fonte: Autoria Própria

5.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H)

Foi utilizado a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-H) para determinar o grau de substituição (GS). Na Figura 14 é possível observar o RMN de cada um dos polímeros sintetizados, sendo evidente a presença de pico característico de grupo DEAE em 1,66 pm com a mesma intensidade na

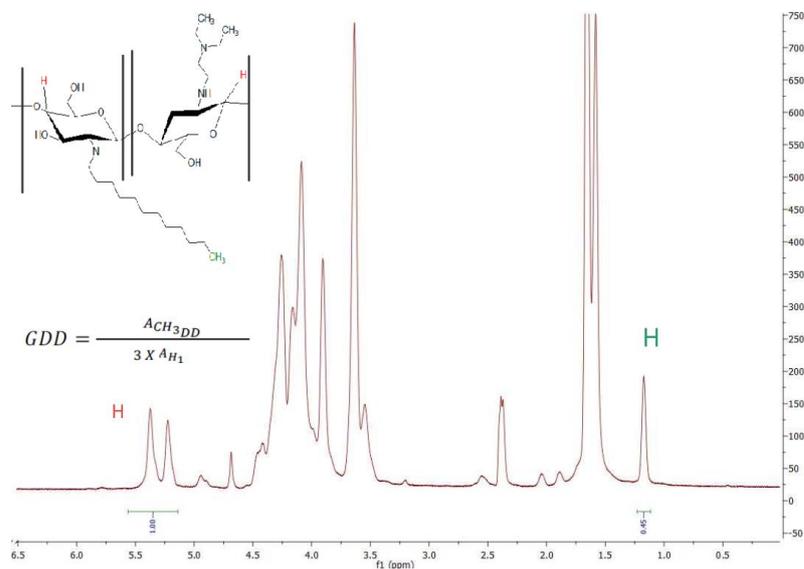
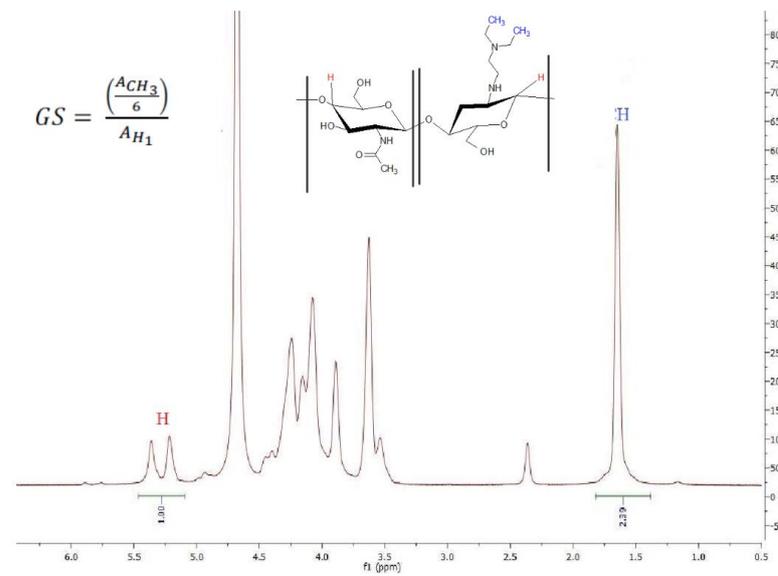
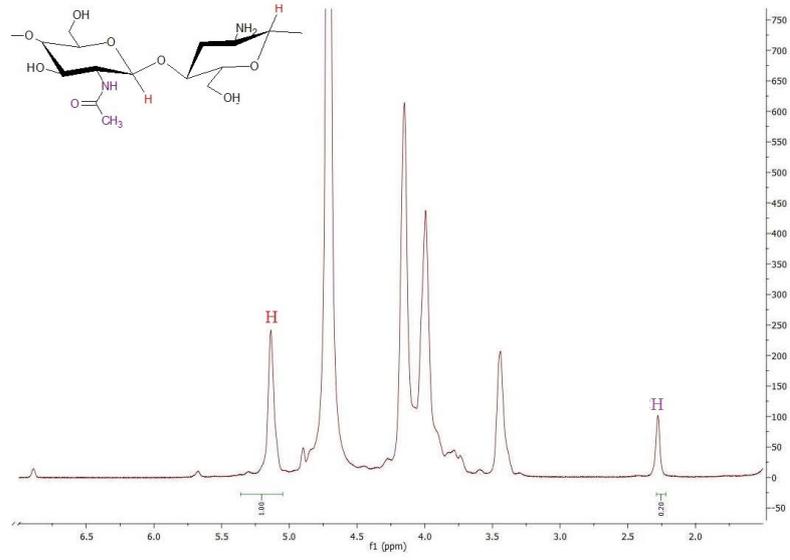
QHdDEAE e QHdDEAE DOD, sendo que neste último é possível observar a presença de pico característico de grupo Dodecil em 1,33 pm. Por meio desses dados é possível demonstrar a efetividade do procedimento.

Através da integração das áreas dos picos obteve-se dados referentes aos hidrogênios do grupo CH₃ do substituinte doceila em 1,3 ppm e os hidrogênios anoméricos dos monômeros na região de 5,3 a 5,5 ppm.

$$GDD = \frac{A_{CH_3DD}}{3 \times A_{H_1}} \quad (3)$$

Onde, ACH_{DD} é a área dos picos referentes aos hidrogênios do grupo CH₃ do substituinte dodecila e AH₁ representa respectivamente os hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados, desacetilados e substituídos. Utilizando esses cálculos obteve-se 15% de substituição.

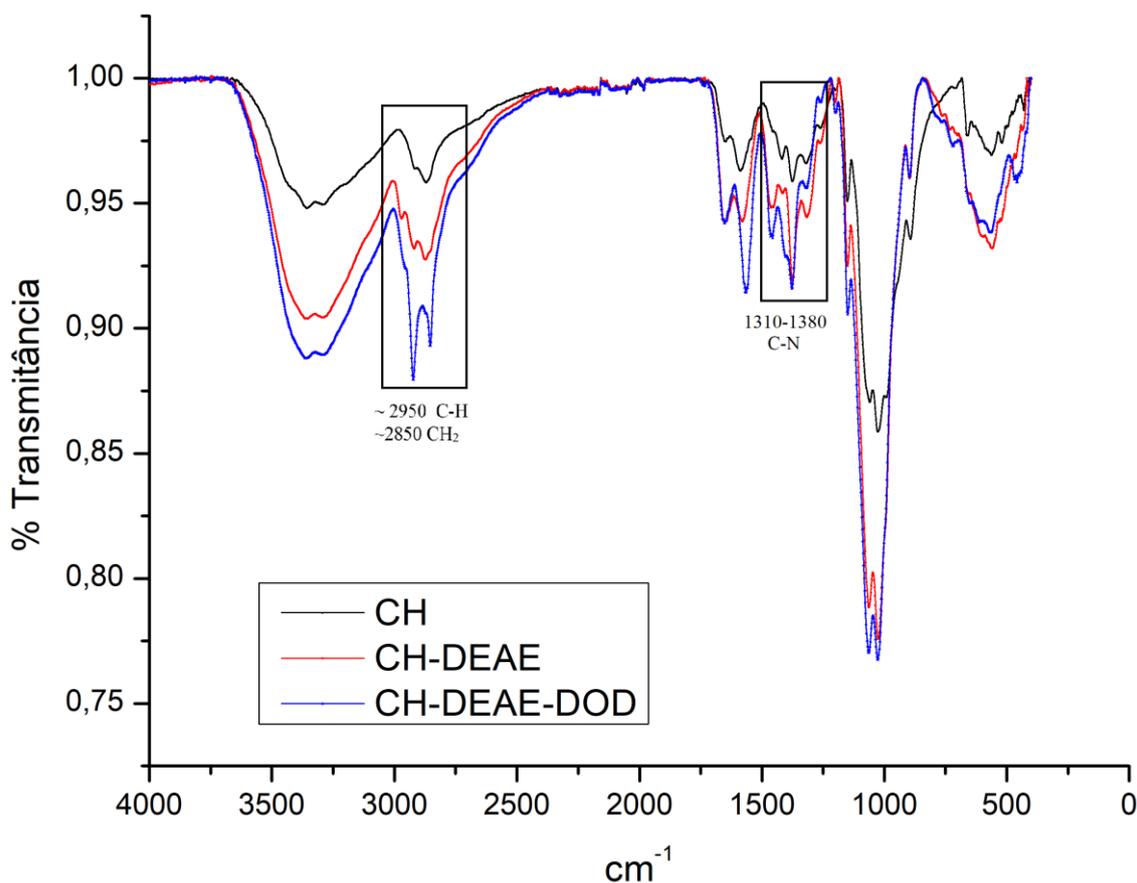
Figura 14 - Espectros de RMN H da Quitosana desacetilada e seus Derivados substituídos com grupos DEAE e DODECIL



5.4.2 Infravermelho (IR)

Os espectros de IR da quitosana desacetilada (CH) e do polímero modificado com grupos Dodecil e DEAE estão apresentados na Figura 15. A partir da análise dos espectros foi possível observar a presença de bandas de maior amplitude do derivado CH-DD com relação a CH. Observa-se no do polímero dodecilado presença de bandas características próximo a 2950 cm^{-1} resultado das deformações axiais da ligação C-H dos grupos CH_3 , assimétrico e simétrico, e do grupo CH_2 em 2850 cm^{-1} (GABRIEL, 2013).

Figura 15 - Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (desacetilada (CH) e seus derivados (CH-DEAE) e CH-(DEAE-DOD).



Na Tabela 4 estão expostos o resumo dos principais resultados das sínteses descritas acima.

Tabela 4 - Características dos Polímeros Sintetizados

Polímeros	*Mw(kDA)	**PD	***GS DEAE (%)	***GS DOD (%)
Quitosana Desacetilada	184,9	2,96	-----	-----
Quitosana Degradada	9,3	2,17	-----	-----
Quitosana + DEAE	8,8	2,11	39,8	-----
Quitosana +DEAE +Dodecil	-----	-----	39,8	15

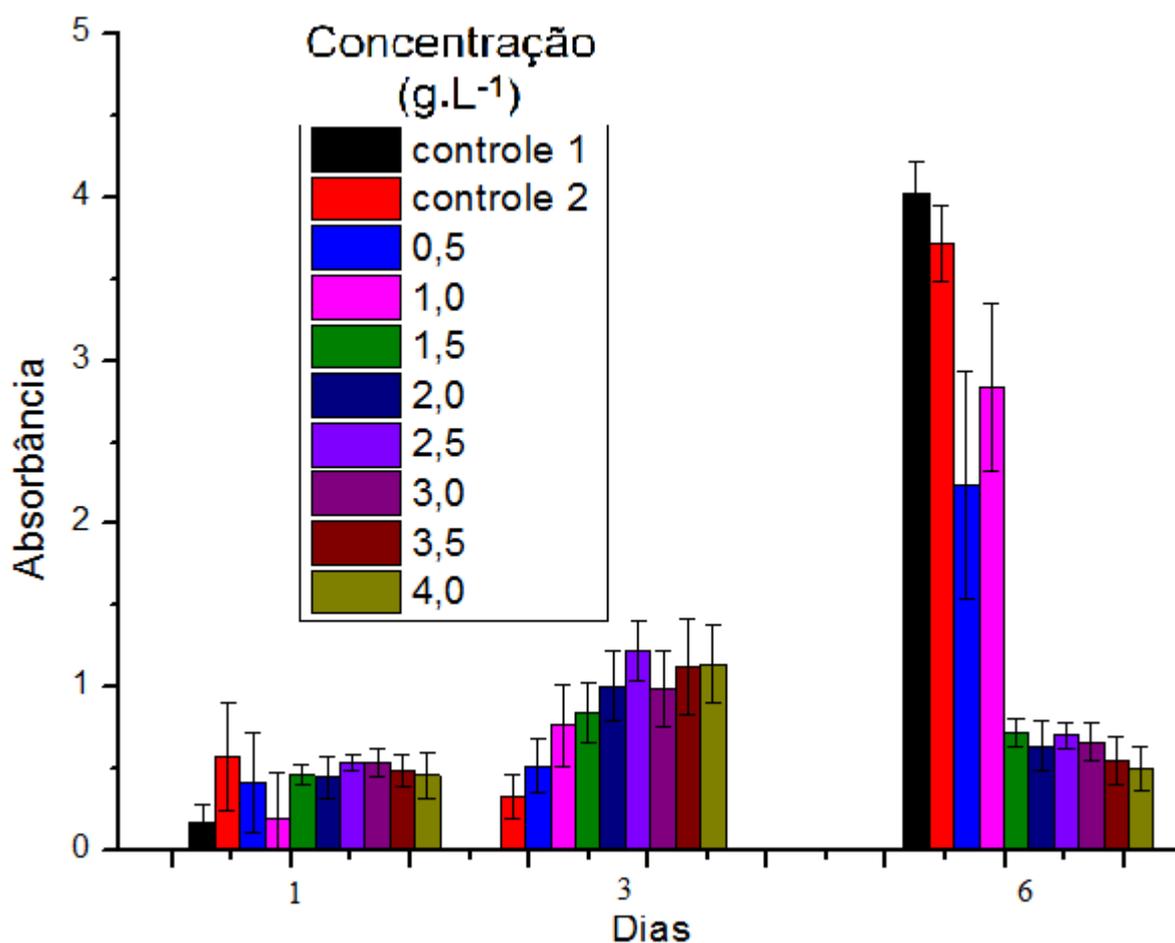
*Massa Molecular Ponderal Média, **Polidispersividade,*** Grau de Substituição

5.5 Atividade antifúngica

Como descrito no item 4.3 a atividade antifúngica para quitosana e seus derivados foram testados contra o fungo *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* e *Penicillium expansum* nas concentrações de 0,5 à 8 g·L⁻¹. Na Figura 16 são apresentadas as absorvâncias do meio de cultura na presença de concentrações crescentes de Quitosana Comercial (Mw=184,9 kDa e GD=72%) após 1 (24 horas), 3 (72 horas) e 6 (144 horas) dias de cultura. Os valores de absorvância obtidos são proporcionais o crescimento com o tempo.

A partir da Figura 16 verifica-se que até o 3º dia, o crescimento é muito reduzido para toda a faixa de concentração estudada (0,5- 4,0 g·L⁻¹). No sexto dia fica evidente o efeito da concentração da quitosana. Claramente observa-se que no sexto dia o crescimento é significativo somente até a concentração de 1,0 g·L⁻¹. Os demais fungos apresentaram resultados semelhantes durante o acompanhamento do crescimento. Este comportamento é similar aquele obtido por Chen e Colaboradores (2014), Coqueiro e colaboradores (2011) e Canaver e colaboradores (2011).

Figura 16 - Diferença da Transmitância dos poços contendo fungo *Alternaria alternata* na presença de Quitosana Comercial em relação ao início da incubação



Os resultados foram tratados utilizando-se a metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2012). O crescimento do fungo na ausência de quitosana foi utilizado como um controle positivo, e meio de cultura sem fungo foi utilizado como controle negativo. Para avaliação da porcentagem de inibição o crescimento dos fungos foi sempre medido 6^o dia.

A porcentagem de inibição (I%) foi calculada segundo a equação 4,

$$I_{\%} = \frac{(A-B)}{A} \cdot 100 \quad (4)$$

Sendo que “A” corresponde absorvância decorrente do crescimento do fungo na ausência de quitosana e seus derivados; “B” corresponde ao crescimento do

fungo na presença de concentrações crescente de quitosana. Todos os valores foram subtraídos dos brancos, que correspondem ao meio de cultura no dia zero, ou o meio de cultura mais a quitosana no dia zero. As medidas foram realizadas em triplicata.

5.5.1 Atividade Antifúngica contra o fungo *Alternaria alternata*

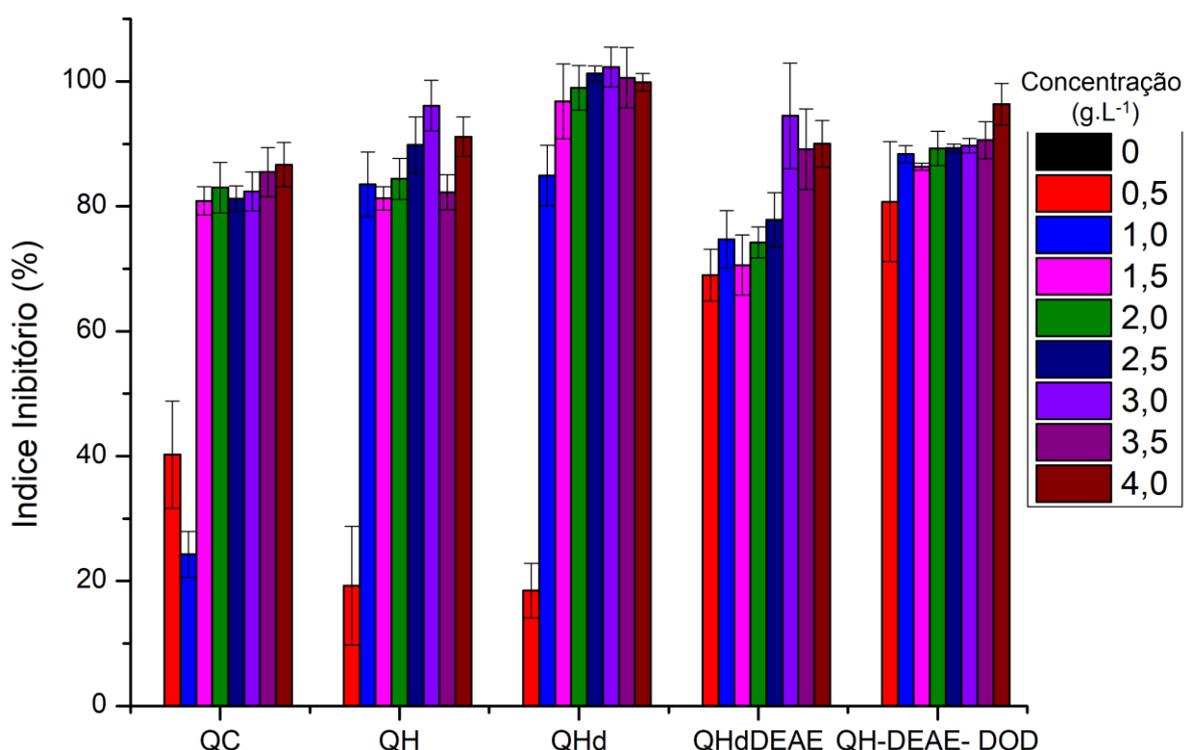
Na Figura 17 são apresentados os resultados da inibição do crescimento *Alternaria alternata* na presença de concentrações crescentes de quitosana (QC) quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd), quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD). É possível notar que para baixas concentrações, especificamente em $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ se destaca a maior eficiência das quitosanas substituídas com grupos DEAE (QHd-DEAE) e Dodecil (QHd-DEAE-DOD), as quais inibiram o crescimento do fungo em 70% e 80% respectivamente, o que indica que essas quitosanas interagem mais fortemente com os fungos. Para maiores concentrações, a quitosana degradada apresentou maior eficiência e os valores de inibição aproximaram-se de 100% a partir de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Na concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a quitosana desacetilada possui um índice inibitório superior a quitosana comercial, evidenciando a importância da disponibilidade de grupos amino para maior eficiência na inibição de microrganismo. Este resultado está de acordo com o trabalho de Chen e Colaboradores (2014).

A partir da concentração de $1,0$ a $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ todos os polímeros exibiram índices de inibição muito próximos entre si, permanecendo em torno de 80-90%. Os resultados obtidos são similares aqueles reportados por REDDY e colaboradores (2010). Nesse trabalho os autores indicaram que a inibição *in vitro* do crescimento de *Alternaria Alternata* estava diretamente correlacionada com a concentração da quitosana. Entretanto, acima de $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a inibição de fungo permaneceu em torno de 70%. Portanto fica evidente que os derivados QHd-DEAE e QHd-DEAE-DOD apresentaram maior efeito antifúngico em concentração inferior, o que pode ser considerado uma vantagem do ponto de vista econômico. Este resultado está de acordo com trabalhos recentemente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, onde a utilização de derivados anfifílicos de quitosana, mostraram excelente

atividade de inibição em baixas concentrações contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Gabriel et al., 2015, Viegas et al., 2013, Pedro et al., 2013).

Figura 17 - Índice de inibição do fungo *A. Alternata* na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD).



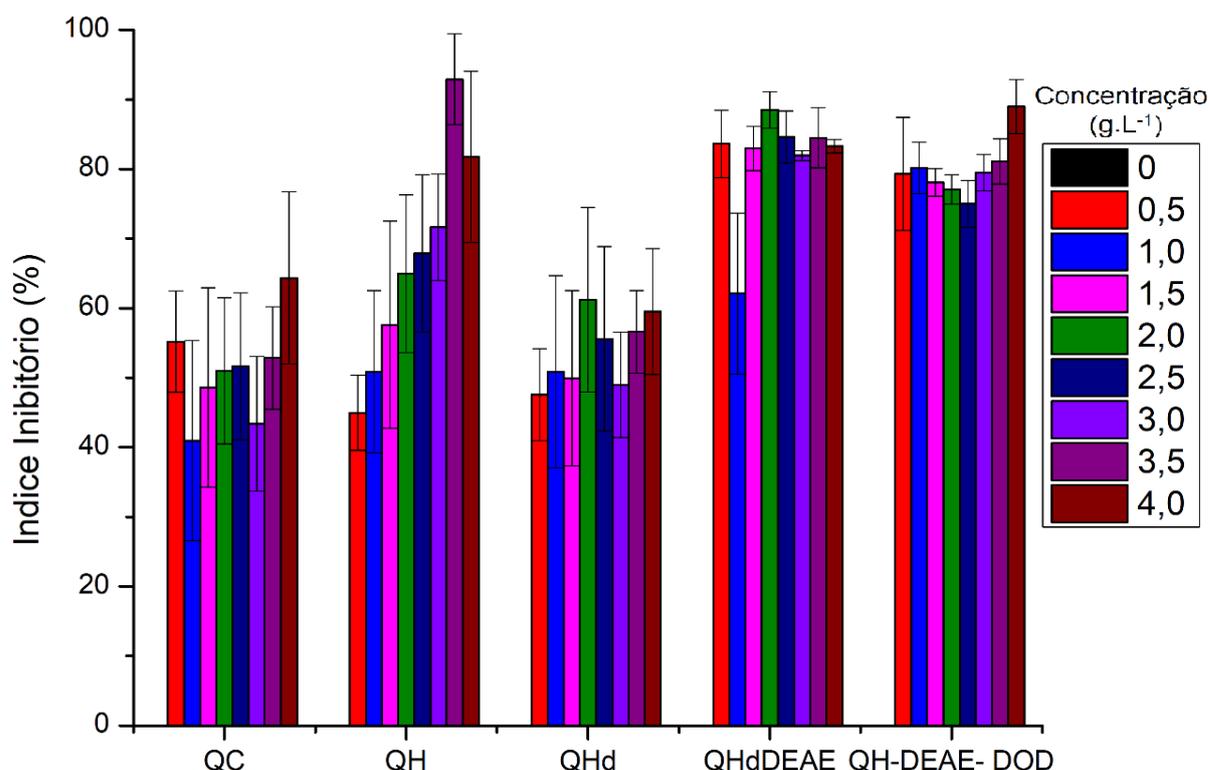
5.5.2 Atividade Antifúngica contra o fungo *Alternaria solani*

Na Figura 18 são apresentados os resultados da inibição do crescimento *Alternaria solani* na presença de concentrações crescentes de quitosana comercial (QC) quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD). Na Figura 18 é possível observar que a inibições promovidas pelas quitosanas comercial (QC) e desacetilata (QH) são um pouco menores. Para as quitosanas modificadas com grupos DEAE (QHd-DEAE) e a anfifílica (QHd-DEAE-DOD) o efeito antifúngico foi similar aquele obtido contra *Alternaria alternata*, sendo que na concentração de 0,5 g.L⁻¹ a inibição foi superior a 80%. Portanto, as

modificações na estrutura da quitosana contribuíram para que os derivados apresentassem índices de inibição maiores que QC e QHd que permaneceram em torno de 50%. O índice de QH é superior a partir da concentração 2,0 g·L⁻¹, com 60% de inibição, chegando a 94% de inibição somente na concentração de 3,5 g·L⁻¹.

Os resultados indicaram que a massa molecular tem um efeito pequeno na atividade antifúngica, uma vez que a quitosana desacetilada degradada (QHd) apresentou um índice de inibição ligeiramente menor que a quitosana não degradada (QH) a partir da concentração de 2,5 g·L⁻¹. Este resultado está de acordo com Coqueiro (2011), que avaliou o crescimento do fungo na faixa de 0,125 g·L⁻¹ à 0,5 g·L⁻¹ de quitosanas com massas moleculares de 50 a 310 kDa. Os autores concluíram que a massa molecular não influenciou significativamente a atividade antifúngica *in vitro*. Nesse trabalho o índice inibitório da quitosana foi por volta de 50% na concentração de 0,5 g·L⁻¹.

Figura 18 - Índice de inibitório do fungo *A. solani* na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD).

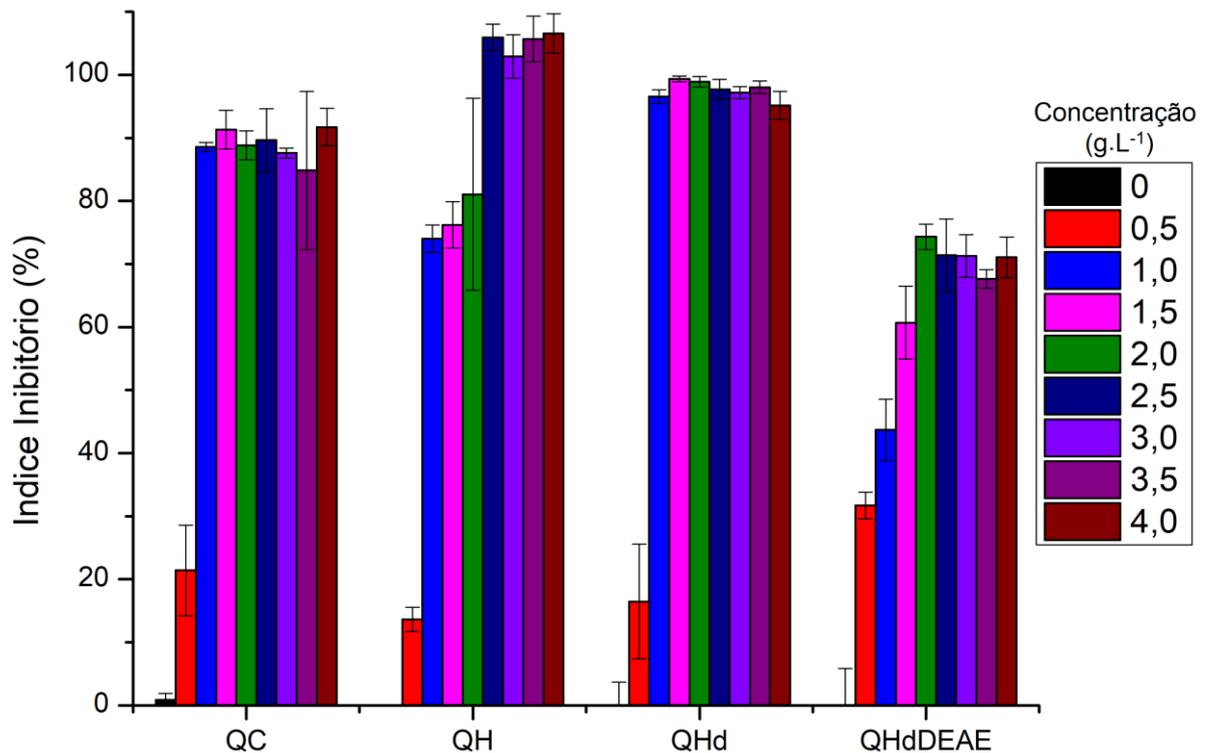


5.5.3 Atividade Antifúngica contra o fungo *Penicillium expansum*

Na Figura 19 são apresentados os resultados da inibição do crescimento *Penicillium expansum* na presença de concentrações crescentes de quitosana (QC) quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd), quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE). Para esse fungo os resultados obtidos com a quitosana anfifílica apresentaram barras de erros muito elevadas e não foram considerados. É possível observar que na concentração de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ todos os polímeros apresentaram índice inibitório em torno de 20%. Na concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ destaca-se a quitosana degradada, apresentando índice em torno de 100%, sendo que este índice se repete nas demais concentrações. A quitosana comercial apresentou índice inibitório próximo a 90% a partir da concentração de $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A quitosana desacetilada apresentou índice inibitório em torno de 100% a partir da concentração de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Este resultado está de acordo com Liu e colaboradores (2007), que mostraram que o aumento da concentração tem papel importante na inibição do crescimento *in vitro* de *Penicillium expansum*. Nesse trabalho avaliou-se o crescimento do fungo na faixa de $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de quitosana e com 85% de desacetilação e o índice inibitório da quitosana foi de 50% na concentração de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O índice inibitório para quitosana substituída com grupos DEAE mostrou-se inferior aos demais derivados indicando que o uso de grupos DEAE reduziu a capacidade inibitória do polímero.

Figura 19 - Índice de inibitório do fungo *P. expansum* na presença Quitosana comercial (QC) e seus derivados quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd) e quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE)



5.6. Viabilidade Celular de Células 3T3 na Presença de Quitosana e seus derivados

A citotoxicidade da quitosana e seus derivados foi examinada com o teste de MTT para células 3T3.

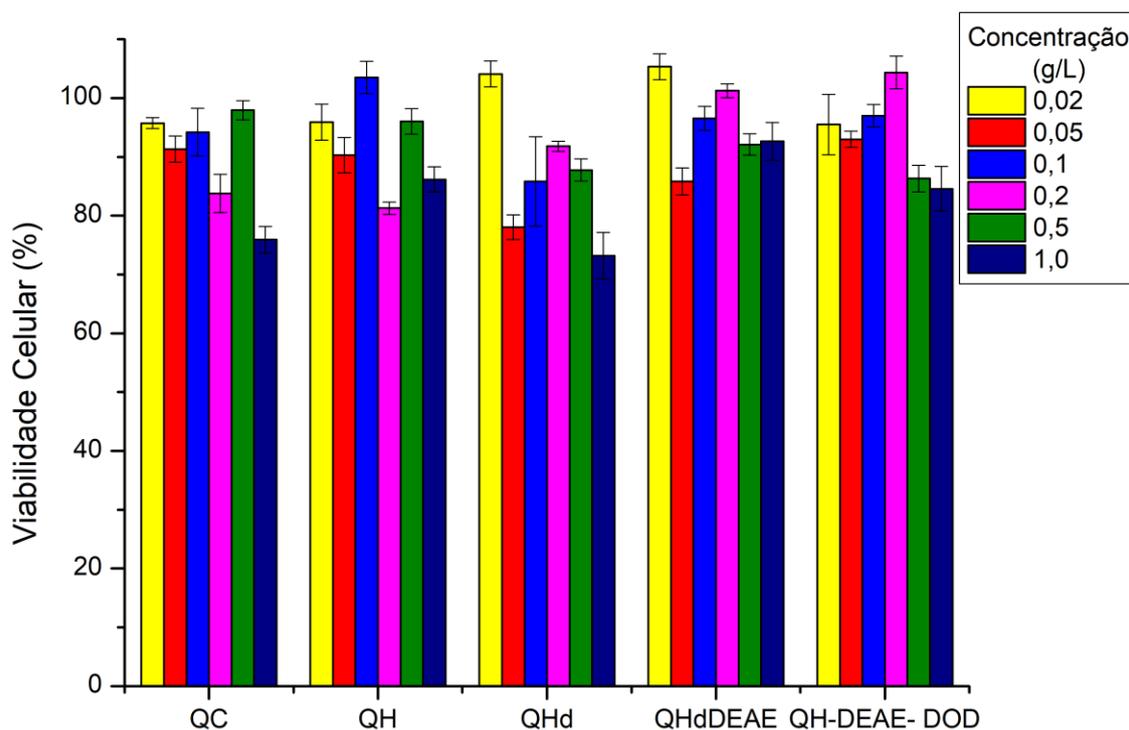
Os resultados de absorbância dos poços foram aplicados na equação 5, com objetivo de calcular a viabilidade celular. Onde “V%” representa a viabilidade celular em porcentagem, “A” representa a absorbância do poço com quitosana e “B” a absorbância do branco (BARBOSA et al. 2016).

$$V(\%) = \frac{A}{B} \cdot 100 \quad (5)$$

O impacto da quitosana e seus derivados sobre a viabilidade celular após um tempo de incubação de 24 horas de células 3T3 é apresentado na Figura 20. Como apresentado no gráfico as células apresentaram viabilidade superior a 70%, na presença de todos os polímeros demonstrando assim uma boa citocompatibilidade. Além disso, as modificações realizadas na quitosana com grupos DEAE e Dodecil não alteraram a viabilidade da quitosana.

A quitosana de baixa massa molecular apresentou menor viabilidade celular, cerca de 70% de viabilidade na concentração de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, entretanto a concentração de $0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ apresenta viabilidade de 100%.

Figura 20 - Viabilidade Celular de células 3T3 na presença de concentrações crescentes de Quitosana comercial (QC), quitosana desacetilada (QH), quitosana desacetilada degradada (QHd), quitosana modificada com grupos DEAE (QHd-DEAE) e quitosana anfifílica (QHd-DEAE-DOD).



6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que os procedimentos utilizados foram eficientes para obter altos graus de desacetilação (>90%). As modificações da estrutura do polímero foram confirmadas por meio das técnicas de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear. A reação de degradação da cadeia polimérica por oxidação em meio ácido mostrou-se bastante precisa, o que foi confirmado por medidas de cromatográfica de permeação de gel.

Os resultados dos ensaios microbiológicos contra o fungo *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* mostram que a inserção de grupos DEAE e dodecil proporcionaram uma maior eficiência na inibição do fungo. Os resultados com o *Penicillium expansum* demonstraram que a quitosana desacetilada degradada tem maior eficiência contra esse fungo e a massa molecular do polímero mostrou-se um fator importante apenas para o fungo *Alternaria alternata*. Nesse trabalho fica evidente que a ação antifúngica dos derivados de quitosana é dependente tanto da estrutura do derivado quanto da natureza do microorganismo. Todos os derivados de quitosana mostraram boa citocompatibilidade evidenciando potencial para realização de testes in vivo, e aplicação em culturas agrícolas, bem como o uso comercial para o controle de outros tipos de fungos.

7. REFERÊNCIAS

BAERT, K.; DEVLIEGHIERE, F.; BO, L.; DEBEVERE, J.; MEULENAER, B. D. The effect of inoculum size on the growth of *Penicillium expansum* in apples. **Food Microbiology**, v. 25, p. 212-217, 2008.

BARBOSA, H. F. G.; LIMA, A. M. F.; TABOGA, S. R.; FERNANDES, J. C.; TIERA, V. A. O.; TIERA, M. J. Synthesis and self-assembly study of zwitterionic amphiphilic derivatives of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, 2016

BEZERRA, A. M. **Síntese e Avaliações Físico-Químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular**. Dissertação (Mestrado em

Química) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2011.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, S.; LAVALL, R. L. Extração, Estruturas e Propriedades de α e β quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CANAVER, B.S.; PIERO, R. M. D., Quitosana e adjuvantes para o controle preventivo do mofo azul da macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n.6, p. 419-423, 2011.

CHEN, J.; ZOU, X.; LIU, Q.; WANG, F.; FENG, W.; WAN, N. Combination effect of chitosan and methyl jasmonate on controlling *Alternaria alternata* and enhancing activity of cherry tomato fruit defense mechanisms. **Crop Protection**, v.56, p. 31-36, 2014

COQUEIRO, D.S.O.; PIERO, R.M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, p.459-463, 2011

DIAS, A.M.; LIMA, A.M.F.; CABRERA, M;P.D.S.; TABOGA, S.R.; VILAMAIOR, P.S.L.; TIERA, M.J.; DE OLIVEIRA TIERA, V.A. Insights on the Antimicrobial Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*: cell wall impairment as a primary effect on growth inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 433-444, 2018

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

EUROPEAN COMMUNITY. **European community coments for the codex committee on food additves and contaminants. Arusha, Tanzania, Mar. 2003**

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for FDA components and industry apple juice, apple juiceconcentrates, and apple juice produc: adulteration whitPatulin.** USA, 2004

GABRIEL, J. S.; **Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados Anfílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.** Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociencias, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (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.

GOY, R. C.; BRITO, D.; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 19, nº 3, p. 241-247, 2009

KLOSTER, A. P. **Análise e Desenvolvimento “em vitro” do efeito antimicrobiano de bandagem bucal.** 2011. Tese (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2011.

KOMI, D. E. A.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International Journal of Advanced Research (Indore)**, v. 4, p. 411–427, 2016

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.

KUMARI, S.; RATHB, P. K. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (*Labeo rohita*) Fish Scales. **Materials Science**, v. 6, p. 482 – 489, 2014

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOSOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Influence of the Chemical Structure and Physicochemical Properties of Chitin- and Chitosan-Based Materials on Their Biomedical Activity. **BIOMEDICAL ENGINEERING TRENDS: MATERIALS SCIENCE**. v.1, p. 25-64, 2011

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M.D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.32, p. 1149-1158, 2003

LIU, J.; TIAN, S.; MENGA, X.; XUA, Y. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Biology and Technology**. 2007. v.44, p 300–306

LOPES, C. A.; REIS, A. **Doenças do tomateiro cultivado em ambiente protegido**. Embrapa: Circular Técnicas. Dez. 2011. Disponível em <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/bbeletronica/2011/ct/ct_100.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2016

OLIVEIRA, E. N.; GUEDDARI, N. E. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; FRANCO, T.T. Growth rate Inhibition of Phytopathogenic Fungi by Characterized Chitosans. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 12, p. 800-809, 2012

PEDRO, R. O. ; TAKAKI, M. ; GORAYEB, T.C.C. ; THOMEIO, J.C. ; Del Bianchi, V. L.; TIERA, M. J. ; TIERA, V. A. O. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v.168, p. 50-55, 2013.

PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; PINHEIRO, J. B. **Manejo da pinta preta: uma ameaça às lavouras de tomateiro a céu aberto**. EMBRAPA: Comunicado Técnico, 2013. Disponível em: < [https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de-](https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de)

publicacoes/-/publicacao/960748/manejo-da-pinta-preta-uma-ameaca-as-lavouras-de-tomateiro-a-ceu-aberto>. Acesso em 17 out. 2016

PERES, F., MOREIRA, J.C., and DUBOIS, G.S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.

RAAFAT, D.; BARGEN, K. V.; HAAS, A.; SAHL, H. G. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3764–3773, 2008

REDDY, M.V.B.; ARUL, J.; BAR KA, E.; ANGERS, P.; RICHARD, C; CASTAIGNE, F. Effect of Chitosan on Growth and Toxin Production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p. 33-43, 2010

RODRIGUES, T. T.M.S.; MAFFIA, L. A.; DHINGRA, O. D.; MIZUBUTI E. S. G. *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 203-212, 2010

SANHUEZA, R. M. V. **Caracterização e controle das doenças de maçãs em pós-colheita**, Embrapa: Circular Técnicas. Dez. 2011. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/outros/relatoriofinal/Capitulo02.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2016

SOLIMAN, A. M.; FAHMY, S. R.; MOHAMED, W. A. Therapeutic efficacy of chitosan against invasive candidiasis in mice. **The Journal of Basic & Applied Zoology**. V. 72, p. 163–172, 2015

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

TÖFOLI, J.G.; DOMINGUES, R.J.; FERRARI, J.T.; *Alternaria* spp. em oleráceas: sintomas, etiologia, manejo e fungicidas, **Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.21-34, 2015

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

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

VIEGAS R. H. F., TAKAKI, M., PEDRO, R. O., GABRIEL, J. S., TIERA M. J., TIERA, V. A. O. Hydrophobic Effect of Amphiphilic Derivatives of Chitosan on the Antifungal Activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, **Molecules** , v.18, n.4, p. 4437-4450, 2013

XING, A. K.; SHENA, X.; ZHUA, X.; JUC, X.; MIAOA, X.; FENGA, J. T. Z.; PENG, X.; JIANGC, J. QIN. S. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosannanoparticles against plant pathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 830–836, 2016.

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Springer Verlag/INRA**, v.54, p. 569-588, 2014

YU, T.; LI, H. Y.; ZHENG, X. D. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.114, p. 261–266, 2007.

YOO, S. H., LEE, K. H., LEE, J. -S., CHA, J., ARK, C. S., LEE, H. G., Physicochemical Properties and Biological Activities of DEAE-Derivatized

Sphingomonas Gellan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6235 - 6239, 2005.