



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
QUITOSANA E DERIVADOS ASSOCIADOS COM CEFTAZIDIMA**

LUIZÂNGELA DA SILVA REIS

**TERESINA-PI
2017**

LUIZÂNGELA DA SILVA REIS

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
QUITOSANA E DERIVADOS ASSOCIADOS COM CEFTAZIDIMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal na Universidade Federal do Piauí em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

**TERESINA-PI
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial de Floriano

R347a Reis, Luizângela da Silva.

Avaliação das propriedades química e biológica da quitosana e derivados associados com ceftazidima. [Manuscrito] / Luizângela da Silva Reis, Floriano – PI, 2017.
94f.

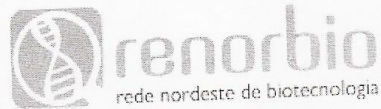
Cópia de computador (printout).

Tese (Doutorado) Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO. Universidade Federal do Piauí – UFPI, 2017.

“Orientação: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho”

1. Toxicidade. 2. Base de Schiff. 3. Atividade Antibacteriana. 4. Fármaco. I.Título.

CDD 662

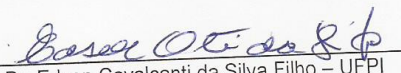


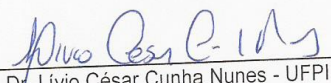
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
Campus Universitário "Ministro Petrônio Portella" – Bairro Socopo – Centro de Ciências Agrárias - CCA
Telefone: (86) 3217-3331 – e-mail: renorbio@ufpi.edu.br
CEP 64049-550 – Teresina-PI

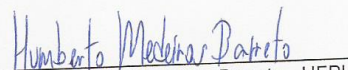
ATA DE DEFESA DE TESE

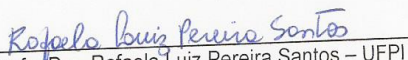
Ata de Defesa de Tese de Doutorado de Luizângela da Silva Reis. Ao oitavo dia do mês de março do ano de dois mil e dezessete, às quinze horas, reuniu-se, no Auditório do PPG em Ciências dos Materiais/UFPI, a Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado composta pelos Professores Edson Cavalcanti da Silva Filho – Universidade Federal do Piauí, Presidente; Lívio César Cunha Nunes – Universidade Federal do Piauí, Examinador; Humberto Medeiros Barreto – Universidade Federal do Piauí, Examinador e Cleide Maria da Silva Leite – UNILAB, Examinadora; perante a qual LUIZÂNGELA DA SILVA REIS, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Piauí, defendeu, para preenchimento do requisito de doutora, sua Tese intitulada "Avaliação das propriedades química e biológica da quitosana e derivados associados com ceftazidima." A defesa da referida tese ocorreu das 15:00 às 18:32 tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a doutoranda Aprovada (Aprovada / Reprovada), por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito satisfatório (Satisfatório / Insatisfatório).


Eu, Edson Cavalcanti da Silva Filho, que presidi a Banca de Defesa da Tese, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina-PI, 08 de março de 2017.

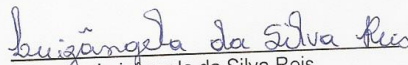

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho – UFPI
(Presidente)


Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI
(Examinador)


Prof. Dr. Humberto Medeiros Barreto - UFPI
(Examinador)


Profa. Dra. Rafaela Luiz Pereira Santos – UFPI
(Examinadora)


Profa. Dra. Cleide Maria da Silva Leite - UNILAB
(Examinadora)


Luizângela da Silva Reis

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dra. Nadir Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI**

Prof^ª. Dr^ª. Carla Eiras

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA RENORBIO-UFPI**

Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

*O meu passado é tudo quanto não consegui ser. Nem as sensações de momentos idos me são saudosas: o que se sente exige o momento; passado este, há um virar de página e a história continua, mas **não** o texto.*

Fernando Pessoa

Dedicatória

*Com todo meu amor, dedico esta tese a meu filho, **Antonio Victor**, a minha mãe **Zenaide Vieira** e ao meu pai **Antônio do Reis** (in memoriam) maiores orgulho e exemplo de vida.*

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a **Deus** que é meu guia e minha fonte de luz, me capacita e me dá forças em todos os momentos da minha vida e por me ajudar a vencer mais uma etapa na minha vida.*

*Ao meu filho **Antônio Victor** razão da minha vida e meu grande amor que carregarei eternamente no meu coração. Obrigada filho por compreender as inúmeras vezes que tive que me ausentar para desenvolver este trabalho.*

*Aos meus pais **Zenaide Vieira e Antônio do Reis** (in memoriam). Obrigada pelos ensinamentos, carinho, amor e por me apoiarem em todos os projetos de vida.*

*Ao Prof. Dr. **Edson Cavalcanti da Silva Filho** por toda a orientação, amizade e convivência em todas as etapas do trabalho.*

*Ao Prof. Dr. **Humberto Medeiros Barreto** pela colaboração e por me ensinar a não medir esforços quando precisamos de seu apoio e orientação.*

*Ao meu irmão **Fernando** por estar ao meu lado em todos os momentos.*

*Ao professor Dr. **Mauro Sérgio Cruz Souza Lima** pelo seu apoio e incentivo.*

*À minhas amigas irmãs **Janete Martins, Diane Carolina (Didi) e Gilmaria (Tia Gil)** por me apoiarem e sempre manter a fé e acreditar que mesmo nos momentos mais difíceis o impossível se torna possível, e ainda mais, eu posso ser capaz de realizá-lo.*

*À Professora Dr^a. **Andréia Bagliotti Meneguim** e sua equipe, pela ajuda nos testes de citotoxicidade e RMN ¹³C pela utilização do Laboratório de Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) - UNIARA, Araraquara – SP.*

*Ao meu querido afilhado e sobrinho **Guilherme** pelo seu carinho e amizade para com a madrinha.*

*A minha tia “mãe” **Zuzu** pelas oportunidades concedidas, pelo seu amor, carinho e dedicação na minha caminhada.*

*A minha querida colega e amiga **Maura Célia** que sempre incentivou e animou nos momentos difíceis, principalmente nos momentos em que me desesperava quando meus resultados davam errados, lá estava ela me apoiando.*

*Ao meu ilustríssimo e querido **Idglan** que sempre esteve comigo no desenvolvimento de meus testes biológicos desde o mestrado, o meu muito obrigada.*

*A minha querida amiga **Carlene** pela sua contribuição na correção deste trabalho.*

*Aos meus amigos de trabalho em particular **Adriene e Antônio Wuiston** por trabalharmos nos mesmos horários, pela amizade e apoio nos momentos que tive que me ausentar se mostrando sempre disponível a me ajudar, e aos demais colegas **Nelson Moisés, Yanez André, Cibele Fernades, Diogo Bruno, Samira Maciel, Leane Brunelle, Leudimar Aires**. Sem esquecer também da amiga galega querida **Adalgisa Melo, Clésia Barbosa, Mercya Priscila, Mariana (Mary), Thaís (Tata)** e os demais colegas e professores que fazem parte da família CAFS-UFPI.*

Os agradecimentos podem ser extensos, mas nunca serão suficientes para expressar toda a minha gratidão a todos àqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos vocês, meu agradecimento eterno.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusion

C_0 – Concentração inicial da solução do fármaco em mg L^{-1}

C_f – Concentração final da solução do fármaco em mg L^{-1}

CFZ- Ceftazidima

DMEM Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DO- Densidade Óptica

DRX- Difração de raio X

DTG - Análise Térmica Diferencial

EC- *Escherichia coli*

EI- Efeito Inibitório

FTIR- Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GS- Grau de Substituição

GM07492A (Fibroblasto Humano)

LogP- Coeficiente de Partição

m – Massa

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

MIC- Concentração Inibitória Mínima

MTT- Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

P_m = Perda de Massa

q – Capacidade de adsorção do adsorvente em mg g^{-1}

Q- Quitosana

Q_{ac} - Quitosana modificada com acetilacetona

Q_{acen} - Quitosana modificada com acetilacetona posterior reação com etilenodiamina

Q_{acdien} - Quitosana modificada com acetilacetona posterior reação com dietilenotriamina

Q_{CFZ} - Quitosana com ceftazidima

Q_{acCFZ} - Quitosana modificada com acetilacetona associada com ceftazidima

$Q_{acenCFZ}$ - Quitosana modificada com acetilacetona posterior reação com etilenodiamina associada com ceftazidima

$Q_{\text{acdienCFZ}}$ - Quitosana modificada com acetilacetona posterior reação com dietilenotriamina associada com ceftazidima

RMN ^{13}C - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido

SA- *Staphylococcus aureus*

SBF- Soro fetal bovino

SHV- Família Sulfidril Variável

TG – Termogravimetria

$T_{\text{máx}}$ = Temperatura Máxima

UV/Vis – Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta/visível

V – Volume da solução do fármaco em L

ΔT = Intervalos de Temperatura

λ – Comprimento de onda

$\mu\text{g mL}^{-1}$ -Micrograma por mililitro

mg g^{-1} - Miligrama por grama

$\mu\text{g mg}^{-1}$ -Micrograma por miligrama

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados Q_{acn} e Q_{acdien} , razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos e grau de substituição (GS)43
- Tabela 2.** Valores das intensidades relativas às regiões cristalinas (I_C) e amorfas (I_A) e do índice de cristalinidade (I_{CR}) da quitosana e derivados.....49
- Tabela 3.** Valores das intensidades relativas às regiões cristalinas (I_C) e amorfas (I_A) e do índice de cristalinidade ($\%I_{CR}$) da quitosana, derivados e dos materiais associados com fármaco.....54
- Tabela 4.** Dados de intervalos de temperatura (ΔT), perda de massa (P_m) e temperatura máxima ($T_{Máx}$) de decomposição da quitosana e derivados.....65
- Tabela 5.** Dados de intervalos de temperatura (ΔT), perda de massa (P_m) e temperatura máxima ($T_{Máx}$) de decomposição da quitosana e derivados associados com fármaco.....68
- Tabela 6.** Coeficiente de partição (LogP) da quitosana e dos derivados Q_{ac} , Q_{acn} e Q_{acdien}76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da quitosana.....	25
Figura 2. Reação de desacetilação alcalina da quitina.....	26
Figura 3. Estrutura da parede celular das bactérias Gram-Negativa e Gram-Positiva.....	33
Figura 4. Estrutura química da Cefotaxima.....	35
Figura 5. Fluxograma do processo de modificação química da quitosana.....	37
Figura 6. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana com acetilacetona e posterior reação com etilenodiamina.....	44
Figura 7. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana com acetilacetona e posterior reação com dietilenotriamina	44
Figura 8. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido de Q, Q _{ac} , Q _{acen} , Q _{acdien}	45
Figura 9. Difração de Raio X da quitosana (Q) e derivados Q _{ac} , Q _{acen} e Q _{acdien}	47
Figura 10. Difração de Raio X da quitosana (Q) e da quitosana associado com fármaco (Q _{CFZ}).....	50
Figura 11. Difração de Raio X dos derivados Q _{ac} e Q _{acCFZ}	51
Figura 12. Difração de Raio X dos derivados Q _{acen} e Q _{acenCFZ}	52
Figura 13. Difração de Raio X do derivado Q _{acdien} e Q _{acdienCFZ}	53
Figura 14. Espectro de FTIR da quitosana (Q).....	55
Figura 15. Espectros de FTIR da quitosana e do derivado Q _{ac}	56
Figura 16. Espectros de FTIR dos derivados Q _{ac} , Q _{acen} , Q _{acdien}	57
Figura 17. Espectro na região de infravermelho de ceftazidima em pó para solução injetável em pastilha de brometo de potássio.....	58
Figura 18. Espectros de FTIR da quitosana (Q) e da quitosana associada com fármaco (Q _{CFZ}).....	59
Figura 19. Espectros de FTIR do derivado Q _{ac} e do derivado associado com fármaco (Q _{acCFZ}).....	60
Figura 20. Espectros FTIR do derivado Q _{acen} e do derivado associado com fármaco (Q _{acenCFZ}).....	61
Figura 21. Espectros FTIR do derivado Q _{acdien} e do derivado associado com fármaco (Q _{acdienCFZ}).....	62

Figura 22. Curvas termogravimétricas da quitosana (Q) e dos derivados Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien}	63
Figura 23. Derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) da quitosana (Q) e os derivados Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien}	64
Figura 24. Curvas TG da ceftazidima (CFZ), Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$	66
Figura 25. Derivadas das curvas Termogravimétricas (DTG) do fármaco (CFZ), Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$	67
Figura 26. Curvas da libertação <i>in vitro</i> da ceftazidima, a partir de quitosana e derivados de quitosana associados com fármaco, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 1,2).....	69
Figura 27. Curvas da libertação <i>in vitro</i> da ceftazidima, a partir de quitosana e derivados de quitosana associados com fármaco, num meio de libertação de solução salina tampão fosfato (pH= 7,4).....	71
Figura 28. Capacidade máxima de adsorção da quitosana e dos derivados de quitosana em diferentes concentrações do fármaco.....	72
Figura 29. Efeito das amostras de quitosana (Q), Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} sobre a viabilidade de GM07492A (fibroblastos humanos), após 24 h pelo ensaio de redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	73
Figura 30. Efeito inibitório da quitosana (Q) e derivados modificados com acetilacetona (Q_{ac}), etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) contra <i>Staphylococcus aureus</i> após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 μ g/mL, pH 2,3).....	75
Figura 31. Efeito inibitório da quitosana (Q) e derivados modificados com acetilacetona (Q_{ac}), etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) contra <i>Escherichia coli</i> após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 μ g/mL, 48 h, pH = 2,3).....	77
Figura 32. Efeito inibitório da ceftazidima (CFZ), quitosana (Q) e dos derivados associados com fármaco Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ contra <i>Staphylococcus aureus</i> após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 μ g/mL, pH = 2,3).....	78
Figura 33 Efeito inibitório da ceftazidima (CFZ), quitosana (Q) e dos derivados associados com fármaco Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ contra <i>Escherichia coli</i> após (a) 48	

h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 µg/mL, pH =2,3).....79

REIS, Luizângela da Silva. **Avaliação das propriedades química e biológica da quitosana e derivados associados com ceftazidima**, 2017. 94p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

RESUMO

A elevada prevalência de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos tem estimulado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Materiais poliméricos vêm despertando o interesse de muitos pesquisadores devido ao seu grande campo de aplicações. A quitosana é um polímero natural obtido a partir da reação de desacetilação da quitina. Por apresentar propriedades específicas vêm se manifestando como uma nova classe de materiais com funções fisiológicas altamente aprimoradas. Modificações na cadeia da quitosana são feitas a fim de melhorar ou conferir novas propriedades para quitosana. Este trabalho teve por objetivo a obtenção de derivados de quitosana com base de Schiff, bem como avaliar a atividade antibacteriana da quitosana dos derivados associados com ceftazidima. A identidade da base de Schiff formada e os derivados associados com fármaco foram caracterizados através de Análise Elementar, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C), Difração de raios (DRX) e Análise Térmica (TG). Os resultados das caracterizações mostraram a eficácia das modificações e das interações entre a quitosana e derivados com ceftazidima (CFZ), e que os grupos incorporados na estrutura dos derivados melhoraram a estabilidade térmica dos materiais, bem como os dados da cristalinidade dos mesmos uma vez que estes dados estão associados aos resultados do RMN ^{13}C . A modificação da quitosana (Q) com acetilacetona (Q_{ac}) apresentou um menor efeito inibitório para *S. aureus* (33,3% e 51,8%) quando comparada com Q (58,2% e 80,8%) e um aumento contra cepa de *E.coli* (68,0% e 91,2%) para Q_{ac} em relação a Q (52,3% e 81,5%) após 48 e 72h de preparo da solução. Modificações subsequentes da Q_{ac} com etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) aumentaram o efeito inibitório da Q_{acen} (90,9% e 90,4%) e Q_{acdien} (91,1% e 92,0%) quando comparadas com Q_{ac} (33,3% e 68,0%) contra cepas de *S. aureus* e *E. Coli* respectivamente, indicando um amplo espectro de ação destes novos materiais inibindo tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Os materiais associados com fármaco mostraram que um maior tempo de contato dos materiais em solução potencializaram a ação bacteriana dos mesmos, quando comparados com o fármaco sozinho. As modificações feitas nos materiais mostraram que os mesmos não apresentaram toxicidade para as células testadas. Os resultados podem revelar-se como uma promissora alternativa do uso dos derivados de quitosana com base de Schiff e dele associado com fármaco sugerindo que os mesmos poderiam ter uma ampla aplicabilidade no desenvolvimento de novos materiais visando o controle de microrganismos.

Palavras-chave: toxicidade, base de Schiff, atividade antibacteriana, fármacos.

REIS, Luizângela da Silva. **Evaluation of the chemical and biological properties of quitosana and derivatives associated with ceftazidima**, 2017. 94p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

ABSTRACT

The high prevalence of infections caused by bacteria resistant to antibiotics has stimulated the development of new therapeutic strategies. Polymeric materials have aroused the interest of many researchers because of their large field of applications. Chitosan is a natural polymer obtained from the deacetylation reaction of chitin. By presenting specific properties have been manifesting as a new class of materials with highly improved physiological functions. Modifications in the chitosan chain are made in order to improve or confer new properties for chitosan. The aim of this work was to obtain Schiff - based chitosan derivatives, as well as to evaluate the antibacterial activity of chitosan of the derivatives associated with ceftazidime. The identity of the Schiff base formed and the derivatives associated with the drug were characterized by Elemental Analysis, infrared spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance of Carbon 13 (NMR ^{13}C), X-ray Diffraction (XRD) and Thermal Analysis (TG). The results of the characterizations showed the effectiveness of the modifications and interactions between chitosan and derivatives with ceftazidime (CFZ), and that the groups incorporated in the structure of the derivatives improved the thermal stability of the materials as well as the crystallinity data of the same ones since These data are associated with ^{13}C NMR results. Chitosan (Q) modification with acetylacetone (Q_{ac}) had a lower inhibitory effect for *S. aureus* (33,3% and 51,8%) when compared to Q (58,2% and 80,8%) and an increase against *E. coli* strain (68,0% and 91,2%) for Q_{ac} relative to Q (52,3% and 81,5%) after 48 and 72 hours of preparation of the solution. Subsequent modifications of Q_{ac} with ethylenediamine (Q_{acen}) and diethylenetriamine (Q_{acdien}) increased the inhibitory effect of Q_{acen} (90,9% and 90,4%) and Q_{acdien} (91,1% and 92,0%) when compared to Q_{ac} (33, 3% and 68,0%) against strains of *S. aureus* and *E. coli* respectively, indicating a broad spectrum of action of these new materials inhibiting both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The materials associated with drug showed that a greater contact time of the materials in solution potentiated the bacterial action of the same, when compared with the drug alone. Modifications made to the materials showed that they did not show toxicity to the cells tested. The results may prove to be a promising alternative to the use of Schiff-based chitosan derivatives and associated therewith suggesting that they could have broad applicability in the development of novel materials for the control of microorganisms.

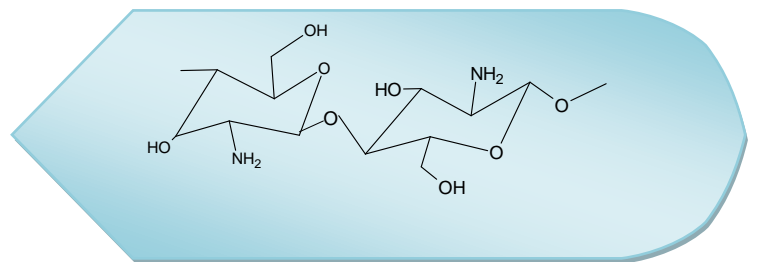
Keywords: toxicity, Schiff's base, antibacterial activity, drugs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 GERAL	24
2.2 ESPECÍFICOS.....	24
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	25
3.1 Quitosana e derivados.....	25
3.2 Atividade Antibacteriana.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Materiais e reagentes.....	37
4.2 Modificações química da quitosana.....	37
4.2.1 Modificação química com acetilacetona e aminas.....	37
4.3 Método de obtenção dos materiais Q _{CFZ} , Q _{acCFZ} , Q _{acenCFZ} e Q _{acdienCFZ}	38
4.4 Caracterização dos materiais.....	38
4.4.1 Análise Elementar.....	38
4.4.2 Ressonância Magnética de Carbono 13 (RMN ¹³ C).....	38
4.4.3 Difração de Raio X.....	39
4.4.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	39
4.4.5 Análise Térmica	39
4.5 Avaliação da Citotoxicidade.....	39
4.6 Avaliação da Atividade Antibacteriana	40
4.6.1 Cepas Bacterianas.....	40
4.6.2 Preparo do Inóculo.....	40
4.6.3 Teste de Contato Direto.....	40
4.7 Estudo de liberação “ <i>in vitro</i> ” da quitosana e derivados associados com fármaco.....	41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Análise Elementar.....	43
5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13.....	45
5.3 Difração de Raio X.....	47
5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	54
5.5 Análise Termogravimétrica.....	62
5.6 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da ceftazidima.....	69
5.7 Capacidade máxima de adsorção da quitosana e derivados.....	72
5.8 Estudo da citotoxicidade da quitosana e derivados.....	73
5.9 Avaliação da Atividade Antibacteriana.....	74
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS.....	83

Introdução



1.INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos são os fármacos de uso predominante nas redes hospitalares, gerando gastos significativos para o sistema de saúde. No entanto, o uso extensivo dos antibióticos e as estratégias evolutivas das bactérias resultaram no surgimento de cepas resistentes e na baixa eficácia de agentes antibacterianos convencionais (LUO et al., 2012). Por este motivo, o uso indiscriminado de antibióticos tem merecido a atenção da Organização Mundial de Saúde (OMS), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dos profissionais de saúde (OLIVEIRA; MUNARETTO, 2010; KADOSAKI et al., 2012). Além disto, muitos pesquisadores estão em busca de novos materiais com atividade antibacteriana intrínseca e /ou que sejam capazes de melhorar a eficácia dos antibióticos de uso convencional.

Nos últimos anos, a quitosana tem sido alvo de muitos estudos e vem recebendo considerável atenção, pois as suas propriedades conferem a ela um amplo espectro de aplicações devido à sua atividade biológica inconstante, excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, de fonte renovável e não tóxica (GOY et al., 2016; LUO et al., 2012; VINSOVA et al., 2008).

Quitina e quitosana são polissacarídeos constituídos pelas unidades monoméricas de β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose e β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, respectivamente (ARANAZ et al., 2010). A quitosana é um produto obtido através da remoção dos grupos acetila a partir da quitina por meio do processo de desacetilação (ANUSHA et al., 2016). É um dos polímeros catiônicos mais estudados como agente antimicrobiano. Possui atividade antimicrobiana inerente contra muitas bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e fungos (SAMALA et al., 2015; VINSOVA et al., 2008).

Diferenças na distribuição dos grupamentos acetil, no grau de desacetilação, na viscosidade, na massa molecular ou grau de polimerização ocorrem devido às variações que ocorrem durante o processo de desacetilação (ERDEM et al., 2016). Estas diferenças influenciam na solubidade, atividade antimicrobiana e em outras propriedades da quitosana (REGE et al., 2003).

A presença de grupos amínicos primários e hidroxilas reativas na estrutura da quitosana oferecem maiores possibilidades de modificações químicas, tais como quaternização, acilação, tosilação, formação de base de Schiff, O-carboximetilação e N-carboxialquilação (HE et al., 2017; GOLYSHEV et al., 2015; MOHAMED et al., 2013;

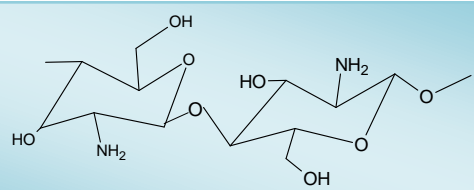
VINSOVA et al., 2011; SAJOMSANG et al., 2009). Essas modificações são apropriadas e podem melhorar a sua solubilidade em uma ampla faixa de pH (VINSOVA et al., 2011) uma vez que em seu estado natural a quitosana é insolúvel em meio neutro e em condições alcalinas, sendo solúvel em ácidos orgânicos diluídos como ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico, entre outros (KONG et al., 2011; RINAUDO, 2006).

As bases de Schiff apresentam uma estratégia eficaz de proteção dos grupos aminos no carbono C-2 da quitosana e quando formada entre os grupos amina e grupos aldeídos aumentam a estabilidade do biopolímero. A extensão da formação de bases de Schiff é conhecida como grau de substituição e indica o número de grupos amino livres em relação à base de Schiff sobre a matriz polimérica substituída. Este parâmetro desempenha um importante papel nas aplicações das bases de Schiff (SASHIKALA; SHAFI, 2014; RORRER et al., 1993).

Em virtude de suas propriedades promissoras, a quitosana e seus derivados vêm sendo usados em grande variedade de aplicações, tais como, aditivos para cosméticos, campos de bioengenharia e farmacêuticas (ZAKHEM et al., 2014; SUPPER et al., 2014; MAHMOUDZADEH et al., 2013; FRANCO et al., 2011), remoção de metais (LUCENA et al., 2015), filmes biodegradáveis, dispositivos biomédicos e implantes de microcápsulas para a liberação controlada de fármacos (WU et al., 2014).

O aumento da taxa de mortalidade associada às doenças infecciosas está diretamente relacionado às bactérias que apresentam múltiplas resistências a antibióticos. A falta de tratamentos eficazes é hoje um dos maiores problemas (SILVA et al., 2011). A busca pelo desenvolvimento de novos agentes antibacterianos com maiores efeitos de ação e com novos mecanismos é definitivamente uma necessidade médica urgente. O uso e as combinações de antibióticos com quitosana e seus derivados como agentes antimicrobianos vêm sendo alvo de pesquisa nos últimos anos (YALINCA et al., 2013).

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar e modificar a quitosana quimicamente com acetilacetona e com aminas (etilenodiamina e dietilenotriamina) e investigar a atividade antibacteriana da quitosana e derivados associadas com ceftazidima para potencial aplicação farmacêutica.

2.2 ESPECÍFICOS

- Modificar a quitosana com acetilacetona e em seguida com aminas (etilenodiamina e dietilenotriamina) na ausência de solvente.
- Caracterizar os produtos obtidos por diversas técnicas, tais como: FTIR, DRX, Análise Elementar, TG/DTG e RMN ¹³C.
- Realizar ensaios de citotoxicidade da quitosana e dos derivados de quitosana
- Estudar a incorporação e liberação do fármaco ceftazidima na quitosana e em seus derivados quimicamente modificados.
- Avaliar o potencial antibacteriano destes derivados isoladamente e em associação com ceftazidima contra cepas Gram-Positiva e Gram-Negativa.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

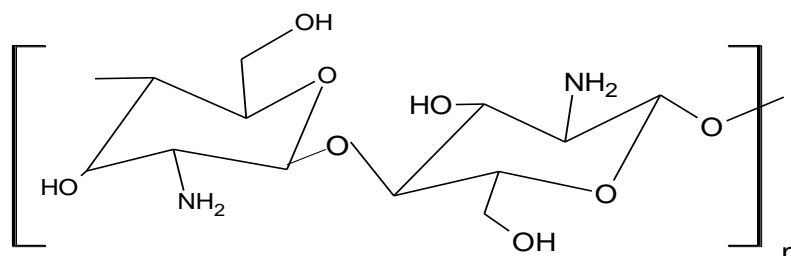
Nos últimos anos, o uso extensivo de antibióticos e as estratégias de resistência evolutivas de bactérias resultaram no surgimento de bactérias resistentes a medicamentos e à baixa eficácia dos agentes antibacterianos convencionais (BASSETTI et al., 2013; LUO et al., 2012; ODONKTOR; ADDO, 2011). De acordo com Guimarães et al. (2010), os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos, tais como bactérias, protozoários, vírus ou fungos inibindo o seu crescimento ou causando a sua morte. Podem ser classificados como microbicidas quando causam a morte do microrganismo ou bacteriostáticos quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARAES et al., 2010). A eficácia de muitos antibióticos para o tratamento de infecções tem se tornado bastante restrito devido ao aumento na prevalência de cepas resistentes aos antimicrobianos (MARTINS et al., 2015; GOLL; FARIA, 2013; GOULD, 2008).

O desenvolvimento de novos materiais com atividade antimicrobiana parece ser altamente relevante quando relacionados com cuidados de saúde. A quitosana vem despertando grande interesse de pesquisadores e cientistas como materiais poliméricos com funções interativas (GOY et al., 2016; HU et al., 2013).

3.1 QUITOSANA E DERIVADOS

A quitosana é um copolímero constituído de ligações β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e β -(1-4)-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1. Estrutura química da quitosana

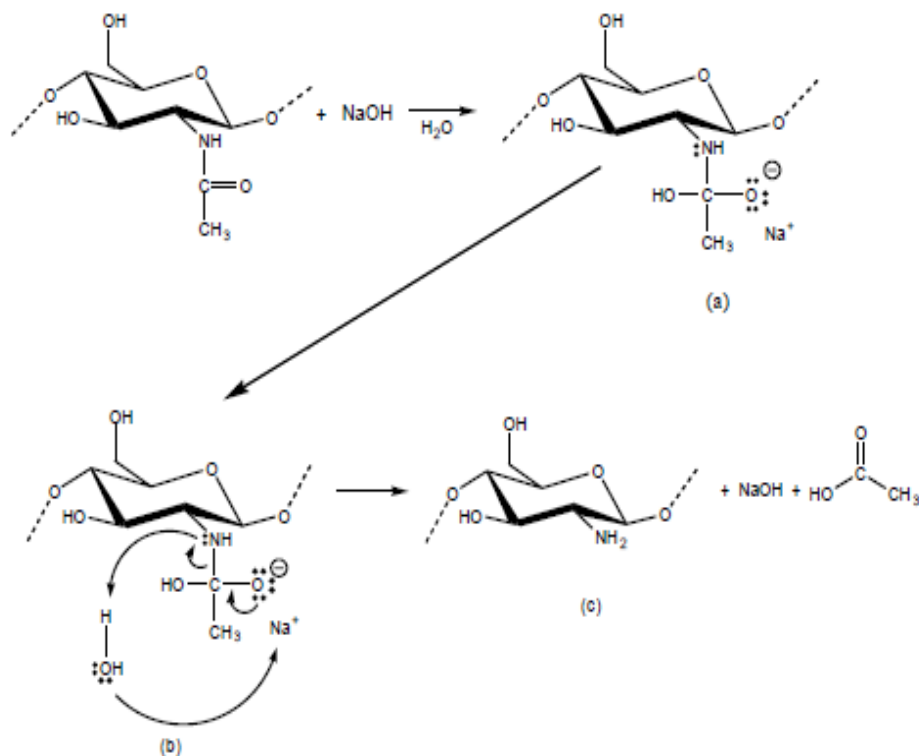


Quitosana

Fonte: autoria própria (2017).

A quitosana é obtida através da reação de desacetilação alcalina da quitina, como podemos observar na Figura 2.

Figura 2- Reação de desacetilação alcalina da quitina.



Fonte: Henning, 2009.

A quitina é o principal componente estrutural presente no exoesqueleto de insetos, moluscos crustáceos e parede celular de fungos, podendo atuar como reforço, resistência e defesa nos organismos em que ocorrem (SINGH, 2011; CAMPANA-FILHO et al., 2007). As carapaças de caranguejo e cascas de camarão são as principais matérias-primas para produção industrial de quitina, que são fornecidos em abundância como resíduos da indústria pesqueira voltada para exploração industrial de frutos do mar (JAYAKUMAR et al., 2010).

A quitosana apresenta amplas possibilidades de aplicação por sua solubilidade em meios ácidos tais como, ácido acético, ácido lático, ácido fórmico entre outros, geralmente variando entre pH 2 a 6,5 devido aos grupos amino livres (NH₂) da quitosana serem bases fracas, sendo predominantemente protonadas em formas

catiônicas (NH_3^+) quando o pH é menor que 6,5, porém quando o grupo amino primário é protonado em baixo pH, torna-se um polieletrólito catiônico hidrossolúvel.

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade dos grupos amino maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (ANITHA et al., 2009; FERNANDES, 2010).

Por outro lado, a solubilidade da quitosana é também dependente do grau de desacetilação, sendo que quitosana com baixo grau de desacetilação pode aumentar a sua viscosidade e solubilidade. Além do grau de desacetilação, o peso molecular é outro fator muito importante que afeta significativamente a solubilidade e outras propriedades da quitosana (PARK et al., 2010; RINAUDO, 2006).

Devido a sua grande importância econômica e ambiental, a quitosana vem sendo extensivamente estudada em diversas aplicações industriais e tecnológicas, tais como liberação de drogas, nanofilmes, membranas e produtos químicos agrícolas, purificação de água, processamento de alimentos, quelação de íons metálicos, produtos cosméticos e farmacêuticos (LIU et al., 2012; BEKHEIT et al., 2011; DASH et al., 2011; UYGUN et al., 2011; LUO et al., 2010; KUMAR, 2000).

Dentre as inúmeras propriedades da quitosana destacam-se seus efeitos anticoagulante, analgésico, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, quelante, cicatrizante, atividades antioxidantes, antimicrobiana e antitumoral (MOURYA et al., 2010; SEVERINO et al., 2007; SILVA et al., 2006).

A aplicação da quitosana em seu estado natural é um pouco limitado devido à sua elevada massa molecular e natureza altamente viscosa, dificultando a sua solubilidade em meio aquoso. Nos últimos anos, vários estudos sobre modificações químicas na estrutura da quitosana têm sido intensificados com a finalidade de melhorar a sua aplicabilidade (KONG et al., 2010).

Modificações químicas na estrutura da quitosana são apropriadas para melhorar a sua solubilidade em uma ampla faixa de pH (VINSOVA; VAVRÍKOVA, 2011). Devido à facilidade de modificação física, o uso da quitosana é ampliada, podendo ser preparada em diferentes formas tais como membranas, esponjas, flocos, pó, filmes, nanopartículas, microesferas, fibras e etc. Tais modificações têm como finalidade torná-la mais efetiva em processos de adsorção como pode ser citada a reação de

desacetilação da quitina que fornece um grupo amino na quitosana que possui capacidade de adsorção bastante superior à quitina (MACHADO et al., 2009).

Os grupos amina e hidroxilas presentes na estrutura da quitosana por terem a capacidade de doar pares de elétrons livres, fazem com que a mesma seja solúvel em soluções ácidas diluídas, apresentando dessa forma uma oportunidade considerável de modificações químicas (GUIBAL, 2004).

Muitos derivados de quitosana são obtidos por modificações através das hidroxilas (OH) e grupo amino (NH₂) reativo (LI et al., 2015). O grupamento amina, em particular, apresenta propriedade nucleofílica que permite rápida formação de ligações iminas (C=N) por reações com aldeídos ou derivados de acilação de amida. (CHOI et al., 2016; LI et al., 2011).

Modificação das cadeias de quitosana (que é hidrofílica) com compostos hidrofóbicos pode resultar em produtos com um comportamento anfifílico. Os derivados de quitosana anfifílicos são capazes de auto montar e formar nanopartículas (micelas) sob condições adequadas (EL-FRAY et al., 2012; MUZZARELLI et al., 2005).

Existem inúmeras possibilidades de modificações química na estrutura da quitosana e podem ocorrer por diversas reações tais com: reações de N-acilação, N-alquilação, N-carboxilação, O-carboximetilação (MOHAMED, et al., 2013; UPADHYAYA et al., 2013; YIN et al., 2012; JAYAKUMAR et al., 2010), N-sulfonação, formação de base de Schiff com cetonas e aldeídos (AHMED et al., 2015), N-ftaloilação (KYZAS et al., 2015) e N-tosilação (KURITA, 2006). A formação de base de Schiff e N-acilação são as mais importantes não só por apresentarem uma variedade de aplicações, como também melhorar as suas propriedades físico-químicas (MARTINS et al., 2013; MARTINS et al., 2011; VINSOVA; VAVRÍKOVA, 2011).

Entre os biopolímeros substituídos mais notáveis estão às bases de Schiff que contêm um grupo imina e geralmente são formadas a partir da condensação de grupos amino livres na quitosana com o aldeído ou cetona. As bases de Schiff vêm despertando muita atenção por parte dos pesquisadores por apresentar uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antifúngicas, antibacterianas, antimaláricas, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiviral e antipiréticas (GAVALYAN, 2016; KUMAR; RAVIKANT, 2014; SASHIKALA; SHAFI, 2014).

Os grupos iminas (-C=N-) formados aumentam a atividade fisiológica das bases de Schiff de quitosana e são importantes não apenas em virtudes de suas propriedades químicas e físicas, como também pela sua diversidade de aplicações, de modo que eles podem atuar como agentes antimicrobianos (SOLIMAN et al., 2013), antitumoral, antiviral (PARK et al., 2011), agentes anticorrosiva (MOHAMED; FEKRY, 2011), antiproliferativa e anti-inflamatória (GAVALYAN, 2016; JIAO et al., 2011; SASHIWA; AIBA, 2004), e como quelantes de metais (JIAO et al., 2011; GUO et al., 2007; SANTOS et al., 2005).

Alguns autores relatam que a atividade antibacteriana de derivados de quitosana com bases de Schiff são maiores do que a da quitosana não modificada, fato este que pode ser corroborado com alguns artigos analisados a seguir.

SAJOMSANG et al (2009) sintetizaram derivados de N-aryl quitosana com bases de Schiff contendo grupos doadores ou aceptores de elétrons em vários níveis de extensão de N-substituição. Estudos antibacterianos da Concentração Inibitória Mínima destes materiais foram realizados contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com a finalidade de explorar o impacto da extensão da N-substituição na sua atividade biológica. Os derivados quaternários de N-aryl de quitosana mostraram valores de Concentração Inibitória Mínima muito baixos variando entre (8-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente, quando a extensão da N-substituição foi menor que 20%. Com relação aos substituintes no anel aromático tanto os doadores quanto os receptores de elétrons não afetaram significativamente a atividade antibacteriana de ambas as bactérias.

FU et al (2011) relatou em sua pesquisa que derivados de quitosana solúveis em água contendo grupos funcionais duplos foram sintetizados com cloreto de 2,3-epoxipropiltrimetilamônio através da formação de redução de base de Schiff, N-metilação e O-quaternização usando benzaldeído como agente modificador. E avaliou a atividade antibacteriana dos tecidos têxteis contra as cepas de *S. aureus* e *E.coli*. Os resultados mostraram que todos os tecidos tratados apresentaram boa atividade antibacteriana de acordo com as condições ótimas de acabamento. Os tecidos de algodão tratados com derivados de quitosana apresentaram melhor atividade antibacteriana e boa resistência à lavagem contra *E. coli* (96%) e *S. aureus* (99%). A eficiência antibacteriana do derivado de quitosana com base de Schiff (N-benzilideno quitosana) apresentou-se com mais de 75% de efeito inibitório após 20 lavagens

consecutivas. Os resultados mostraram que a durabilidade da lavagem era boa e suficiente e que uma melhor atividade antibacteriana pode ser obtida em tecidos tratados com o derivado de quitosana com base de Schiff (N-benzilquitosana).

KUMAR et al (2012) em seus estudos apresentaram géis de derivados de quitosana-cromona obtidos pela reação da quitosana com cromona-3-carbaldeído, seguido pela troca de solvente, filtração e secagem por evaporação. A formação de base de Schiff (ligação imina) foi confirmada por FTIR, UV-Vis e por DRX. Os resultados da atividade antibacteriana demonstraram que o derivado de quitosana-cromona foi eficiente contra cepa de *Escherichia coli*. Os ensaios para a proliferação e viabilidade celular mostraram que o derivado não apresenta citotoxicidade. Dessa forma, os géis dos derivados de quitosana-cromona podem ser bons candidatos para aplicações práticas na área da biomedicina, engenharia de tecidos e biossensores.

MOHAMED et al (2013) mostraram em seus estudos que derivados de quitosana quaternizados com formação de base Schiff foram formados pela reação entre os grupos amino da quitosana e vários aldeídos aromáticos substituídos sob condições ácidas, seguido por redução da base de Schiff usando o cianoborohidreto de sódio como intermediários. Todos os derivados foram caracterizados por FTIR, RMN H^1 e MEV. Atividade antimicrobiana dos derivados foi testada contra cepas Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae* (RCMB 010010) e *Bacillus subtilis* (RCMB 010067) Gram-negativa *Escherichia coli* (RCMB 010052) e fungos *Aspergillus fumigatus* (RCMB 02568), *Geotricum candidum* (RCMB 05097) e *Candida albicans* (RCMB 05031) pelo método de disco de difusão. Comparados com a quitosana, todos os derivados quaternizados N-substituídos apresentaram uma melhor atividade antimicrobiana. A maioria destes derivados apresentaram uma atividade antimicrobiana mais eficaz com valores de MIC variando $6,25-300,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ como agentes antibacterianos, e com $3,25-125 \mu\text{g mL}^{-1}$ como agentes antifúngicos. Alguns destes derivados exibiram atividade antimicrobiana contra algumas cepas testadas quase equivalentes às drogas padrão gentamicina, ampicilina e anfotericina B. O derivado N-(3-bromobenzil) carboximetil quitosana(Q3Br-BzCMCh) apresentou uma atividade antimicrobiana apreciável e pode ser visto como um grande potencial para a síntese de novos materiais com melhor atividade antimicrobiana.

SALAMA et al (2015) realizaram em seus estudos a síntese de base de Schiff de quitosana com unidades aril pirazole. A quitosana e os derivados de quitosana com

bases de schiff apresentaram uma melhor atividade antibacteriana contra *E. coli* do que a de *B. subtilis* e *S.pneumonia*. O efeito inibidor do crescimento dos derivados de quitosana com bases de Schiff contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas examinado aumentou na seguinte ordem dos grupos substituintes no anel aril pirazole: Ch-H > Ch-NO₂ ≈ Ch-CH₃ > Ch-OCH₃ ≈ Ch-Cl. Entre os derivados, Ch-H mostra uma melhor capacidade para suprimir o crescimento de bactérias com menor valor MIC (3,9 µg mL⁻¹). Os resultados indicaram que as bases de Schiff de quitosana exibiram uma melhor atividade antimicrobiana do que a quitosana. A base de Schiff de quitosana com porção aril pirazole não substituído foi a mais ativa contra todos os microrganismos examinados.

3.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana de quitina, quitosana e seus derivados contra diferentes grupos de microrganismos, tais como bactérias e fungos, tem recebido atenção considerável nos últimos anos (BENHABILES et al., 2012). Devido à sua disponibilidade abundante na natureza e à presença de grupos amino primários a quitosana vem sendo recentemente utilizada em conjugados polímero-fármaco. A atividade antimicrobiana é uma das características atraentes da quitosana e varia de acordo com as suas propriedades físicas químicas tais como, grau de desacetilação, massa molecular, tipos de microrganismos e viscosidade (ZOU et al., 2016; GOY et al., 2016; QIN et al., 2006).

A quitosana tem sido utilizada para reduzir ou eliminar o crescimento de diferentes tipos de microrganismos. A eficácia antimicrobiana de formulações de quitosana utilizada em uma grande variedade de aplicações geralmente é bem documentada, no entanto, o exato mecanismo de ação ainda não foi bem definido, o que há é muita especulação quanto aos mecanismos subjacentes à atividade antimicrobiana da quitosana, resultando em uma maior consciência das potencialidades e valor industrial deste biopolímero.

O exato mecanismo de ação da quitosana e de seus derivados sobre os microrganismos ainda é bastante controverso, e várias propostas têm sido sugeridas com base na interação de seus grupos iônicos com a membrana celular, causando seu rompimento ou a inibição do mRNA e da síntese protéica via penetração da quitosana

no núcleo celular alterando a permeabilidade da célula e provocando a liberação de componentes intracelulares causando a morte da célula ou ainda com a formação de uma barreira externa, quelatando metais e podendo suprimir a absorção de nutrientes essenciais às células e à produção de toxinas (GOY et al., 2016; MENG et al., 2012; TRIPATHI et al., 2008; RABEA et al., 2003).

Admite-se que o modo de ação dos agentes antibacterianos catiônicos ocorra através de interações e rompimento do envelope celular. Supõe-se geralmente que a natureza poliacetônica da quitosana transmitida pelos grupos $-NH_3^+$ de glucosamina carregado positivamente possa ser um fator fundamental para a sua interação com componentes de carga negativa na superfície celular de muitos fungos e bactérias, causando alterações extensas na superfície das células, bem como o vazamento de substâncias intracelulares, resultando dessa forma no comprometimento de atividades vitais dos microrganismos (GOY et al., 2016; ZOU et al., 2016).

Alguns pesquisadores supõem que esta interação eletrostática ocorra entre a quitosana e os componentes celulares da membrana carregados negativamente, tais como fosfolípidos e proteínas afetando a integridade e a permeabilidade da membrana, provocando a fuga de substâncias intracelulares e, finalmente, a morte da célula (GOY et al., 2016).

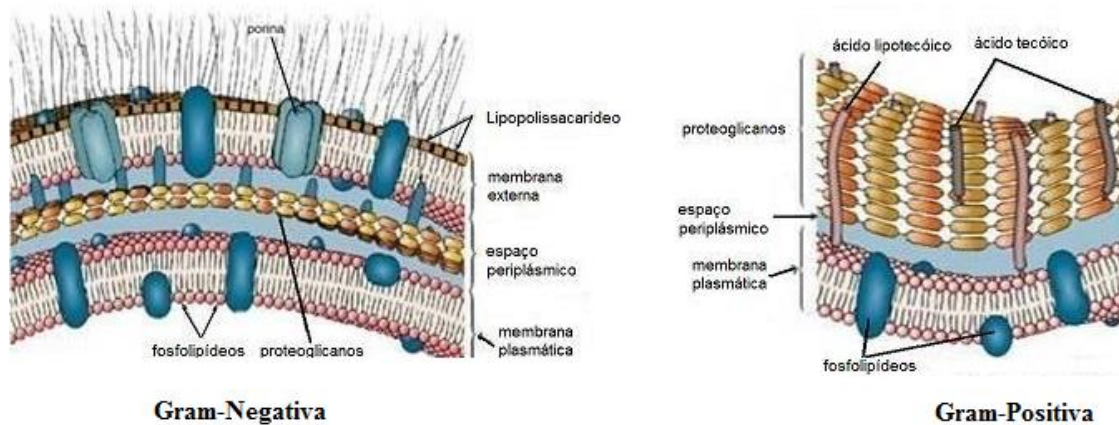
Nos microrganismos Gram-positivos a parede celular apresenta-se quase que inteiramente composta de peptidoglicano, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida. Além de peptidoglicano estão presentes também os ácidos teicóicos e lipoteicóicos que regulam a atividade das autolisinas, enzimas responsáveis pela degradação controlada de peptidoglicano (CAMPBELL et al., 2010; JUNG et al., 2010; KONG et al., 2010).

Nas bactérias Gram-negativas a parede celular é composta por uma membrana interna e uma externa. A membrana externa tem como função criar uma barreira de permeabilidade contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos e é composta de lipopolissacarídeo, lipoproteínas e fosfolípidos, onde se inserem poros constituídos por proteínas (as porinas) sob as quais se encontra, a camada de peptidoglicano presente na membrana interna. A camada de peptidoglicano é mais delgada e situa-se entre a membrana interior e a membrana exterior da bactéria (JUNG et al., 2007). Estes polímeros podem se envolver em interações com as superfícies da parede celular e

podem causar fortes ligações com diferentes meios de interações, tais como pontes de hidrogênio (JUCKER, et al., 1997).

Supõe-se que a atividade antibacteriana da quitosana esteja intimamente correlacionada com as características da superfície da célula, conforme podemos observar na Figura 3.

Figura 3. Estrutura da parede celular das bactérias Gram-Negativa e Gram-Positiva.



Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br>

YANG e colaboradores (2005) relataram que a atividade antibacteriana de derivados de quitosana N-alkilados solúveis em água contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* é afetada pelo grau de substituição do dissacarídeo e pelo tipo de dissacarídeo presente na molécula.

ZHENG e ZHU (2003) em seu estudo avaliaram o efeito antimicrobiano de amostras de quitosana de diferentes massas moleculares sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Observou um aumento no potencial antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* com o aumento da massa molecular do polímero, enquanto que o efeito sobre a *Escherichia coli* foi diminuído.

TAKAHASHI e colaboradores (2008) reportaram em seus estudos que um maior grau de desacetilação com mais cargas positivas foi bem mais sucedido em inibir o crescimento de *S. aureus*, sugerindo que a atividade antibacteriana da quitosana para *S. aureus* foi reforçada com o aumento do grau de desacetilação.

BADAWY (2010) no seu estudo descreve os efeitos antibacterianos e antifúngicos de quitosana de baixo peso molecular e seus derivados quaternizados contra bactérias de *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia carotovora* e fungos de

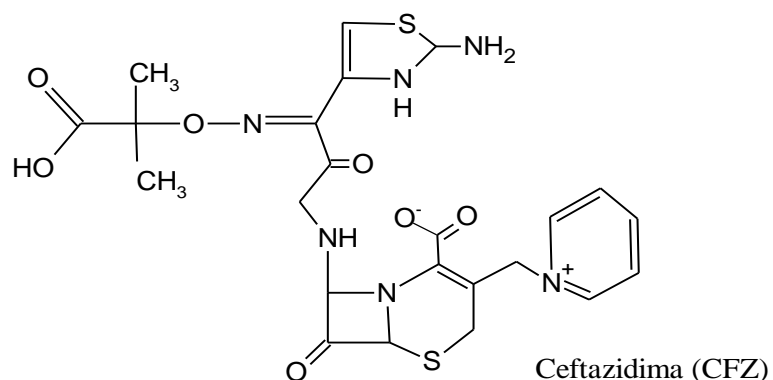
Botrytis cinerea, *Fusarium oxysporum* e *Pythium debaryanum*. Os derivados quaternário de N-alkil-quitosana o N, N, N- (dimetilpentil) e N, N, N-(dimetilhexil) quitosana apresentaram uma melhor atividade antibacteriana dentre os demais derivados e quando comparados com a quitosana. Estes resultados demonstraram que a modificação química da quitosana conduziu a um aumento da atividade biológica contra patógenos das plantas. Os resultados sugerem que os derivados quaternizados de quitosana como compostos solúveis em água podem ser usados para controlar algumas bactérias patogênicas e fungos que causam a destruição de culturas e vegetais. Assim, tais compostos têm potenciais aplicações na agroindústria e como alternativas para o controle de doenças, uma vez que alguns pesticidas são prejudiciais.

O aparecimento e a disseminação de microrganismos com múltipla resistência às drogas estão ocorrendo tanto nos hospitais quanto nas comunidades. Diante disso, existe a necessidade de se encontrar novas formas de controlar o avanço da resistência de microrganismos multirresistentes e a busca contínua por novos compostos antimicrobianos naturais (GUIMARAES et al.; 2010; SANTOS, 2012).

O desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade antimicrobiana, de baixo custo, e que viabilizem a incorporação de agentes com atividade reconhecida, é uma área de extremo interesse, tanto para químicos, quanto farmacêuticos. O uso e a combinação de antibióticos com quitosana e seus derivados como agentes antimicrobianos vêm sendo alvo de pesquisa nos últimos anos (MU et al., 2014; YALINCA et al., 2013; MELAKE et al., 2012; TIN et al., 2010; TIN et al., 2009; AZEVEDO et al., 2007).

A ceftazidima é uma cefalosporina de terceira geração, semi-sintética, bactericida, resistente à maioria das β -lactamases (Figura 4). Corresponde ao (6R,7R)-7-[[[(Z)-2-amino-4-tiazolil]-2-[(1-carboxi-1-metiletoxi)imino]acetil]amino]-8-oxo-3-[(1-piridínio)metil]-5-tia -1 -azabicyclo[4.2.0]-2-octeno-2-carboxilato penta-hidratado e sua fórmula empírica é $C_{22}H_{32}N_6O_{12}S_2$, com peso molecular de 636,6 g/mol, (The Merck Index, 2006; MORENO; SALGADO, 2012).

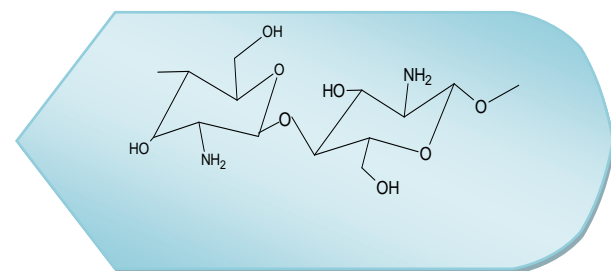
Figura 4. Estrutura química da ceftazidima.



Fonte: autoria própria (2017).

A ceftazidima possui um espectro para administração parenteral, possui ação bactericida, exercendo seu efeito através da inibição das enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. É indicado no tratamento de infecções dos tratos respiratório e geniturinário, infecções otorrinolaringológicas, de pele e de tecidos moles, infecções osteoarticulares, enterocócicas e do sistema nervoso central, doença inflamatória pélvica, endometrite e outras infecções do aparelho genital feminino (MORENO; SALGADO, 2012).

Materials e Métodos



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes

A quitosana de grau médio de desacetilação (95%) foi obtida da Primex, extraída da carapaça de caranguejo, os reagentes utilizados hidróxido de sódio (DINÂMICA), ceftazidima pentaidratada (BIO CHIMICO), ácido acético (VETEC) e Brain Heart Infusion (BHI) (HIMEDIA), Agar Nutriente (HIMEDIA), GM07492A (Fibroblasto Humano), DMEM (Gibco/ Thermofisher), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) (nutricell), penicilina, estreptomicina 10 UmL⁻¹ (sigma) e cloreto de sódio (IMPEX) foram utilizados sem prévia purificação.

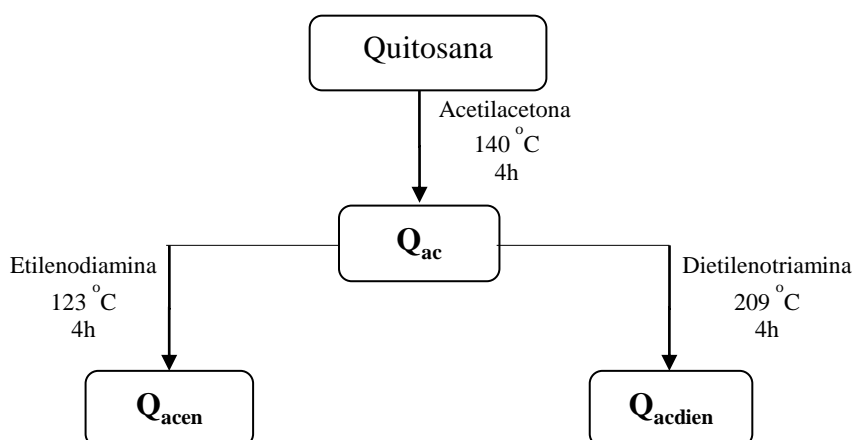
4.2 Modificações químicas da Quitosana

4.2.1 Modificação com acetilacetona e aminas

A reação da quitosana com acetilacetona foi realizada na ausência de solvente. Foi reacionada, mantendo-se a agitação por 4h a temperatura de 140 °C. Após esse tempo o sólido foi separado por filtração seguida por lavagens com água e acetona para retirar o excesso de reagente. A secagem foi realizada a 100 °C e denominado Q_{ac}.

Posteriormente o derivado Q_{ac} reagiu num sistema idêntico com etilenodiamina, e dietilenotriamoina, sendo esses polímeros modificados e denominados Q_{acen} e Q_{acdien} respectivamente. O fluxograma do processo de modificação da quitosana com acetilacetona e posterior reação com etilenodiamina e dietilenotriamina está ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma do processo de modificação química da quitosana.



Fonte: autoria própria (2017).

4.3 Método de obtenção dos materiais Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$

Com a finalidade de verificar a incorporação do fármaco pela quitosana e pelos derivados de quitosana, preparou-se uma solução estoque de ceftazidima e em seguida foram preparadas várias soluções com concentrações variando de 25 - 250 mg mL⁻¹ do respectivo fármaco. Alíquotas de 20,0 mL de cada solução foram colocadas em erlenmeyers contendo aproximadamente 40,0 mg de cada amostra. As amostras foram homogeneizadas utilizando mesa agitadora a 130 rpm por 48h a temperatura de 273±2 °C. Após este período, separou-se o sobrenadante em uma centrífuga Centribio modelo 80- 2B a 5000 rpm por 15 min, e filtrou-se o sobrenadante utilizando-se um filtro de poro 20µm e em seguida determinou-se as concentrações finais das amostras por Espectroscopia do UV-Vis, modelo CARY 60 da Varian, no comprimento de onda de 257 nm, que corresponde a faixa de absorção máxima do fármaco ceftazidima. A quantidade do fármaco adsorvido por unidade de massa da quitosana (q_e em mg g⁻¹) foi calculada de acordo com a Equação 1 (YU, F et al., 2016).

$$q_e = \frac{(C_i - C_f) \times V}{m} \quad \text{Equação 1}$$

onde q_e (mg g⁻¹) representa a quantidade adsorvida por grama de adsorvente; C_i e C_f (mg L⁻¹) representam as concentrações iniciais e finais da amostra do fármaco respectivamente; $V(L)$ é o volume da solução e m massa do adsorvente.

4.4 Caracterizações dos Materiais

Os materiais, quitosana natural, os derivados de quitosana obtidos e os materiais associados com o fármaco foram caracterizados pelas seguintes técnicas:

4.4.1 Análise Elementar

As análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuadas em um aparelho Perkin-Elmer, modelo PE 2400.

4.4.2 Ressonância Magnética de Carbono 13 (RMN ¹³C)

Os espectros de ressonância magnética de carbono 13 no estado sólido foram obtidos em um espectrômetro AC400/P Bruker com rotação do ângulo mágico, em 75,47 MHz, com tempo de relaxação de 5 s e tempo de contato de 1 ms.

4.4.3 Difração de Raio X

Os gráficos de raios-X foram obtidos no instrumento Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa 2θ entre 5 a 75°. A velocidade de varredura foi de 5° min⁻¹, utilizando a fonte de radiação CuK α , com comprimento de onda 154,06 pm.

4.4.4 Espectroscopia na região do Infravermelho

Os espectros de FTIR da quitosana e dos materiais modificados foram obtidos usando o espectrofotômetro Bomem-Hartmann & Braun MB utilizando pastilha em KBr 1% (m/m) de amostra, em 32 varreduras na região de 400 a 4000 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.5 Análise Térmica

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas no equipamento DuPont, modelo 9900, usando razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, em atmosfera de argônio, com varredura da temperatura de 25 °C à 1000 °C.

4.5 Avaliação da Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Ensaios Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara – Uniara pelo teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Este ensaio teve por objetivo avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos. Foi avaliado a citotoxicidade da quitosana e de seus derivados.

As células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, mantidas em meio de cultura enriquecido com soro fetal bovino (SBF) e antibióticos (penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma)) sendo incubadas em estufa 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, por 24 horas. Após 24 horas, as amostras foram pesadas (10mg) e acrescido a 1 mL de Meio Dulbecco Mem (DMEM) + SBF + antibióticos. As amostras foram agitadas, por aproximadamente 1 minuto, mantidas em ultrassom por 15 minutos e novamente agitadas por mais 1 minuto. O meio de cultura (DMEM) foi substituído por 100µL das amostras, as quais foram preparadas em triplicata e mantidas em estufa 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, por 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com sulfeto de polifenileno (PBS) e em seguida foram adicionados

50 µL de MTT). A placa foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após este período, 100µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda (λ) de 570 nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa.

Como controle negativo de materiais não citotóxico, foram utilizados o Meio Dulbecco Mem (DMEM) mais SORO BOVINO FETAL (SBF) e os ANTIBIÓTICOS (penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma)).

Como controle positivo de citotoxicidade para os materiais, foram utilizados o Meio Dulbecco Mem (DMEM) mais 25% de Dimetil sulfóxido (DMSO).

4.6 Avaliação da Atividade Antibacteriana

4.6.1 Cepas Bacterianas

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados com uma cepa Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e com uma cepa Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922). Todas as cepas foram mantidas em ágar nutriente a 4 °C.

4.6.2 Preparo do Inóculo

As culturas foram obtidas transferindo-se uma alçada do crescimento bacteriano em ágar nutriente para um tubo falcon contendo 3,0 mL do meio *Brain Heart Infusion* (BHI), seguido de incubação a 37 °C por 24 h. A partir desta cultura em BHI preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, Unidades Formadoras de Colônias). Em seguida foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina, obtendo no final uma suspensão com cerca de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ e $1,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

4.6.3 Teste de Contato Direto

Para avaliação da atividade antibacteriana, soluções da CFZ (1000 µg mL⁻¹), Q, Q_{ac}, Q_{acen}, Q_{acdien} (1000 µg mL⁻¹) e Q_{CFZ}, Q_{acCFZ}, Q_{acenCFZ}, Q_{acdienCFZ} (1000 µg mL⁻¹)

foram preparadas utilizando ácido acético 2% como solvente. Os ensaios foram realizados com 0, 1, 2, 3, 4, 5 dias após o preparo das soluções testes.

O teste de contato direto em meio sólido foi realizado de acordo com ZHENG; ZHU (2003). Para realização destes ensaios 100 µL da suspensão padronizada $1,5 \times 10^4$ UFC/mL foi transferida para placas de Petri contendo o meio Agar Nutriente. Em cada placa foi adicionado 100 µL da solução teste. As placas foram semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky pelo método *spread plate* e incubadas a 37 °C por 24h.

Como controle positivo de crescimento foram utilizadas placas com ágar nutriente contendo a suspensão bacteriana e solução salina, bem como placas contendo a suspensão bacteriana e solução de ácido acético 2%. Todos os ensaios realizados com as soluções-testes e soluções-controle foram realizados em triplicata. O efeito inibitório produzido por cada solução-teste foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$n = \frac{N_1 - N_2}{N_1} \times 100 \text{ Equação 2}$$

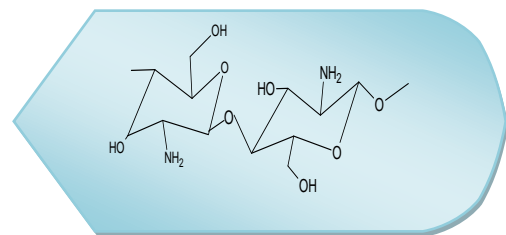
Onde η é definido como o efeito inibitório, N_1 é média aritmética das unidades formadoras de colônia das placas controle e N_2 é média aritmética das unidades formadoras de colônia de cada uma das soluções testadas.

4.7 Estudo de liberação “*in vitro*” da quitosana e derivados associados com fármaco

O estudo de liberação de ceftazidima associado com a quitosana e seus derivados foram estudados na temperatura de 37 °C e pH 1,2 e 7,4 para simular o ambiente gastrointestinal e foi adaptada do procedimento descrito por CRUZ (2004). A concentração de ceftazidima liberada pelos materiais Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ foi medida em soluções de pH 1,2 e pH 7,4 que simulam o ambiente gastrointestinal, quantificada utilizando espectrofotometria UV-Vis por medida direta da absorbância à 257 nm, em um espectrofotômetro Varian 1G. Aproximadamente 10-20mg dos materiais foram colocadas no meio de dissolução e deixadas em banho Maria com agitação, com velocidade de rotação de 100rpm, à temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

As alíquotas foram retiradas em determinados intervalos e devolvidas ao meio de liberação e as leituras realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise Elementar

Os resultados da análise elementar com os percentuais e as quantidades em mmol g⁻¹ de carbono, nitrogênio, da quitosana e de seus derivados são apresentados na Tabela 1.

O percentual de carbono do derivado Q_{ac} apresentado na Tabela 1 é maior em relação à quitosana, e pode-se observar que houve um aumento na quantidade molar desse elemento quando acetilacetona foi introduzida à matriz polimérica da quitosana, por outro lado o teor de nitrogênio foi menor, uma vez que, a quitosana possui 5,49 mmol g⁻¹ de nitrogênio e, após reação com acetilacetona, o valor foi reduzido para 3,75 mmol g⁻¹, pois o nitrogênio estava presente apenas na quitosana ocasionando assim um aumento na razão C/N de 6,13 para 10,44, comprovando a eficácia da reação.

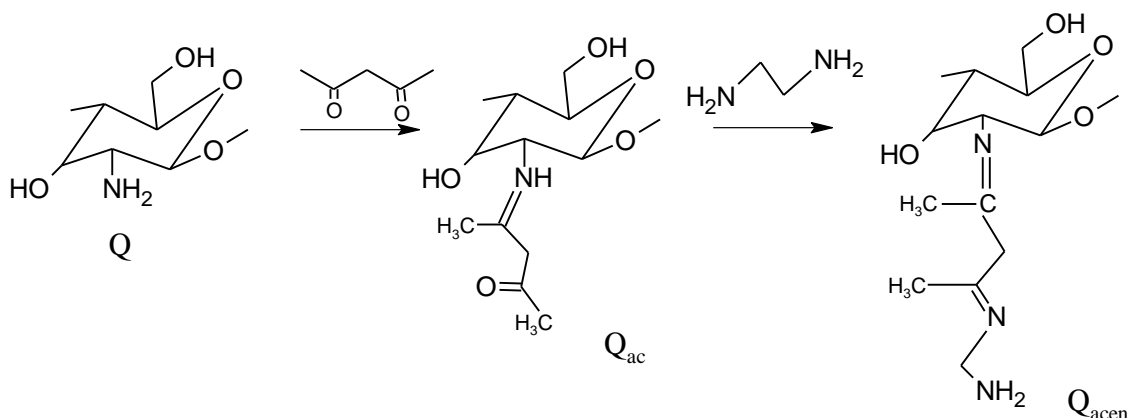
Tabela 1. Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados Q_{acen} e Q_{acdien}, razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos e grau de substituição (GS).

Amostras	% C	%N	C(mmol g ⁻¹)	N(mmol g ⁻¹)	C/N _{experimental}	C/N _{Teórico}	GS(%)
Q	40,43	7,69	33,69	5,49	6,13	6	-
Q _{ac}	46,98	5,25	39,15	3,75	10,44	11	-
Q _{acen}	42,01	7,93	35,00	5,66	6,18	4,3	27
Q _{acdien}	41,38	8,11	34,48	5,79	5,95	3,7	82

Fonte: autoria própria (2017).

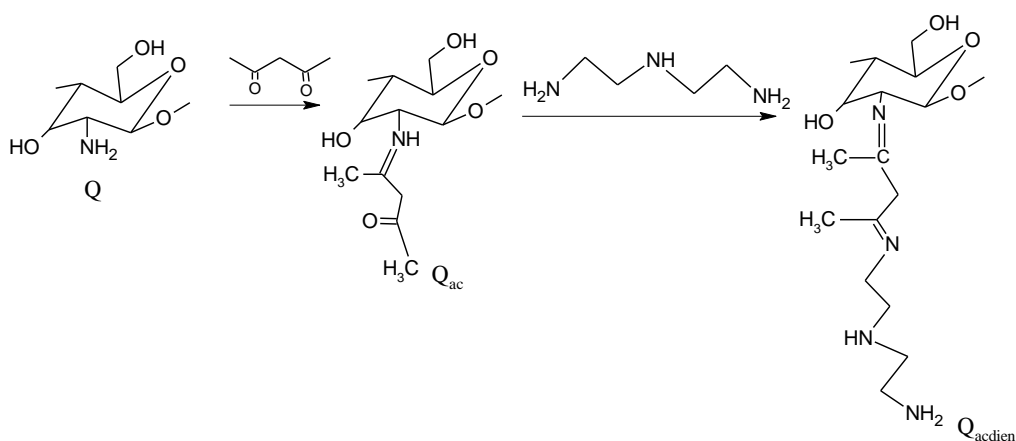
A introdução das aminas, etilenodiamina e dietilenotriamina, ao derivado Q_{ac} na Tabela 1 conduziu ao aumento da quantidade de nitrogênio observado nos materiais Q_{acen} e Q_{acdien} assim como, também uma diminuição da relação C/N nos mesmos materiais quando comparados com o derivado Q_{ac} como mostrado nos esquemas nas Figuras 6 e 7.

Figura 6 – Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana com acetilacetona e posterior reação com etilenodiamina.



Fonte: autoria própria (2017).

Figura 7 – Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana com acetilacetona e posterior reação com dietilenotriamina.



Fonte: autoria própria (2017).

A relação C/N de todos os biopolímeros leva em consideração apenas os monômeros, mas a relação teórica seria uma substituição de 100%, o que explica o fato do derivado de quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) não apresentar relação C/N inferior aos demais derivados.

Ainda na Tabela 1 são apresentados os valores de Grau de Substituição (GS) correspondente ao teor de grupos -NH₂ da quitosana, que potencialmente pode agir como ligantes e foram calculados a partir da equação 03, com base no modelo proposto (BARAN; MENTES, 2015).

$$GS = \frac{(aC/N)_m - (C/N)_o}{n} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

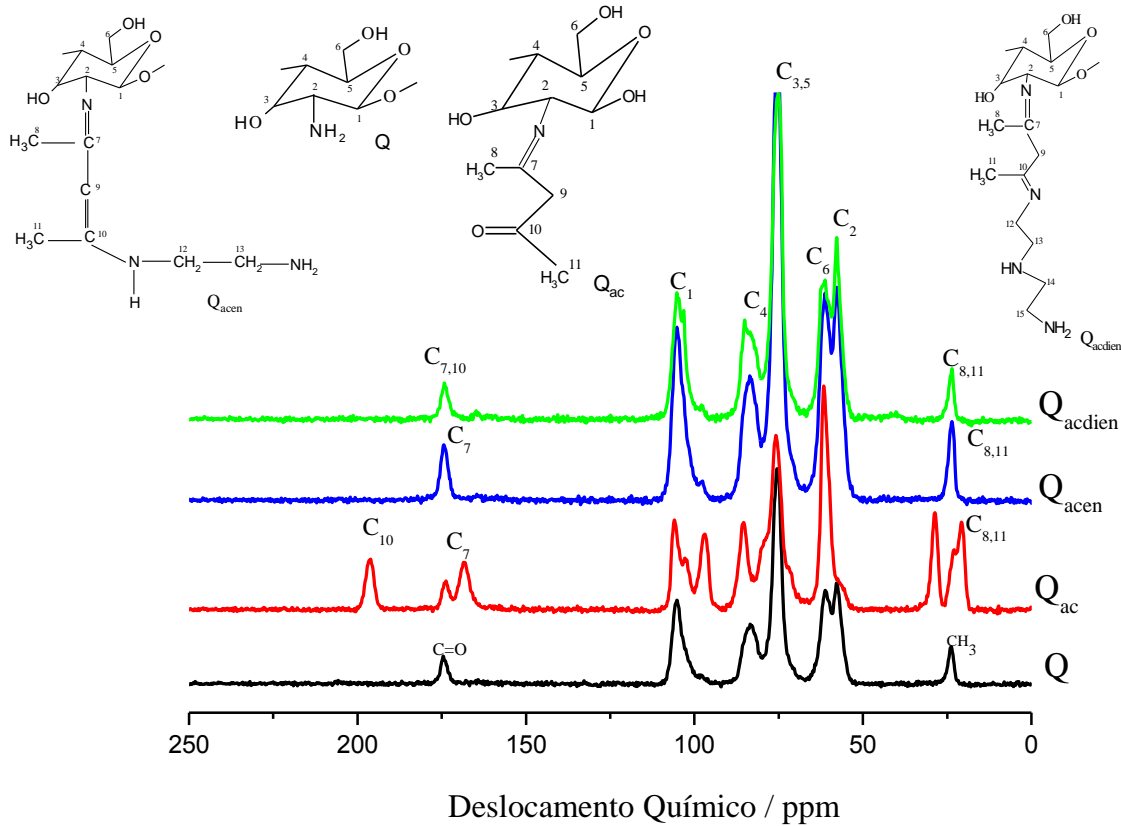
Onde $(C/N)_m$ é a razão C/N da quitosana modificada, $(C/N)_o$ é a razão C/N da quitosana não modificada, a e n são os números de átomos de nitrogênio e carbono introduzidos após à modificação química, respectivamente.

De acordo com os valores obtidos, o grau de substituição (GS) do derivado modificado com a dietilenotriamina (GS = 82%) foi maior do que o obtido com dietilenodiamina (27%). Estes sugerem que ocorreram as reações de modificações do derivado Q_{ac} com etilenodiamina e dietilenotriamina.

5.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 no estado sólido para quitosana (Q) e seus derivados Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien} são apresentados na Figura 8.

Figura 8. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido de Q, Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien} .



Fonte: autoria própria (2017).

A quitosana e seus derivados apresentam os deslocamentos característicos em 105 e 84 referente aos carbonos 1 e 4, respectivamente, que são responsáveis pela ligação para formação da cadeia polimérica. O pico mais intenso em torno de 75 ppm refere-se aos carbonos 3 e 5, que são carbonos secundários ligados a uma hidroxila e a outros carbonos. Em 61 e 58 ppm, aparece um sinal largo com um ombro, cujos deslocamentos químicos referem-se ao carbono primário (C_6), contendo uma hidroxila e o carbono (C_2) característico da quitosana ligado ao grupo amino, como também sinais em 23 e 175 ppm relacionados respectivamente aos grupos metila (CH_3) e carbonila ($C=O$) de amida remanescentes da quitina, devido a quitosana não se encontrar totalmente desacetilada (PARK et.al., 2010).

Para o derivado Q_{ac} quando comparado com a quitosana (Q), observa-se o surgimento de sinais em 173 e 196 ppm dos carbonos C_7 e C_{10} , embora possam ocorrer deslocamentos nessa região devido à ressonância na estrutura da molécula, esse deslocamento (173 ppm) refere-se ao carbono ligado ao nitrogênio que forma a base de Schiff ($C=N$) e sinal da carbonila da estrutura da acetilacetona aparece próximo a 196 ppm. A presença dos sinais em 20 e 28 ppm correspondem aos carbonos dos grupos CH_3 terminais da acetilacetona, e dos grupos metílicos da molécula, além disso, os carbonos C_6 e C_2 aparecem como um único sinal intenso e estreito quando comparado com Q.

Outra diferença observada quando comparados os espectros Q e Q_{ac} é a separação do pico de (Q) em dois picos (Q_{ac}) entre 97 e 106 ppm, que está associado à mudança de cristalinidade deste material, uma vez que estes picos aparecem na forma amorfa e cristalina, com sobreposição ou com ombro (SILVA, 2009).

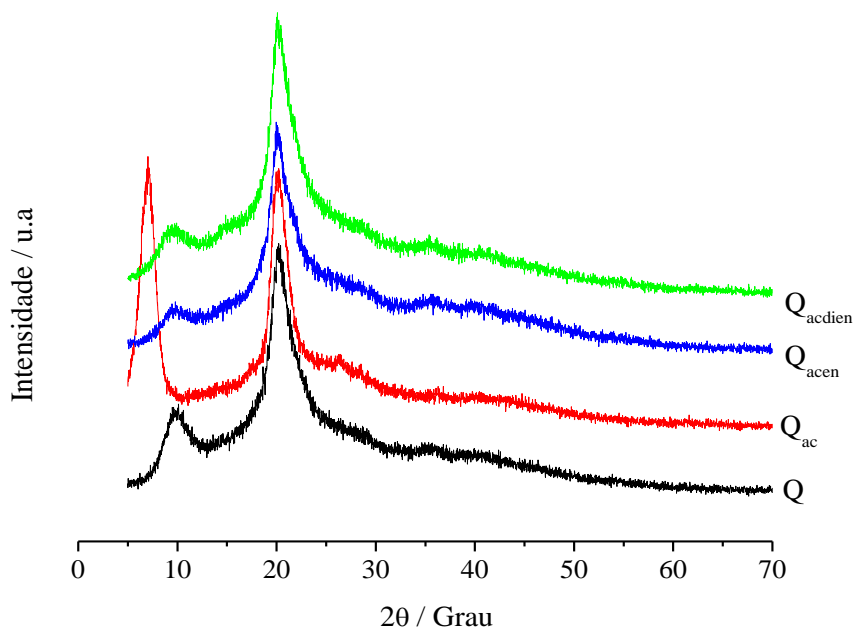
Os espectros dos materiais Q_{acen} e Q_{acdien} apresentaram um sinal bem definido no carbono C_4 e a separação dos carbonos C_6 e C_2 , quando comparados com Q_{ac} indicando uma modificação do ambiente químico devido à introdução dos novos grupos funcionais ao carbono C_2 da cadeia polimérica, comprovando assim que as reações de modificações ocorrem preferencialmente nos grupos amino mais reativos que os grupos hidroxilas como proposto nas Figuras 5 e 6. Verifica-se também nos espectros dos derivados Q_{acen} e Q_{acdien} o desaparecimento do pico em 196 ppm relacionados a carbonila ($C=O$) de cetona e o aumento na intensidade do pico em 174 ppm relacionado ao maior número de ligações iminas (base de Schiff - $C=N$) presentes em ambos os materiais, comprovando a eficácia da reação entre o derivado Q_{ac} e as moléculas de

etilenodiamina e dietilenotriamina. Observa-se ainda mudanças no pico em torno de 58 e 23 ppm, que se referem aos carbonos presentes na molécula tanto da etilenodiamina quanto na molécula da dietilenotriamina imobilizadas (AMARAL et al., 2005).

5.3 Difração de Raios X

Os dados de difração de raio X foram empregados com a finalidade de verificar o grau de cristalinidade dos materiais provenientes das reações. A Figura 9 apresenta os difratogramas de Q, Q_{ac}, Q_{acen}, Q_{acdien}.

Figura 9. Difração de Raios X da quitosana (Q) e derivados Q_{ac}, Q_{acen} e Q_{acdien}.



Fonte: autoria própria (2017).

A quitosana apresenta um perfil semicristalino devido às fortes interações intra e intermolecular, caracterizado pelas ligações de hidrogênio formadas entre os grupos amina e álcool presentes na molécula da quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura microcristalina da quitosana (KUMIRSKA et al., 2011).

O difratograma da quitosana apresenta um padrão de difração pouco cristalino, como observado na Figura 9 com dois picos largos característicos em $2\theta = 10,1^\circ$ e $2\theta = 20,2^\circ$ que correspondem às regiões não-cristalinas e cristalinas respectivamente.

O derivado Q_{ac} diminui as ligações de hidrogênio provocando uma reorganização estrutural no material, originando estrutura mais compacta e organizada e, conseqüentemente, resultando no aumento da cristalinidade evidenciada pela maior intensidade dos picos e desaparecimento do plano amorfo em $10,1^\circ$. Após incorporar as aminas, planos semelhantes à quitosana são novamente formadas com a reorganização das ligações de hidrogênio.

Nos derivados Q_{acen} e Q_{acdien} quando comparados com Q_{ac} observa-se um deslocamento de pico em 2θ igual $7,1^\circ$ da Q_{ac} para ângulos mais altos em $9,8^\circ$ e $9,0^\circ$ com uma pronunciada diminuição e alargamento desses picos, o mesmo se observa para o pico em 2θ igual a 20° , refletindo desta maneira na perda de cristalinidade dos derivados Q_{acen} e Q_{acdien} quando comparada com a Q_{ac} .

Este fato está associado ao observado no RMN ^{13}C , mostrado na Figura 8, onde os deslocamentos químicos dos átomos de carbonos (C_1 e C_4) provocam a separação do pico da quitosana em dois picos no espectro do Q_{ac} após a modificação da superfície da quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) promovendo mudanças na cristalinidade do material, uma vez que estes picos aparecem na forma amorfa e cristalina, com sobreposição ou com ombro (SILVA, 2009).

A quitosana por si só não apresenta padrão de cristalinidade absoluta, por isso, a partir dos dois picos de maior intensidade da difratometria de raio-X desse material foi determinado os índices de cristalinidade. Os índices de cristalinidade ou graus de ordenamento de polímeros podem ser determinados a partir de análises de difração de raios-X (ZHANG et al., 2005). Metodologias específicas para análise do índice de cristalinidade têm sido desenvolvidas para serem aplicadas à quitina e quitosana (STRUSZCZYK, 1987; ZHANG et al., 2006). A determinação dos índices de cristalinidade da quitosana (FOCHER et al., 1990; KUMIRSKA et al., 2011) e derivado foram calculados através da expressão abaixo:

$$\% I_{CR} = (I_C - I_A / I_C) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde: $\% I_{CR}$ é o índice de cristalinidade; I_C e I_A são as intensidades difratadas relativas às regiões cristalinas ($2\theta \cong 20^\circ$) e amorfas ($2\theta \cong 12^\circ$), respectivamente estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Valores das intensidades relativas às regiões cristalinas (I_C) e amorfas (I_A) e do índice de cristalinidade ($\%I_{CR}$) da quitosana e derivados.

AMOSTRAS	I_C	I_A	$\% I_{CR}$
Q	1280	468	63,43
Q_{ac}	1326	0	100
Q_{acen}	1144	336	70,10
Q_{acdien}	1362	426	64,73

Fonte: autoria própria (2017).

Os valores do índice de cristalinidade ($\%I_{CR}$) na Tabela 2 demonstram um aumento no índice de cristalinidade para o derivado de quitosana Q_{ac} com relação à quitosana não modificada. O aumento da cristalinidade do derivado Q_{ac} está relacionado a nova organização no material pela diminuição de ligações de hidrogênio.

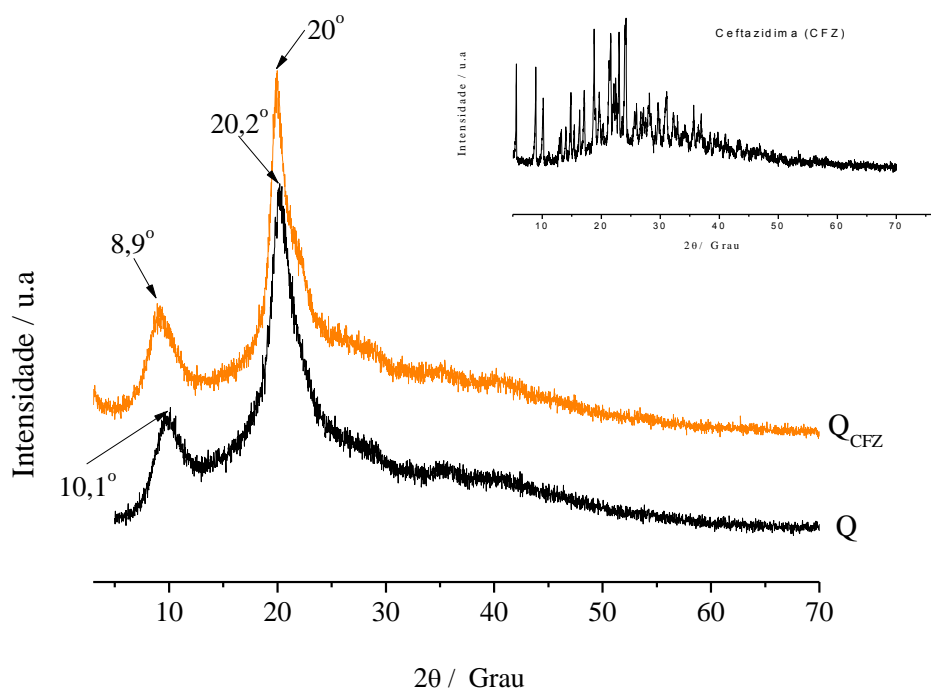
Entre o derivado Q_{ac} e os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} vê-se que o Q_{ac} é menos hidrofílico entre os materiais (ver Tabela 6) e o que possui maior mudança no deslocamento para menores ângulos. Quando as moléculas de etilenodiamina e dietilenotriamina são introduzidas no derivado Q_{ac} podemos observar que o derivado Q_{acdien} por possuir maior caráter hidrofílico do que Q_{acen} com maior disponibilização de grupos $-NH_2$ provoca um deslocamento para ângulos maiores reduzindo dessa maneira o índice de cristalinidade dos materiais quando comparada com Q_{ac} conforme podemos observar na Tabela 2.

Esses resultados são confirmados com os dados da análise elementar apresentados na Tabela 1 onde mostram que a incorporação das aminas etilenodiamina e dietilenotriamina na estrutura da Q_{ac} aumenta o percentual do número de nitrogênio e consequentemente aumenta o caráter hidrofílico dos derivados.

Os resultados de difração de raios X dos derivados estão corroborando com os resultados da análise elementar e ressonância magnética ^{13}C já apresentados, os quais confirmam a efetividade da modificação da quitosana com acetilacetona e posterior reação com aminas.

O difratograma de raio X da quitosana associada com o fármaco (Q_{CFZ}) ilustrado na Figura 10, mostra um leve deslocamento e alargamento do pico em 2θ igual a $8,9^\circ$ e 2θ igual 20° para o derivado associado com fármaco Q_{CFZ} quando comparado com Q .

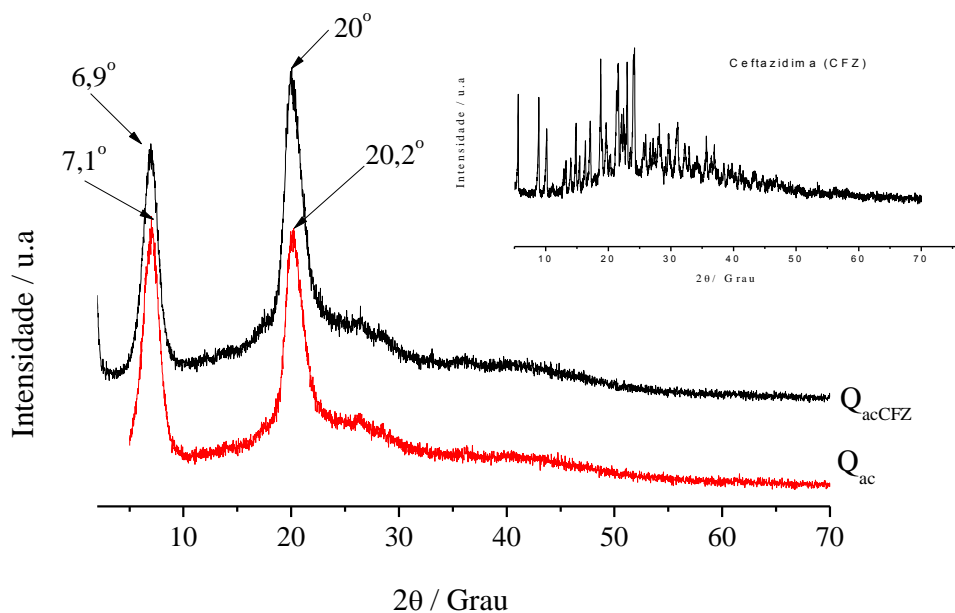
Figura 10. Difração de Raio X da quitosana e da quitosana associada com fármaco (Q_{CFZ}).



Fonte: autoria própria (2017).

A difração de raio X do derivado Q_{acCFZ} ilustrado na Figura 11 apresenta um alargamento e pequeno deslocamento do pico em 2θ igual a $6,9^\circ$ e 2θ igual a 20° quando comparado com Q_{ac} .

Figura 11. Difração de Raio X do derivado Q_{ac} e Q_{acCFZ} .

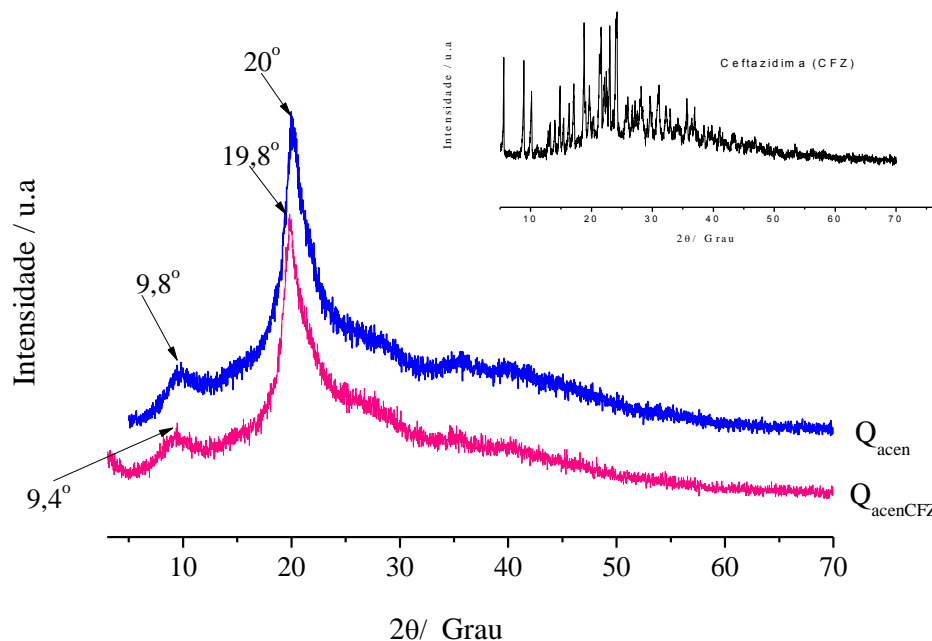


Fonte: autoria própria (2017).

A diminuição no índice cristalinidade do Q_{acCFZ} , provavelmente está relacionado à incorporação do fármaco que estava em solução e em seguida incorporado por adsorção na superfície do material.

No difratograma do $Q_{acenCFZ}$ ilustrado na Figura 12 podemos observar um deslocamento e estreitamento do seu pico em 2θ igual $9,4^\circ$ e 2θ igual $19,8^\circ$ quando comparado com Q_{acen} .

Figura 12. Difração de Raio X do derivado Q_{acen} e $Q_{acenCFZ}$.

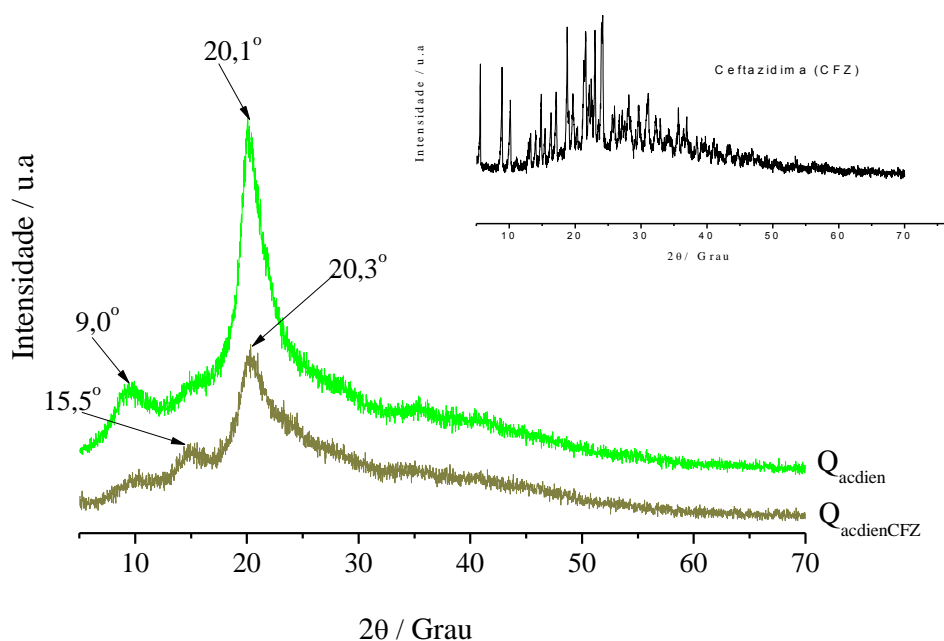


Fonte: autoria própria (2017).

O aumento no índice de cristalinidade do derivado associado com o fármaco está relacionado à incorporação do fármaco com característica hidrofílica na cadeia polimérica do derivado Q_{acen} .

No DRX dos derivados Q_{acdien} e $Q_{acdienCFZ}$ apresentados na Figura 13, observa-se um deslocamento e uma redução na intensidade dos picos em 2θ igual $15,1^\circ$ e 2θ igual $20,3^\circ$ para $Q_{acdienCFZ}$ refletindo desta maneira na perda de cristalinidade do $Q_{acdienCFZ}$ quando comparada com a Q_{acdien} ver Figura 13.

Figura 13. Difração de Raio X dos derivados Q_{acdien} e $Q_{acdienCFZ}$.



Fonte: autoria própria (2017).

O observa-se na Tabela 3 uma pequena diminuição nos valores dos índices de cristalinidade ($\%I_{CR}$) para os derivados associados com fármaco Q_{acCFZ} e $Q_{acdienCFZ}$ quando comparados com os precursores Q_{ac} e Q_{acdien} . A presença de ramificações ou grupos substituintes nas cadeias poliméricas afeta seu empacotamento, gerando domínios não-cristalinos (AKCELRUD, 2007).

Tabela 3. Valores das intensidades relativas às regiões cristalinas (I_C) e amorfas (I_A) e do índice de cristalinidade ($\%I_{CR}$) da quitosana, derivados e dos materiais associados com fármaco.

AMOSTRAS	I_C	I_A	$\% I_{CR}$
Q	1280	468	63,43
Q_{CFZ}	1280	460	64,06
Q_{ac}	1326	0	100
Q_{acCFZ}	1684	1288	23,51
Q_{acen}	1144	336	70,10
$Q_{acenCFZ}$	1050	248	76,38
Q_{acdien}	1362	426	64,73
$Q_{acdienCFZ}$	720	320	55,50

Fonte: autoria própria (2017).

No caso dos derivados associados com fármaco acredita-se que a substituição dos átomos de hidrogênio dos grupos amino dos derivados por grupos $CHCOO^- H^+$ do fármaco, mais volumosos e hidrofílicos, afeta a conformação espacial das cadeias e suas interações, gerando materiais menos cristalinos quando comparado com os derivados Q_{ac} e Q_{acdien} .

5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho

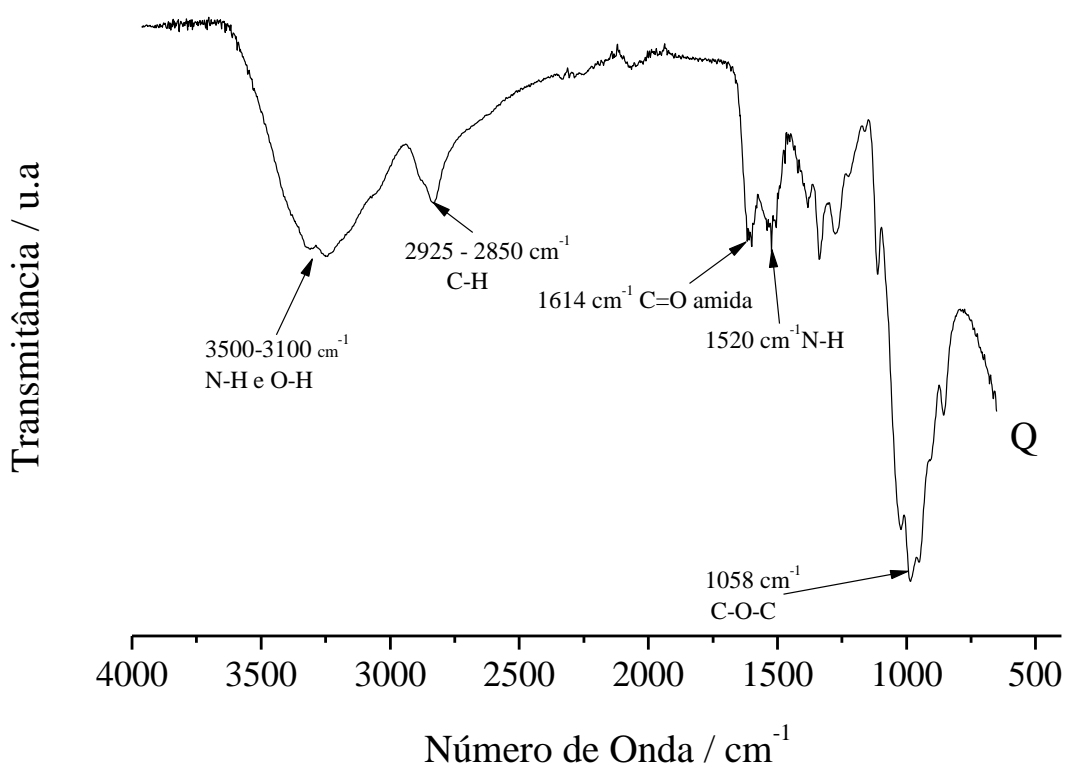
A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma das técnicas mais empregadas para a caracterização de quitosana e seus derivados e tem como finalidade identificar as principais bandas vibracionais dos grupos funcionais que reagiram com a quitosana.

O espectro de FTIR da quitosana (Q) apresenta as seguintes bandas características: uma banda intensa e larga na região de $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ atribuída vibrações de estiramento dos grupos O-H das hidroxilas da estrutura da quitosana, além dos mesmos estiramentos presentes na molécula de água que acompanha o polímero,

essa absorção também envolve os grupos N-H das unidades acetiladas do copolímero, conforme mostra a Figura 14.

A banda na região de 2925 – 2850 cm^{-1} resulta dos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H do polímero. As bandas entre 1637-1614 cm^{-1} estão associadas ao estiramento C=O de amida I, pois a quitosana não está totalmente desacetilada.

Figura 14. Espectro de FTIR da quitosana (Q).

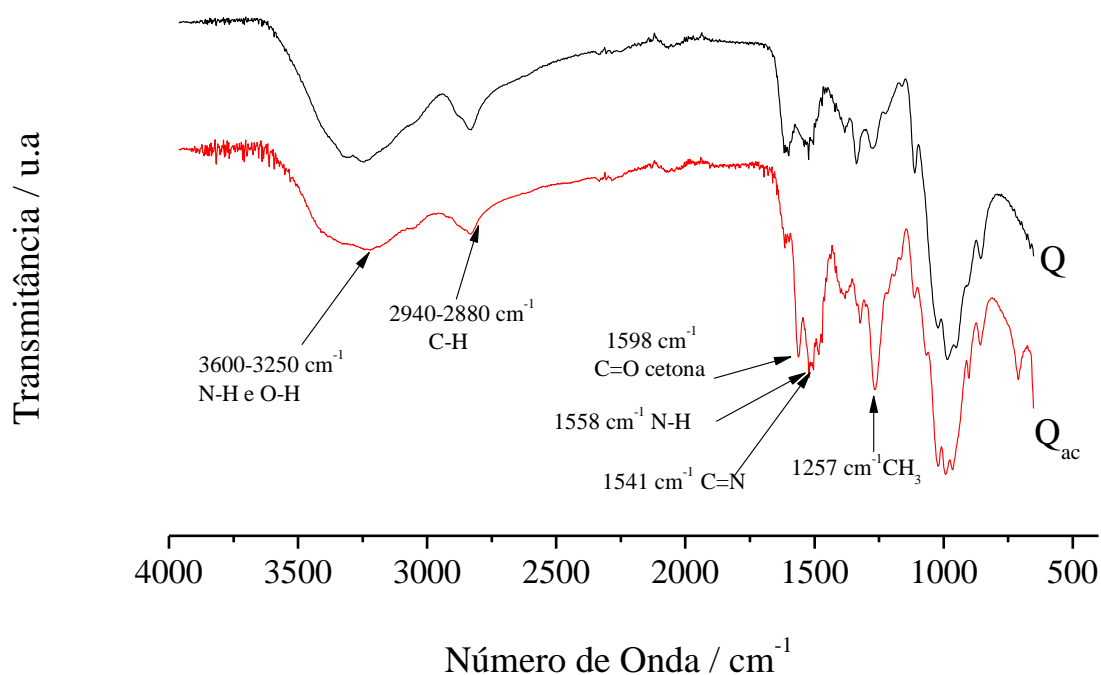


Fonte: autoria própria (2017).

A banda em 1520 cm^{-1} está associada com a deformação da ligação N-H do grupamento amina. A banda intensa em 1058 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-O-C do anel glicopiranosídeo (JAMIL et al., 2016; KUMIRSKA et al., 2011). Uma absorção em 1161 cm^{-1} associada à ligação beta glicosídica entre os carbonos 1 e 4, e as bandas em 1417 e 1372 cm^{-1} , são atribuídas as deformações dos grupos CH_2 e CH_3 respectivamente.

Na Figura 15 observa-se no espectro da quitosana modificada com acetilacetona (Q_{ac}) uma banda em 1598 cm^{-1} atribuída ao grupo da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de cetona cujo aparecimento confirma a incorporação dessa molécula na quitosana.

Figura 15. Espectros de FTIR da quitosana (Q) e do derivado Q_{ac} .

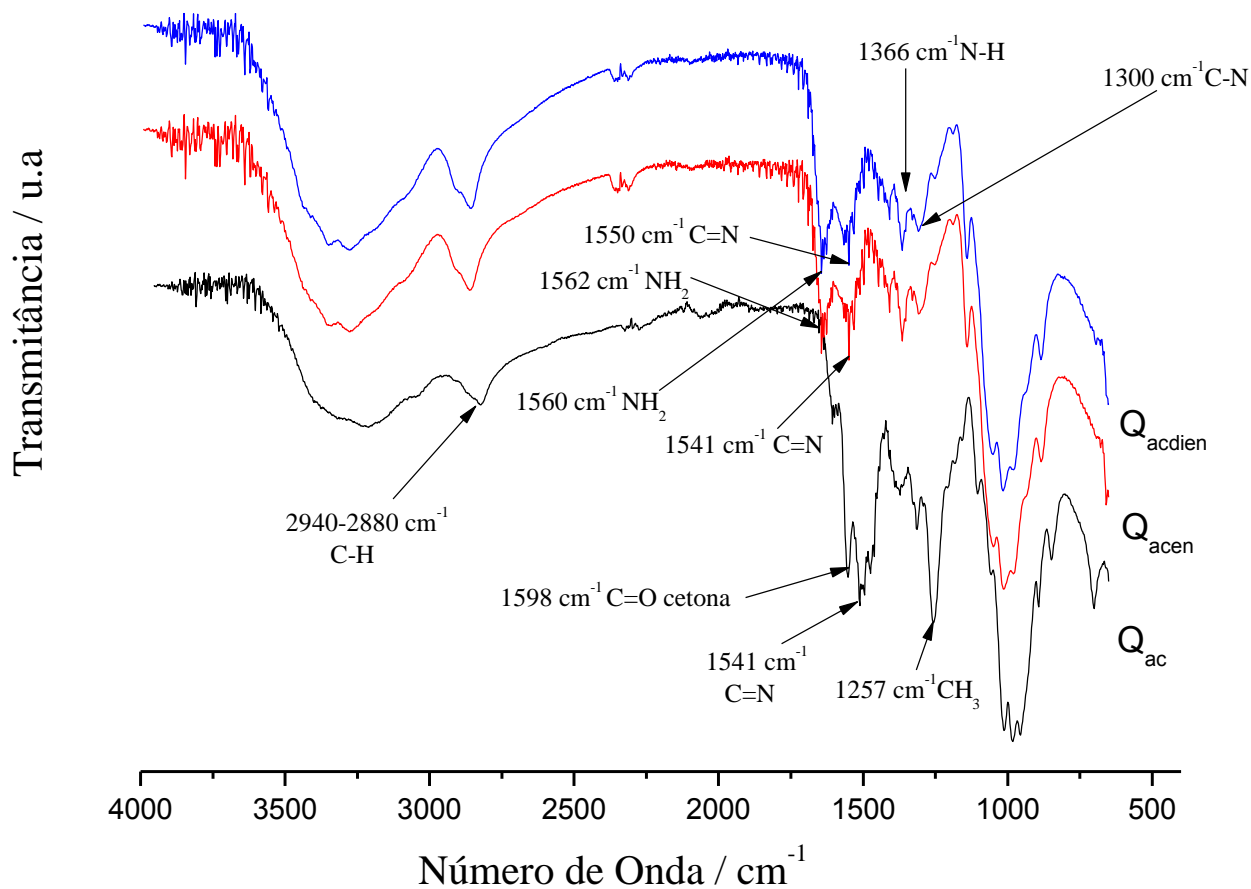


Fonte: autoria própria (2017).

O deslocamento da banda em torno de 1520 cm^{-1} correspondente à deformação N-H na quitosana para 1558 cm^{-1} no derivado Q_{ac} indica o envolvimento do grupo amina na reação de modificação. O surgimento da banda na região de 1541 cm^{-1} relacionada à formação da ligação imina ($\text{C}=\text{N}$) comprova a eficiência da reação quando comparada com a quitosana (Q). Observa-se também o aumento da banda na região de 1257 cm^{-1} atribuída à deformações dos grupos CH_3 presentes na acetilacetona.

Os espectros dos derivados Q_{acen} e Q_{acdien} obtidos após reação de Q_{ac} com etilenodiamina e dietilenotriamina são ilustrados na Figura 16.

Figura 16. Espectros de FTIR dos derivados Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} .



Fonte: autoria própria (2017).

Percebe-se um aumento na intensidade da banda referente aos grupos metilênicos que aparecem na região entre 2920-2857 cm^{-1} , devido aos grupos (CH_2) presentes na molécula etilenodiamina, como também o desaparecimento da banda em 1598 cm^{-1} correspondente a carbonila (C=O) de cetona no espectro de ambos os derivados Q_{acen} e

Q_{acdien} .

Os espectros de Q_{acen} e Q_{acdien} apresentam um deslocamento das bandas nas regiões de 1541 e 1550 cm^{-1} referentes às ligações iminas (C=N), porém mais intensa devido a uma maior quantidade de ligações formadas após a reação com etilenodiamina e dietilenotriamina quando comparadas com Q_{ac} .

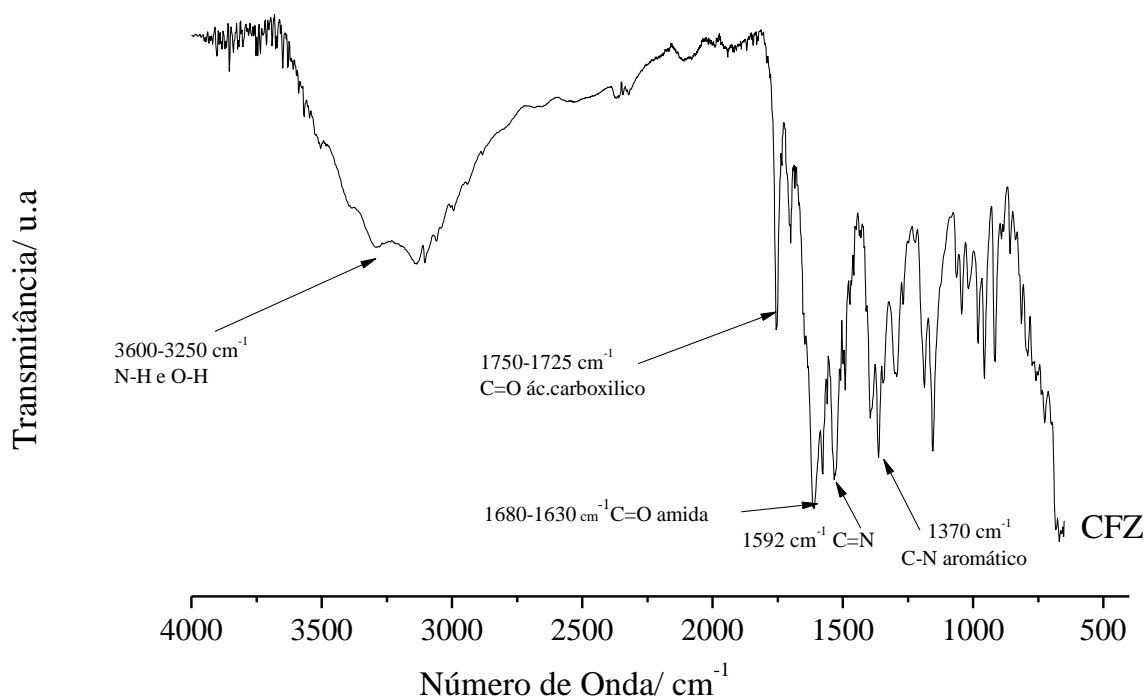
A banda em 1548 cm^{-1} correspondente à deformação N-H no espectro da Q_{ac} se encontra deslocada para 1560 e 1562 cm^{-1} para Q_{acen} e Q_{acdien} indicando o envolvimento do grupo amina na reação de modificação em ambos os derivados. Observa-se também

o aparecimento de uma banda intensa na região de 1300 cm^{-1} para ambos os derivados em virtude da ligação C-N de amina primária quando comparada com Q_{ac} .

Nota-se nos espectros de Q_{acen} e Q_{acdien} a presença da banda de deformação angular na região de 1366 cm^{-1} característica de aminas secundárias presentes em ambos os derivados.

O espectro de infravermelho da ceftazidima em pó para solução injetável (CFZ) está ilustrado na Figura 17.

Figura 17. Espectro de infravermelho da ceftazidima em pó para solução injetável em pastilhas de brometo de potássio.



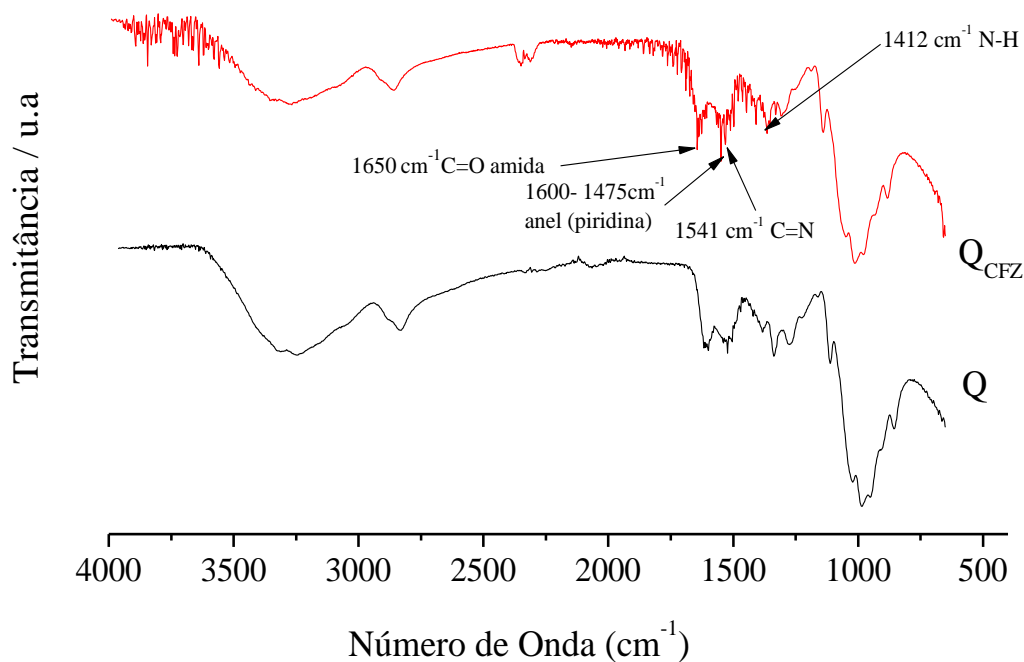
Fonte: autoria própria (2017).

O espectro da ceftazidima apresenta as bandas características de compostos cefalosporínicos tais como: bandas de deformação axial na região de $3600\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ correspondentes aos grupamentos N-H e O-H presentes na estrutura, bandas de estiramento na região de $1750\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ decorrentes dos grupamentos carboxílicos (C=O), além de quatro bandas características de anel aromático (piridina) entre $1600\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$.

Bandas de média e alta intensidade ocorrem entre $1350\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ e estão associadas à deformação axial de ligações C-N do anel aromático e bandas na região de $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ ocorrem devido à deformação axial do grupamento C=O de amida. (MORENO; SALGADO, 2012). As bandas em 2931 e 1740 cm^{-1} são referentes à ligação C-H e C=O no anel β -lactâmico e a banda em 1592 cm^{-1} relacionada à ligação imina C=N. (ABDULGHANI; MOHUEE, 2015; DAFALE et al., 2012; SONG et al., 2012).

Comparando-se o espectro da quitosana com a quitosana associada com ceftazidima (Q_{CFZ}) na Figura 18 observa-se que a banda de absorção referente à carbonila C=O de amida (1614 cm^{-1} na quitosana) sofre deslocamento e tem maior intensidade em 1650 cm^{-1} na Q_{CFZ} , estando este fato relacionado à presença dos grupos amidas presentes na estrutura do fármaco, dessa forma o aumento e alargamento da banda em 1412 cm^{-1} está relacionada ao maior número de ligações N-H formadas após a incorporação do fármaco na Q_{CFZ} , quando comparada com a quitosana, onde a mesma aparece com maior intensidade.

Figura 18. Espectros de FTIR da quitosana (Q) e da quitosana associada com fármaco (Q_{CFZ}).



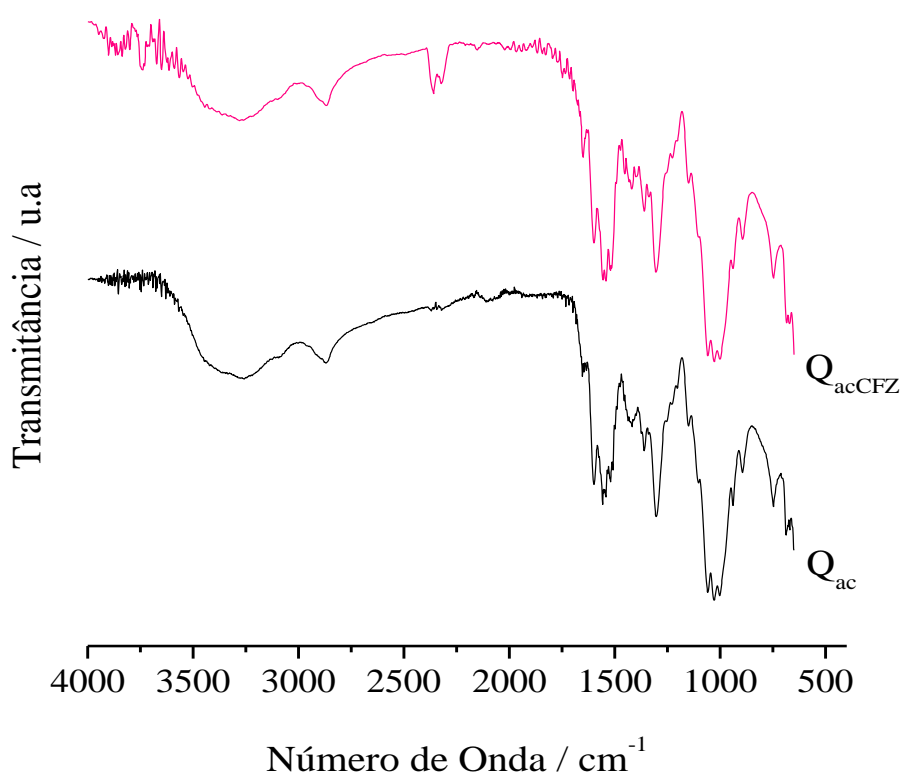
Fonte: autoria própria (2017).

Observa-se no espectro de Q_{CFZ} que a banda da ligação imina $C=N$ em 1541 cm^{-1} está aparecendo na mesma região relacionadas à deformação axial de $C=C$ de anel aromáticos em $1650\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$, ambos presentes na estrutura do fármaco, o que confirma a incorporação da ceftazidima na molécula da quitosana (Q).

Nas Figuras 19 e 20 são apresentados os espectros dos derivados Q_{ac} , Q_{acen} e dos derivados associados com ceftazidima.

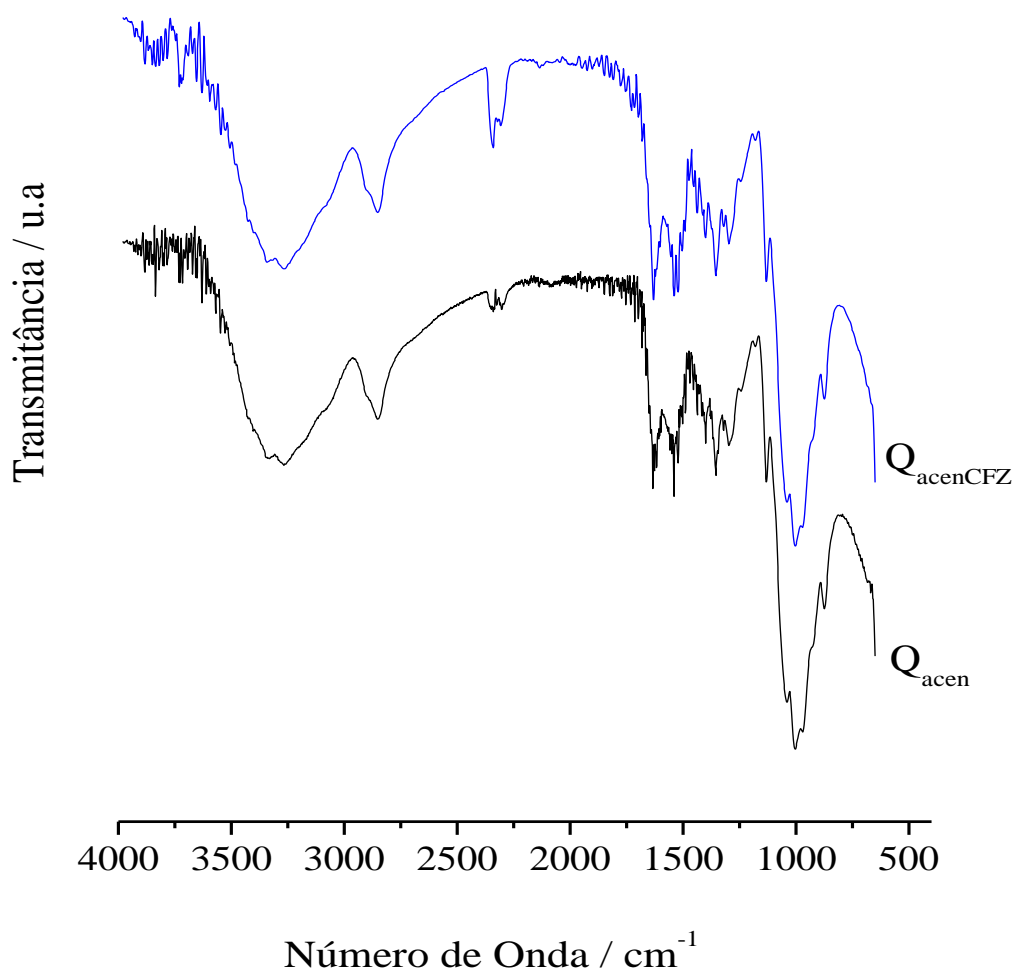
Podemos observar que os espectros dos materiais associados com fármaco não mostram muitas diferenças em relação aos derivados sem fármaco, pois acredita-se que o fármaco se encontra supostamente ligado à superfície dos materiais numa concentração muito pequena, o que dificulta a detecção da ceftazidima. Estes dados estão correlacionados com os gráficos da capacidade máxima de adsorção dos materiais ilustrados na Figura 28.

Figura 19. Espectros de FTIR do derivado Q_{ac} e do derivado associado com fármaco (Q_{acCFZ}).



Fonte: autoria própria (2017).

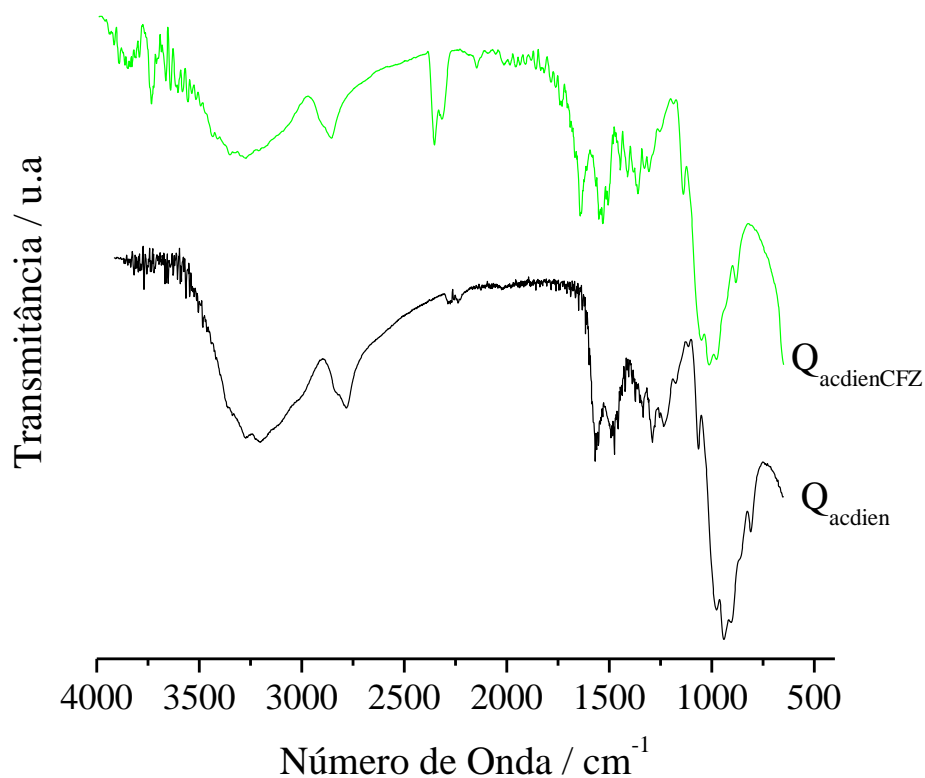
Figura 20. Espectros de FTIR do derivado Q_{acn} e do derivado associado com fármaco (Q_{acnCFZ}).



Fonte: autoria própria (2017).

Na Figura 21 observa-se nos espectros de Q_{acdien} e $Q_{acdienCFZ}$ que o derivado Q_{ac} modificado com dietilenotriamina (Q_{acdien}) apresenta uma banda intensa na região de 1550 cm^{-1} referente ao grupo C=N das ligações iminas formadas, já no espectro do $Q_{acdienCFZ}$ essa banda aparece sobreposta na mesma região das bandas do anel aromático (piridina) na região de 1550 – 1506 cm^{-1} .

Figura 21. Espectros de FTIR do derivado Q_{acdien} e do derivado associado com fármaco ($Q_{\text{acdienCFZ}}$).



Fonte: autoria própria (2017).

Outras bandas surgem no espectro de $Q_{\text{acdienCFZ}}$ entre 1372-1045 cm^{-1} devido à deformação axial de ligações C-N de aromático, banda intensa na região de 1640 cm^{-1} ocorre devido à deformação axial do grupamento C=O de amida presente na estrutura do fármaco, o que confirma a sua incorporação na estrutura do derivado Q_{acdien} .

5.5 Análise Termogravimétrica

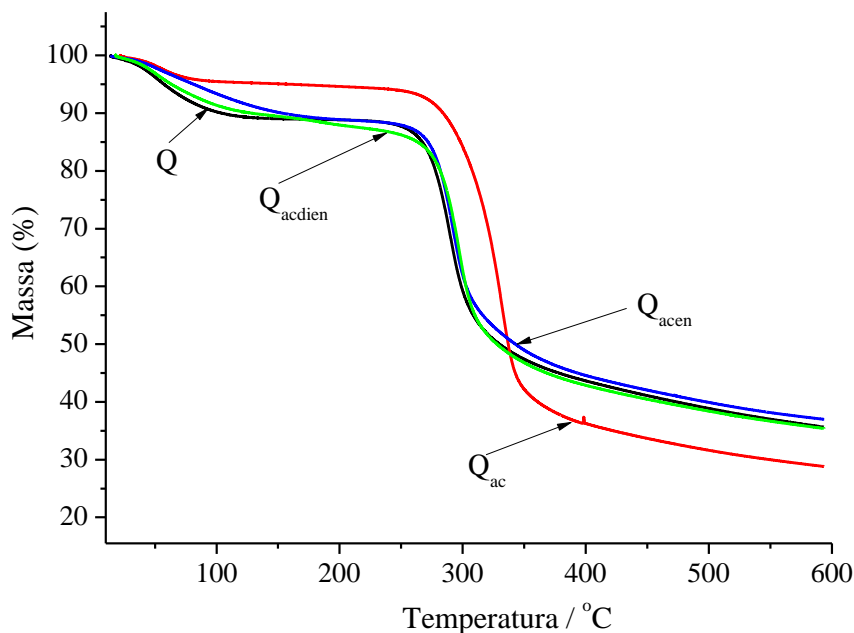
As curvas termogravimétricas foram obtidas com a finalidade de se avaliar a estabilidade térmica dos materiais.

O primeiro estágio de decomposição térmica do material corresponde à perda de água da superfície do material e o segundo estágio de decomposição é referente à degradação térmica do material orgânico na estrutura do biopolímero.

Os perfis de degradação térmica da quitosana e dos derivados de quitosana Q_{acen} , Q_{acdien} são bastante semelhantes, conforme apresentadas as curvas termogravimétricas

para quitosana e seus derivados na Figura 22. O perfil de degradação mostra que os processos de decomposição térmica dos materiais envolvem dois eventos térmicos, e isso é claramente evidenciado pelas derivadas das curvas DTG que apresentam dois picos distintos para quitosana e seus derivados, como mostra a Figura 22.

Figura 22. Curvas termogravimétricas da quitosana (Q) e derivados Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien}

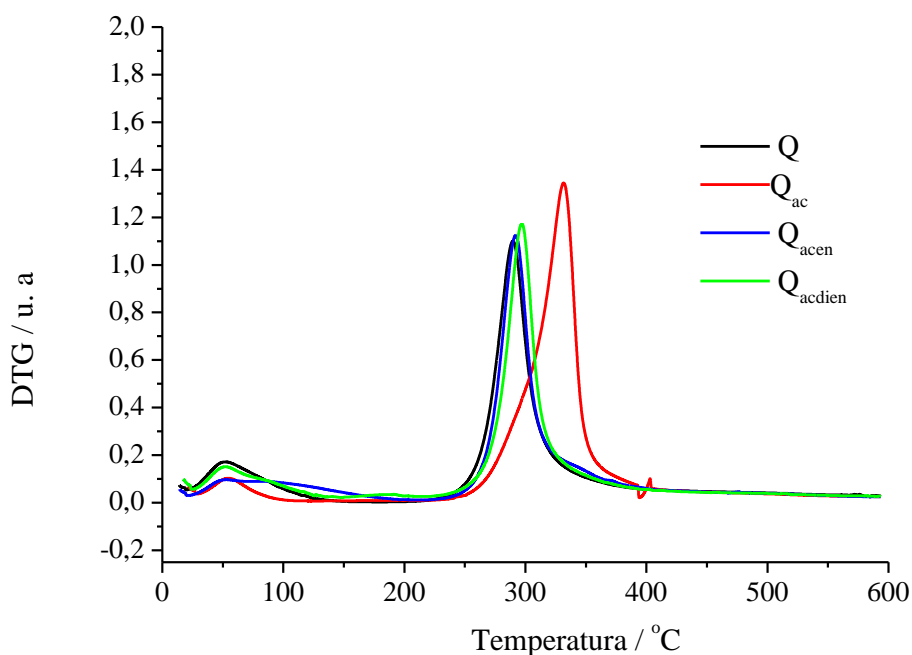


Fonte: autoria própria (2017).

Para a quitosana (Q), a primeira etapa de perda de massa compreende o intervalo de temperatura de 27 a 153 °C, o que se atribui à perda de água ligada por ligações de hidrogênio ou sorvida fisicamente na superfície da quitosana, com pico máximo em 51 °C como mostra a curva DTG da Figura 22, com perda de massa de 11,2 %. O evento térmico seguinte iniciou em 209 °C até cerca de 590 °C, com pico máximo em 289 °C, perda de massa de 53,1%, correspondente à degradação térmica do biopolímero.

A quitosana modificada com acetilacetona (Q_{ac}) apresentou primeiro estágio de degradação térmica inicial em 28 °C e vai até cerca de 94 °C com pico máximo de 55 °C e perda de massa de 4,2%. O segundo estágio iniciou em 244 °C e vai até cerca de 592 °C com pico máximo em 332 °C e perda de massa de 57,4%.

Figura 23. Derivadas das curvas termogravimétricas da quitosana (Q) e derivados Q_{ac} , Q_{acen} , Q_{acdien} .



Fonte: autoria própria (2017).

O derivado Q_{acen} apresentou o pico relativo à perda de água entre 26 °C a 196 °C com pico máximo da curva da derivada próximo a 52 °C e perda de massa de 11,0 %. O segundo estágio inicia-se a 228 °C e vai até cerca de 585 °C com pico máximo da curva da derivada próximo a 292 °C e perda de massa de 51,7%. Para Q_{acdien} o primeiro estágio de degradação inicia-se a 27 °C e vai até cerca de 144 °C com pico máximo próximo a 51 °C e perda de massa de 10,6%. O segundo estágio inicia-se a 225 °C e vai até cerca de 576 °C, com pico máximo próximo a 293 °C e perda de massa de 52%.

A modificação química da quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) conduziu os eventos de decomposição térmica para temperaturas ligeiramente superiores comparadas com a quitosana (Q). Isso mostra que a presença de determinados grupos funcionais na cadeia polimérica pode alterar a sua estabilidade. Essa observação está de acordo com a literatura, a qual prevê que a substituição da quitosana por grupos fortemente polares, grupos rígidos ou uma maior ordenação do polímero, tende a alterar significativamente a sua estabilidade térmica (PARK et al., 2011).

O aumento na estabilidade térmica no derivado Q_{ac} se deve ao fato de que os grupos hidrofóbicos são susceptíveis a interações eletrostáticas com o restante da cadeia polimérica, aumentando assim a ordenação da estrutura cristalina da quitosana, fato este

confirmado pelos resultados de DRX onde o Q_{ac} apresentou maior índice de cristalinidade.

Observa-se que para os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} a modificação química com os grupos hidrofílicos etilenodiamina e dietilenotriamina conduziu os eventos de decomposição térmica para temperaturas ligeiramente inferiores quando comparadas ao precursor Q_{ac} , conduzindo a materiais termicamente menos estáveis que o precursor Q_{ac} como se pode observar analisando os dados da Tabela 4.

Os dados de decomposição térmica obtidos através das curvas termogravimétricas são listados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de intervalos de temperatura (ΔT), perda de massa (P_m) e temperatura máxima ($T_{M\acute{a}x}$) de decomposição da quitosana e derivados.

Produtos	ΔT (°C)	P_m (%)	$T_{M\acute{a}x}$ (°C)
Q	27 - 153	11,2	51
	209 - 590	53,1	289
Q_{ac}	28 - 94	4,2	55
	244 - 592	57,4	332
Q_{acen}	26 - 196	11,0	52
	228 - 585	51,6	292
Q_{acdien}	27 - 144	10,6	51
	225 - 576	52,0	293

Fonte: autoria própria (2017).

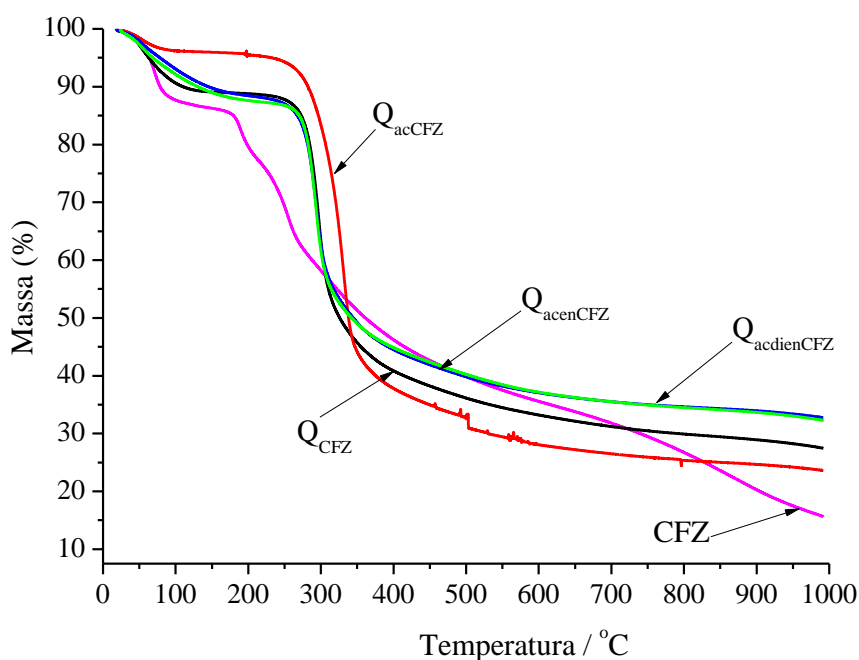
A quitosana modificada com acetilacetona, sem sofrer reações posteriores com as aminas, mostrou-se em geral mais estável termicamente que a quitosana não modificada e os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} .

Todos os derivados obtidos apresentaram estabilidade térmica maior ou semelhantes à quitosana e dessa forma os mesmos possuem potencial para uso em sistemas de liberação controlada de fármaco.

Os gráficos TG e DTG da ceftazidima (CFZ), da quitosana e dos derivados de quitosana associados com o fármaco são apresentados nas Figuras 24 e 25 respectivamente.

O fármaco ceftazidima (CFZ) na Figura 25 apresenta processo de degradação térmica em três etapas sendo que a primeira se inicia a 31 °C e vai até 117 °C com pico máximo de 71 °C e perda de massa de 12,2%. O segundo estágio vai de 215 °C até 306 °C e pico máximo próximo de 255 °C e 16,0% de perda de massa. O terceiro estágio inicia-se em 327 °C até 995 °C, com pico máximo próximo de 874 °C e perda de massa de 38,5%.

Figura 24. Curvas TG da ceftazidima (CFZ), Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$.



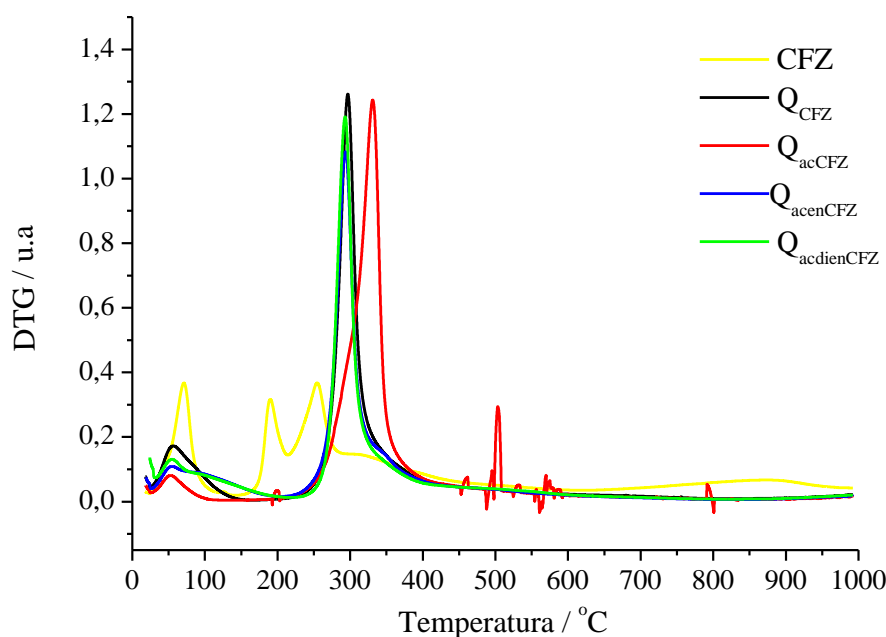
Fonte: autoria própria (2017).

As curvas TG e DTG da quitosana associada com ceftazidima (Q_{CFZ}) nas Figuras 24 e 25 apresentam dois estágios de decomposição térmica, sendo que o primeiro estágio se inicia em 26 °C e vai até cerca de 144 °C, com pico máximo próximo a 56 °C e perda de massa de 10,9 %. O segundo estágio de decomposição térmica inicia-se em 245 °C e vai até cerca de 983 °C com pico máximo próximo a 296 °C e perda de massa de 55,6 %.

Comparando os resultados da TG de Q na Figura 23 com a TG de Q_{CFZ} vê-se os eventos térmicos bem definidos em duas etapas. O Q_{CFZ} conduziu os eventos de decomposição térmica para temperaturas superiores a Q, como se pode perceber analisando os dados da Tabela 4; isso mostra que a associação da ceftazidima na

estrutura da quitosana (Q) conduziu a formação de um material termicamente mais estável do que a quitosana.

Figura 25. Derivadas das curvas termogravimétricas DTG do fármaco (CFZ), Q_{CFZ} , Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$.



Fonte: autoria própria (2017).

O derivado Q_{acCFZ} apresentou o pico relativo à perda de água entre 36 °C a 103 °C, com pico máximo próximo a 60 °C e perda de massa de 2,4 %. O segundo estágio inicia-se a 218 °C e vai até cerca de 925 °C, com pico máximo próximo a 331 °C e perda de massa de 71,3%.

O derivado $Q_{acenCFZ}$ apresenta seu primeiro estágio de decomposição térmica a 30 °C e vai até 215 °C, com pico máximo próximo a 55 °C e 11,2 % de perda de massa, o segundo estágio inicia-se a 210 °C e vai até 988 °C com pico máximo próximo a 293 °C e perda de massa de 55,5%.

Para $Q_{acdienCFZ}$ o primeiro estágio de degradação térmica se inicia a 32 °C e vai até cerca de 218 °C, com pico máximo próximo a 54 °C e perda de massa de 12,6%. O segundo estágio de decomposição térmica inicia-se a 248 °C e vai até cerca de 985 °C, com pico máximo próximo a 297 °C e perda de massa de 54,5%.

Fazendo uma comparação entre os resultados da TG e DTG obtidos nas Figuras 22 e 23 e com os resultados da TG e DTG dos materiais associados com fármaco Q_{acCFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ nas Figuras 24 e 25 podemos observar que os derivados associados com fármaco apresentaram perfil de degradação térmica muito similar aos derivados Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} .

As temperaturas máximas para cada estágio de degradação obtidos através das curvas termogravimétricas do fármaco, quitosana e derivados de quitosana associados com fármaco estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de intervalos de temperatura (ΔT), perda de massa (P_m) e temperatura máxima ($T_{M\acute{a}x}$) de decomposição do fármaco, quitosana e seus derivados associados com fármaco.

Produtos	ΔT (°C)	P_m (%)	$T_{M\acute{a}x}$ (°C)
CFZ	31 – 117	12,2	70,9
	215 – 305	16,0	255
	326 – 995	38,5	874
Q_{CFZ}	26 - 144	10,9	56
	223 - 983	60,6	296
Q_{acCFZ}	36 – 103	2,4	60
	218 - 925	71,3	331
$Q_{acenCFZ}$	30 - 207	11,2	55
	210 - 988	55,5	293
$Q_{acdienCFZ}$	32 - 218	12,6	54
	248 - 985	49,7	297

Fonte: autoria própria (2017).

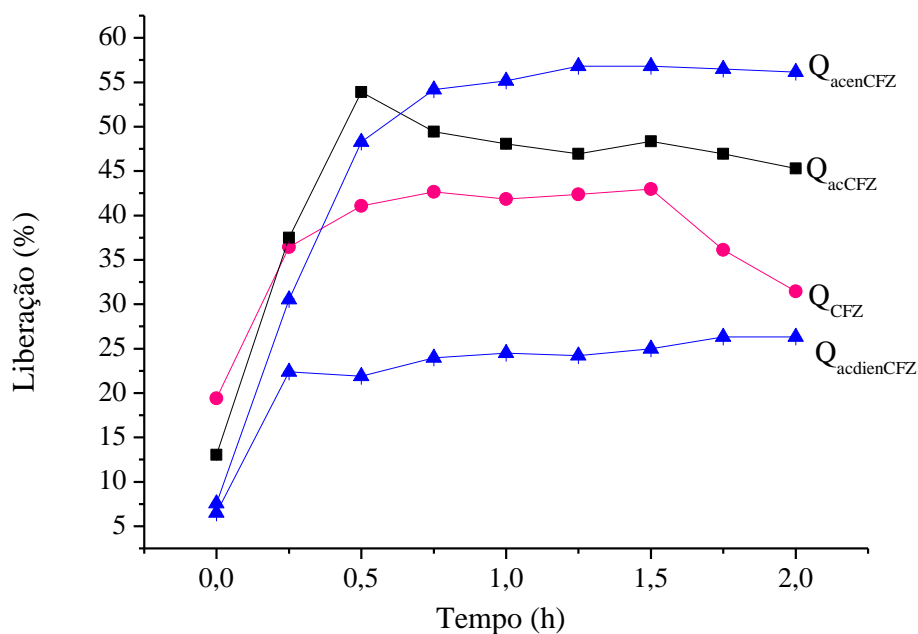
Os derivados de quitosana obtidos após modificação com acetilacetona e posterior reação com aminas apresentaram um perfil de degradação térmica muito similar ao desses materiais associados com fármaco.

A quitosana associada com fármaco Q_{CFZ} apresentou maior estabilidade térmica do que a quitosana, mudando os valores das temperaturas de decomposição desse material.

5.6 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da ceftazidima

O perfil de liberação da ceftazidima em meio ácido que simula a condição gástrica está ilustrado na Figura 26. A liberação *in vitro* da ceftazidima apresentou um efeito de liberação inicial, o que pode ser devido à presença de algumas partículas de fármaco na superfície do material.

Figura 26. Curvas da liberação *in vitro* da ceftazidima, a partir de quitosana e derivados de quitosana associados com fármaco em meio de liberação de solução salina tampão fosfato (pH= 1,2).



Fonte: autoria própria (2017).

Neste caso, verifica-se que a percentagem de fármaco libertada nos primeiros 30 minutos, a partir dos materiais, é de cerca de 53%, 48%, 41% e 22% para Q_{ac}enCFZ, Q_{ac}CFZ, Q_{CFZ} e Q_{ac}dienCFZ respectivamente.

Avaliando os resultados, verificou-se que Q_{ac}enCFZ apresentou uma maior liberação da ceftazidima, 53% nos 30 minutos iniciais, e manteve a liberação praticamente constante por 2h. Essa quantidade inicial do fármaco resulta de uma liberação imediata que é designada com “*burst effect*” e que foi explicada por LOPES et al. (2005) como sendo motivada ou pela liberação do fármaco existente à superfície do

sistema ou por alterações que se verificam na estrutura do sistema com consequente liberação imediata do fármaco seguido de liberação mais lenta.

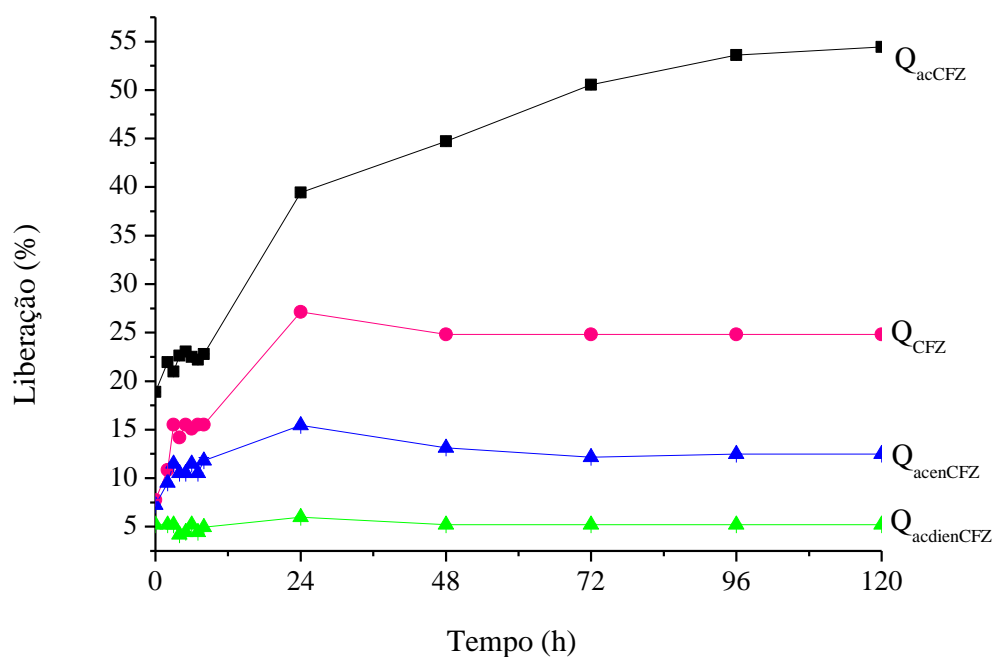
A maior protonação do $Q_{\text{acdienCFZ}}$ em meio ácido devido ao aumento do número de grupos NH_2 presentes na sua estrutura torna-o mais hidrofílico, promovendo um maior intumescimento da matriz que leva a uma camada externa mais gelificada do que Q_{CFZ} (hidrofílica) e funciona como uma barreira para liberação do fármaco (MARTÍNEZ RUVALCABA et al., 2009). Essa camada, que gradualmente se desintegra por erosão, controla o influxo de água e acarreta a liberação do fármaco de forma mais gradual.

As características do derivado hidrofílico $Q_{\text{acdienCFZ}}$ estão correlacionadas com a sua capacidade de responder à presença de água e formação de uma camada de gel fatores estes essenciais para controlar a liberação destas matrizes (SETHI et al., 2013; LOPES et al., 2005; HOFFMAN, 2002).

O Q_{acCFZ} por apresentar caráter hidrofóbico tem uma maior dificuldade de interagir com as moléculas de água para obstruir a dissolução do ceftazidima resultando em libertações mais lentas de ceftazidima quando comparada com $Q_{\text{acdienCFZ}}$ com mais grupos hidrofílicos, mas apresenta um maior percentual de liberação do fármaco quando comparada com Q_{CFZ} que se solubiliza neste pH.

O perfil de liberação em meio básico que simula a condição intestinal está ilustrado na Figura 27.

Figura 27. Curvas da liberação *in vitro* da ceftazidima, a partir de quitosana e derivados de quitosana associados com fármaco, num meio de liberação de solução salina tampão fosfato (pH= 7,4).



Fonte: autoria própria (2017).

Para as amostras $Q_{acdienCFZ}$, $Q_{acenCFZ}$ e Q_{CFZ} as taxas de liberação na Figura 27 mantiveram-se praticamente constantes, atingindo 5,3%, 11,2% e 15,5%, respectivamente, durante todo o ensaio em tampão pH 7,4, o que pode ser atribuído à formação de uma estrutura mais compacta e de elevada densidade de reticulação que deve restringir a entrada de líquido e, conseqüentemente, reduzir a capacidade de difusão do fármaco para o meio de dissolução, promovendo maior controle da liberação, como também pela desintegração do fármaco com o tempo de contato na solução.

No pH 7,4 praticamente a metade dos grupos amino da quitosana e dos derivados $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ estariam desprotonados, reduzindo dessa forma o percentual de liberação dos mesmos, enquanto que o Q_{acCFZ} estaria praticamente ionizado, afetando as propriedades de intumescimento e aumentando o percentual de liberação do fármaco.

Pequenas variações na quantidade de fármaco adsorvidas podem induzir a grandes diferenças no perfil de liberação do fármaco (SCHAFFAZICK et al., 2003).

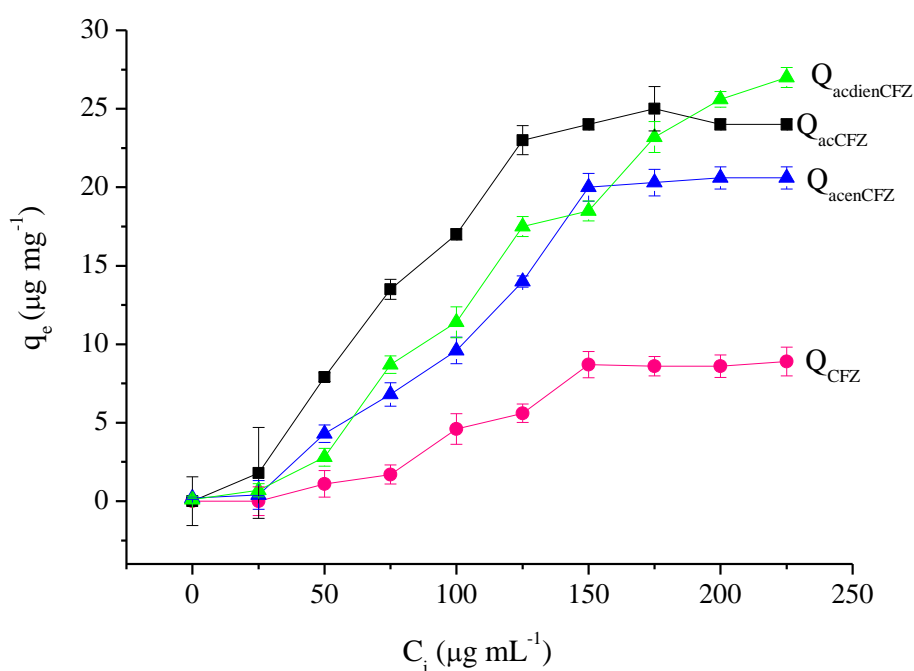
Este fato foi evidenciado com os resultados da capacidade máxima de adsorção obtida pelo derivado Q_{acdien} ($25,6 \mu\text{g mg}^{-1}$) e pela quitosana (Q) ($8,6 \mu\text{g mg}^{-1}$) e quando avaliado o perfil de liberação dos mesmos podemos observar nas Figuras 26 e 27 que $Q_{\text{acdienCFZ}}$ apresentou um menor percentual de liberação do fármaco.

Por terem sido identificadas como substâncias atóxicas e biodegradáveis, a utilização da quitosana e dos derivados como veículo para a liberação controlada de fármaco reúnem condições e características necessárias para administração do fármaco reduzindo a frequência de ingestão da droga e mostrando boa resistência ao ataque ácido.

5.7 Capacidade máxima de adsorção da quitosana e derivados

A capacidade máxima de adsorção da quitosana e dos derivados associados com o ceftazidima é a razão entre a quantidade adsorvida e remanescente em solução, a uma temperatura fixa no equilíbrio. Podemos observar na Figura 28 que todos os derivados modificados adsorveram uma quantidade de fármaco maior do que a quitosana.

Figura 28. Capacidade máxima de adsorção da quitosana e dos derivados de quitosana em diferentes concentrações do fármaco.



Fonte: autoria própria (2017).

Estes resultados mostram que a pequena quantidade de fármaco adsorvida pelos materiais sejam uma das causas que dificultou a identificação da ceftazidima pela técnica de infravermelho.

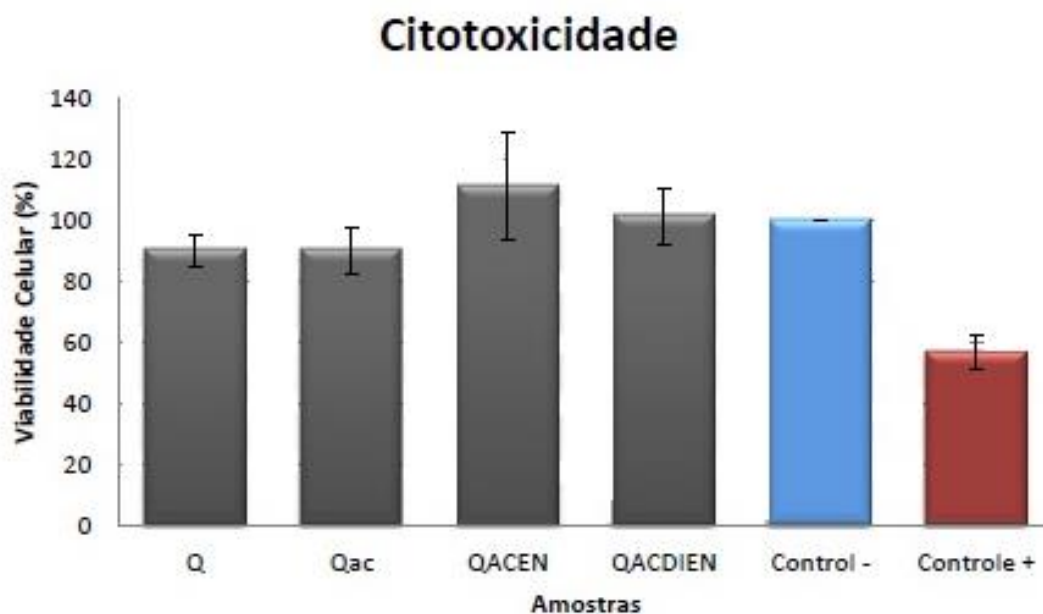
5.8 Estudo da Citotoxicidade da quitosana e derivados

Para avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* da quitosana e seus derivados Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} foi utilizado o ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

As células GM07492A (Fibroblasto Humano) em meio de cultura Dulbecco Mem (DMEM) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na penúltima coluna (CN = controle negativo).

As quatro primeiras colunas na Figura 29 expressam os resultados de viabilidade da quitosana (Q) e dos derivados Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} . O valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50% (BISPO, 2009). Portanto, os valores obtidos neste teste revelam que os materiais em estudo são considerados compatíveis para uso como biomateriais, podendo-se, a partir dos resultados, inferir que a quitosana e os derivados produzidos mostram-se promissores para serem testados em ensaios *in vivo*.

Figura 29. Efeito das amostras de quitosana (Q), Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien} sobre a viabilidade de GM07492A (fibroblastos humanos), após 24 h pelo ensaio de redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT).



Fonte: autoria própria (2017).

Observa-se em geral, que as modificações químicas realizadas na quitosana com acetilacetona e grupos aminas não tornaram os derivados tóxicos em relação a quitosana, uma vez que a viabilidade celular obtida para as amostras não apresentou variações significativas em relação ao grupo controle positivo (+). As amostras não exibiram diferença significativa em relação ao controle, entretanto, os resultados demonstraram que as mesmas mostraram toxicidade para as células de fibroblasto Humano.

Os resultados demonstram que a quitosana e os derivados obtidos, são compatíveis com células fibroblásticas, indicando que estes podem ser utilizados como biomateriais.

5.9 Avaliação da Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana da quitosana '*in vitro*' é dependente de muitos fatores intrínsecos e extrínsecos, diretamente relacionados ao peso molecular, grau de desacetilação, viscosidade, solventes e concentração ou com fatores abióticos como a estirpe microbiana em questão e seu estado fisiológico, o meio de cultura, pH, temperatura, força iônica e presença de íons metálicos (TAVARIA et al., 2013).

A atividade antibacteriana dos diferentes derivados de quitosana pode ser influenciada pela sua hidrofiliabilidade, densidade de carga positiva e estabilidade térmica dos materiais (MALHOTRA et al., 2015; LAGO et al., 2014).

A presença de água é necessária para que os agentes antimicrobianos exerçam sua atividade, visto que amostras secas são incapazes de liberar a energia armazenada nas ligações químicas para iniciar a interação. As características de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade estão relacionadas ao ambiente de água onde a quitosana desempenhará sua atividade antimicrobiana, o que limita seu uso devido sua baixa solubilidade em água (GOMES et al., 2014; DUTTA et al., 2009; DUTTA et al., 2004).

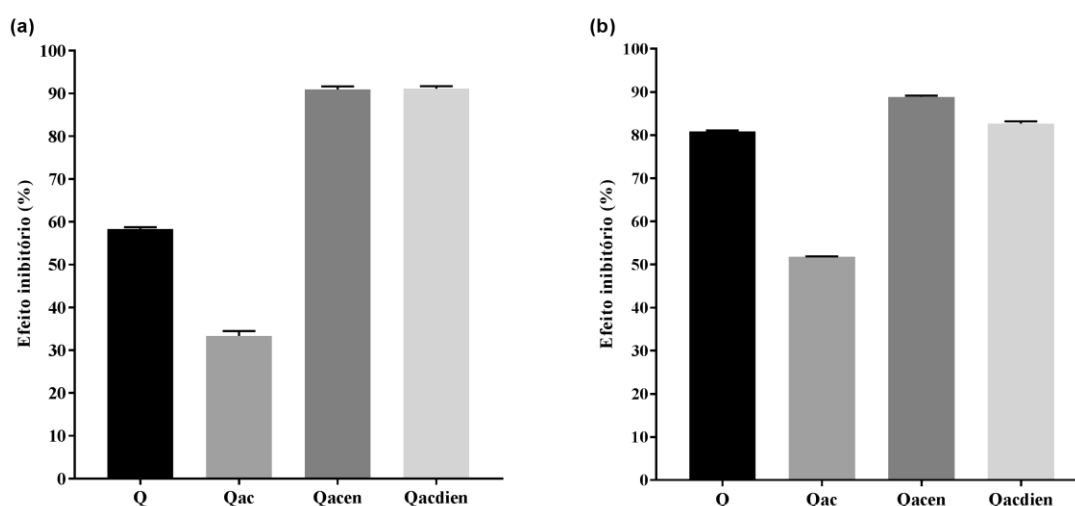
O coeficiente de partição (Log P) indica a natureza hidrofóbica do composto, e esta propriedade indicativa de hidrofobicidade está claramente correlacionada com a atividade biológica do composto (TAVARES, 2004). Essa grandeza é considerada parâmetro informativo da tendência da substância uma vez que, no organismo humano, distribue-se entre as estruturas apolares (membranas celulares, por exemplo) e as soluções aquosas (plasma sanguíneo, linfa, fluidos intracelulares). Os valores são

usualmente tabelados como Log P. Quanto menor log P, mais hidrofílico é composto (COSTANZO, 2014).

Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana da quitosana (Q) e seus respectivos derivados (Q_{ac} , Q_{acen} e Q_{acdien}) são apresentados na Figura 30.

Pode-se verificar que a modificação da quitosana (Q) com acetilacetona (Q_{ac}) provocou uma redução na atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Por outro lado, as modificações subsequentes da Q_{ac} com etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) melhoraram a atividade antibacteriana dos derivados *contra S.aureus*. O derivado Q_{ac} apresenta uma menor hidrofiliicidade conforme os dados apresentados na Tabela 6, conferida pela presença do grupamento cetona, o que dificulta as interações deste derivado com os resíduos aniônicos dos componentes hidrofílicos da parede celular de bactérias Gram-positivas, tais como peptídeoglicano e ácidos teicóicos (BROWN et al., 2012; KONG et al., 2010).

Figura 30. Efeito inibitório da quitosana (Q) e derivados modificados com acetilacetona (Q_{ac}), etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) contra *Staphylococcus aureus* após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 $\mu\text{g/mL}$, pH 2,3).



Fonte: autoria própria (2017).

A melhor atividade antibacteriana dos derivados de Q_{ac} com etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) *contra S. aureus* está relacionado ao aumento no número de grupos amins nas moléculas inseridas e a formação das ligações iminas

formadas nos derivados. Este fato está corroborando com os resultados da Análise Elementar mostrado na Tabela 1, onde foi observado que a introdução dos grupos etilenodiamina e dietilenotriamina conduziu o aumento na quantidade de nitrogênio nos materiais em relação ao material de partida.

Além disto, as modificações obtidas em Q_{acn} e Q_{acdien} resultaram em uma maior hidrofiliabilidade destes derivados conferidos pelo coeficiente de partição (LogP) calculados na Tabela 6, os quais favorece uma maior interação entre os novos derivados e os componentes da parede celular (NG et al., 2014; LI et al., 2011; LI et al., 2010).

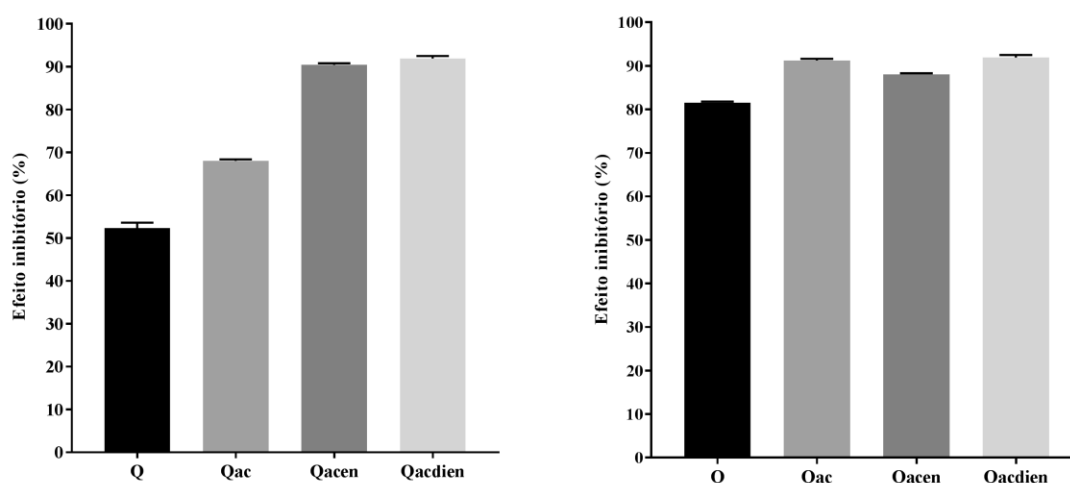
Tabela 6. Coeficiente de partição (logP) da quitosana e dos derivados Q_{ac} , Q_{acn} e Q_{acdien} .

	Q	Q_{acdien}	Q_{acn}	Q_{ac}
Log P	-1,51	-0,64	-0,49	-0,35

Fonte: autoria própria (2017).

Ao contrário dos resultados obtidos com a cepa Gram-positiva, a modificação da quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) aumentou a atividade antibacteriana contra *E. coli* (Figura 29). Bactérias Gram negativas tais como *E. coli* apresentam uma parede celular formada por uma camada basal de peptídeoglicano e uma membrana externa rica em componentes hidrofóbicos, tais como fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (JUNG et al., 2007). A maior atividade de Q_{ac} contra *E. coli* pode estar relacionada com o caráter menos hidrofílico deste derivado conforme mostra a Tabela 6, o que favorece uma maior interação com os componentes da membrana externa (GOY et al, 2016; KONG et al., 2010).

Figura 31. Efeito inibitório da quitosana (Q) e derivados modificados com acetilacetona (Q_{ac}), etilenodiamina (Q_{acen}) e dietilenotriamina (Q_{acdien}) contra *E. coli* após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 $\mu\text{g/mL}$, 48 h, pH = 2,3).



Fonte: autoria própria (2017).

Os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} também apresentaram uma boa atividade contra *E. coli*, indicando que a ação destes novos materiais é de amplo espectro sendo, portanto, capazes de inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Este resultado mostra que a introdução dos grupos catiônicos e das ligações iminas aumentou a capacidade de interação destes materiais com os componentes da parede celular de ambos os tipos de bactérias.

Os dados apresentados na Figura 31 evidenciam que o efeito inibitório tanto da quitosana, quanto dos polímeros modificados, se altera em razão do tempo de preparação da solução teste. No caso da Q e da Q_{acen} , o efeito inibitório máximo foi verificado para a solução com 72 horas de preparação, enquanto que para os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} , o efeito inibitório máximo foi obtido com as soluções com 48 horas de preparação. Portanto, as modificações propostas em Q_{acen} e Q_{acdien} não apenas aumentaram a eficácia dos derivados contra *S. aureus*, como também reduziram o tempo necessário para obtenção do efeito inibitório máximo.

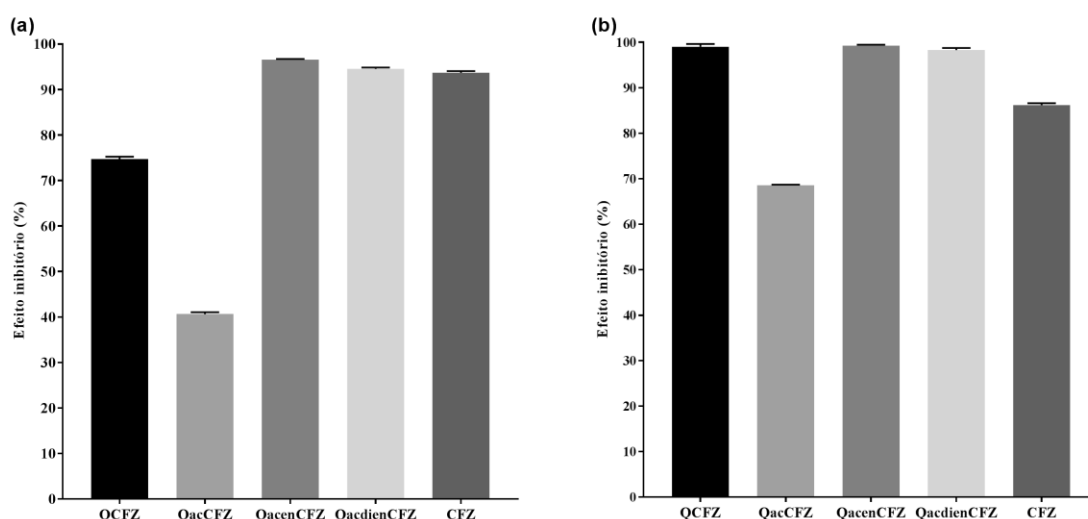
Como não existe um mecanismo exato de ação da atividade antibacteriana da quitosana e seus derivados, especula-se que ocorra uma interação eletrostática entre as moléculas da quitosana e de seus derivados carregados positivamente e a membrana celular da bactéria carregada negativamente. A interação é mediada pelas forças

eletrostáticas entre o grupo NH_2 dos derivados de quitosana e a superfície da célula carregada negativamente (LI et al., 2015).

Luo e colaboradores, em seus estudos, reforçam que os grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana poderiam se ligar às proteínas microbianas presentes na membrana externa fazendo com que a quitosana forme uma camada impermeável em torno da célula bacteriana. Esta camada impermeável bloqueia os canais da célula evitando a entrada de nutrientes desestabilizando a parede celular (LUO et al., 2012).

Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana contra *S. aureus* das soluções testes da quitosana, da ceftazidima (CFZ) e dos derivados de quitosana associados com fármaco no período estudado são apresentados nas Figura 32.

Figura 32. Efeito inibitório da ceftazidima (CFZ), quitosana (Q) e dos derivados associados com fármaco Q_{acCFZ} , $\text{Q}_{\text{acenCFZ}}$ e $\text{Q}_{\text{acdienCFZ}}$ contra *Staphylococcus aureus* após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 $\mu\text{g/mL}$, $\text{pH} = 2,3$).



Fonte: autoria própria (2017).

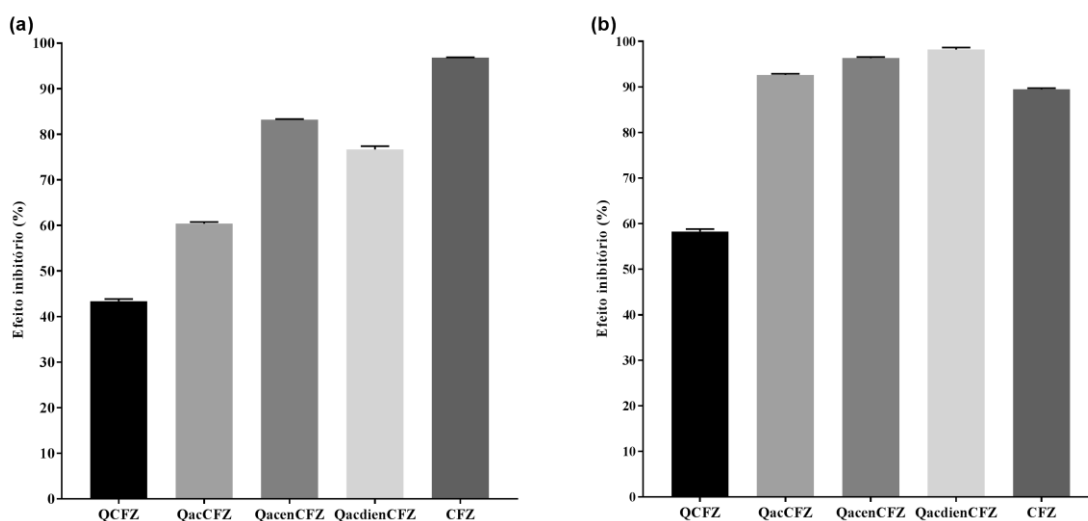
A maior atividade antibacteriana de $\text{Q}_{\text{acenCFZ}}$, $\text{Q}_{\text{acdienCFZ}}$ contra a cepa de *Staphylococcus aureus* quando comparada com *Escherichia coli* (Figura 31) está relacionada tanto com o aumento da densidade de carga positiva dos materiais obtidos, quanto com a associação com a ceftazidima e as diferenças na composição da parede celular de ambas as bactérias, como também com a melhor estabilidade térmica desses materiais. Estes resultados corroboram com os da análise termogravimétrica (TG) ver Figura 22, uma vez que estes derivados demonstraram uma estabilidade térmica

satisfatória e semelhante a quitosana e dessa forma os mesmos possuem potencial utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos.

É interessante destacar que a solução de CFZ isolada apresentou uma excelente atividade contra *S. aureus* e *E.coli* no primeiro dia do seu preparo, no entanto, após 48h, esta solução foi perdendo gradativamente a sua atividade, indicando uma possível degradação do fármaco em solução. Por outro lado, a associação Q_{CFZ} contra cepa *S. aureus* preservou a estabilidade do fármaco resultando em uma excelente atividade deste material em 72h do preparo da solução, o que provavelmente está relacionado com uma liberação gradativa da CFZ adsorvida na matriz polimérica o que não ocorreu contra cepa de *E.coli*.

A menor efetividade da atividade antibacteriana do fármaco CFZ com o tempo pode estar relacionada à degradação do mesmo, uma vez que as cefalosporinas se degradam em meio ácido ou alcalino com a ruptura do anel β -lactâmico (MORENO; SALGADO, 2012).

Figura 33. Efeito inibitório da ceftazidima (CFZ), quitosana (Q) e dos derivados associados com fármaco Q_{ac}CFZ, Q_{acen}CFZ e Q_{acdien}CFZ contra *Escherichia coli* após (a) 48 h e (b) 72 h de preparo da solução (1000 μ g/mL, pH = 2,3).



Fonte: autoria própria (2017).

Os derivados obtidos após modificação da quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) e reações subsequentes com etilenodiamina e dietilenodiamina associados com ceftazidima Q_{acen}CFZ, Q_{acdien}CFZ apresentam uma maior densidade de carga positiva pela presença do fármaco e dos grupos aminas inseridos quando comparados com Q_{ac}. Esse

aumento na densidade de carga positiva ocasionou uma maior interação dos grupos aminos protonados presentes na estrutura dos derivados com os grupos fosfatos carregados negativamente presentes nos ácidos teicóicos e lipoteicóicos na parede celular da cepa de *S. aureus*. Além disto, a liberação da CFZ a partir da matriz polimérica dos derivados provavelmente resultou na difusão deste fármaco através das camadas de peptidoglicano, permitindo que o antibiótico liberado pudesse inibir a síntese de novas camadas de peptidoglicano, levando à lise das bactérias (CAMPBELL et al., 2010).

Observa-se que o efeito inibitório da Q_{acCFZ} contra *E. coli* foi maior do que aquele obtido para a cepa Gram-positiva, o que pode também estar relacionado com as diferenças na composição da parede celular das cepas estudadas e com o caráter hidrofóbico do derivado.

A parede celular de bactérias gram-positivas é composta de muitas camadas de peptidoglicano e dessa forma a CFZ liberada pode penetrar mais facilmente através da camada de peptidoglicano e atuar diretamente sobre a membrana celular, inibindo a síntese de novas camadas. A parede celular das bactérias Gram negativas é constituída por uma fina camada interna de peptidoglicano e uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeo, lipoproteína e fosfolípidos. A membrana externa atua como uma barreira contra moléculas estranhas, o que provavelmente tenha ocasionado uma menor atividade antibacteriana da quitosana associada com ceftazidima (Q_{CFZ}) quando testada contra cepas de *E. coli*.

Os ensaios microbiológicos de $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$, Q_{acCFZ} e Q_{CFZ} mostraram que um maior tempo de contato dos materiais associados com fármaco em solução potencializou a ação bacteriana dos mesmos. Percebe-se na Figura 28 que a pequena quantidade de fármaco adsorvida pelos materiais foram suficientes para potencializar o espectro de ação dos mesmos contra ambas as bactérias quando comparado com o fármaco sozinho.

Os materiais Q_{ac} e Q_{acCFZ} com maior estabilidade térmica e coeficiente de partição (Log P) quando comparados com os demais apresentaram uma melhor atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli* do que contra cepa de *S. aureus*. A quitosana os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} com menor estabilidade térmica e coeficiente de partição (log P) e os materiais associados com fármaco Q_{CFZ} , $Q_{acenCFZ}$ e $Q_{acdienCFZ}$ com

estabilidade térmica semelhantes à quitosana apresentaram melhor atividade antibacteriana contra ambas as bactérias testadas.

O melhor potencial antibacteriano dos materiais associados com fármaco contra ambas as cepas *S. aureus* e *E. coli* Figuras 32 e 33 está corroborando com os ensaios de liberação apresentados nas Figuras 26 e 27. Pode-se observar que os materiais com baixo perfil de liberação nos pHs testados, apresentaram melhor efeito inibitório contra ambas as cepas quando comparados com o fármaco sozinho.

Estes resultados são promissores e sugerem que formas farmacêuticas compostas de Q_{acnCFZ} , $Q_{acdienCFZ}$, Q_{acCFZ} e Q_{CFZ} poderiam apresentar um melhor efeito terapêutico contra infecções bacterianas do que o uso da CFZ isolada, o que poderia ser melhor avaliada através de ensaios “*in vivo*”.

No geral, os resultados da atividade antibacteriana da quitosana e derivados tornam evidente o potencial antibacteriano dos derivados com base de Schiff e dele associado com fármaco sugerindo que os mesmos poderiam ter uma ampla aplicabilidade no desenvolvimento de novos materiais visando o controle de microrganismos.

6. CONCLUSÃO

A quitosana, os derivados de quitosana com base de Schiff e os derivados associados com fármaco foram devidamente caracterizados, apresentando evidências de que a modificação química na cadeia polimérica da quitosana foi efetuada.

Os resultados do infravermelho mostraram evidências na efetividade da modificação da quitosana com acetilacetona (Q_{ac}) e do derivado Q_{ac} com reações posteriores com etilenodiamina e dietilenotriamina e os derivados associados com fármaco pelo aparecimento e desaparecimento de bandas nos espectros obtidos.

As análises termogravimétricas mostraram que o derivado obtido com acetilacetona Q_{ac} apresentou uma maior estabilidade térmica quando comparada com a quitosana. Os derivados Q_{acen} e Q_{acdien} apresentaram estabilidade térmica semelhante à quitosana.

Variações nos picos no espectro de DRX dos derivados de quitosana e dos derivados associados com fármaco mostraram que a incorporação de novos grupos funcionais na cadeia polimérica da quitosana e dos derivados provocou mudanças na cristalinidade dos novos materiais obtidos quando comparada com a quitosana.

Os resultados obtidos no perfil de liberação de $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$ e Q_{CFZ} mostraram que no meio básico a liberação do fármaco ocorreu de maneira gradual, sendo que o maior percentual de liberação do fármaco aconteceu em meio ácido após 30 min para os materiais $Q_{acenCFZ}$ e Q_{acCFZ} , o que os tornam candidatos promissores no tratamento de gastrite e úlcera gástrica.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que a modificação da quitosana com acetilacetona e posterior reação com etilenodiamina e dietilenotriamina revelam que os materiais em estudo são considerados compatíveis para uso como biomateriais, podendo-se, a partir dos resultados, inferir que a quitosana e os derivados produzidos mostram-se promissores para serem testados em ensaios *in vivo*.

Os resultados da atividade antibacteriana dos derivados de quitosana são promissores e sugerem que formas farmacêuticas compostas de $Q_{acenCFZ}$, $Q_{acdienCFZ}$, Q_{acCFZ} e Q_{CFZ} poderiam apresentar um melhor efeito terapêutico contra infecções bacterianas do que o uso da CFZ isolada, o que poderia ser melhor avaliada por meio de ensaios “*in vivo*”.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. B.; ZHOU, J. L.; NGO, H. H.; GUO, W. Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: progress and challenges. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 112-126, 2015.

AHMED A. T.; IBRAHIM, S. I.; AL-SAMAN, A.; MAHMOUD, A.; MOUSSA, S. H. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 69, p. 471–475, 2014.

AKCELRUD, L. Fundamentos da Ciência dos Polímeros. Barueri-SP: **Manole**, v. único. 2007. 288p.

AMARAL, I. F.; GRANJA, P. L.; BARBOSA, M. A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 16, n. 12, p. 1575-1593, 2005.

ANITHA, V. V.; DIVYA, A. R.; KRISHNA, V. S.; SELVAMURUGAN, S. V.; NAIR, H. 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.

ANUSHA, J. R & FLEMING, A. T. “Synthesis and Characterization of Chitosan Nanoaggregates from Gladius of *Uroteuthis duvauceli*,” **International Journal of Biomaterials**, v. 9, p. 1-9, 2016.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS, A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 14, p.308-330, 2010.

BASSETTI, M.; MARELLI, M.; TEMPERONI, C.; ASTILEAN, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 2013. Disponível em: <http://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-0711-12-22>. Acessado em: 02/01/2017.

BEKHEIT, M.M.; NAWAR, N., ADDISON, A.W. ABDEL-LATIF, D.A., MONIER, M. Preparation and characterization of chitosan-grafted-poly(2-amino-4,5-pentamethylene-thiophene-3-carboxylic acid N'-acryloyl-hydrazide) chelating resin for removal of Cu(II), Co(II) and Ni(II) metal ions from aqueous solutions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 558-565, 2011.

BENHABILES, M. S.; SALAH, R.; LOUNICI, H.; DROUICHE, N.; GOOSEN, M. F. A.; MAMERI, N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. **Food hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 48-56, 2012.

BROWN, S.; XIA, G.; LUHACHACK, L. G.; CAMPBELL, J.; MEREDITH, T. C.; CHEN, C.; WALKER, S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p.18909-18914, 2012.

CAMPANA-FILHO, S. P et al. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAMPBELL, J.; SINGH, A. K.; SANTA MARIA JR, J. P.; KIM, Y.; BROWN, S.; SWOBODA, J. G.; MYLONAKIS, E.; WILKINSON, B. J.; WALKER, S. Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. **ACS chemical biology**, v. 6, n. 1, p. 106-116, 2010.

CHOI, C.; NAM, J. P.; NAH, J. W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.33, p.1-10, 2016.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia** (**), 5ª ed., Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2014.

CRUZ, M.C.P. Influência do Poli(Etileno Glicol)(PEG) no Processo de Microencapsulação da Oxitetraciclina no Sistema Alginato/Quitosana: Modelamento “in vitro” da Liberação Oral. 143f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

DA SILVA FILHO, E. C., DE MELO, J. C., DA FONSECA, M. G., & AIROLDI, C. Cation removal using cellulose chemically modified by a Schiff base procedure applying green principles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, p. 8-15, 2009.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. **Journal of Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, J. Perspectives for chhitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173-1182, 2009.

DUTTA, P. K., DUTTA, J., TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 1, p. 20–31, 2004.

EL FRAY, M.; NIEMCZYK, A.; PABIN-SZAFKO, B. Chemical modification of chitosan with fatty acids. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives**, v.17, p.29-36, 2012.

ERDEM, B.; KARIPTAS, E.; KAYA, T.; TULUMOGLU, S., GORGULU, O. Factors influencing antibacterial activity of chitosan against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 5, n.5, p. 44-48, 2016.

FERNANDES, S. C. M.; FREIRE, C S. R; SILVESTRE, A. J. D.; PASCOAL NETO, C; GANDINI, A.; Novel materials based on chitosan and cellulose. **Society of Chemical Industry**, v. 60, p. 875–882, 2010.

FRANCO, R.A.; NGUYEN, T.H.; LEE, B.T. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p.2207–2218, 2011.

GAVALYAN, VASAK B. Synthesis and characterization of new chitosan-based Schiff base compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 145, p. 37–47, 2016.

GOLYSHEV, A.A.; MOSKALENKO, Y.E.; SKORIK, Y.A. Comparison of the acylation of chitosan with succinic anhydride in aqueous suspension and in solution. **Russ Chem Bull**, v. 64, p. 1168-1171, 2015.

GOLL, A. S & FARRIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do Uso inadequado de Antibióticos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 5, n.1, p. 69-72, 2013.

GOMES, H. C. A.; FIGUEREDO, E. A. T.; CARVALHO, J. D. G.; BRAGA, F. G., TEIXEIRA, G. S. M.; SILVA, L. M. R.; PEREIRA, E. C. Avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana em sorvete inoculado com *Listeria innocua*. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, 2014.

GONÇALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n.7, p.1215-1223, 2011.

GOULD, I. M. Antibiotic policies to control hospital-acquired infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n.4, p. 763-765, 2008.

GOY, C. R., MORAISB, T. B. S., ODILIO, B.G. Assisb Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on E. coli and S. aureus growth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 122–127, 2016.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A. Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v.38, p.43-74, 2004.

GUIMARAES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M, T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. Antifungal properties of Schiff bases of chitosan, N-substituted chitosan and quaternized chitosan. **Carbohydrate research**, v.342, n.10, p. 1329-1332, 2007.

HE, G et al. Preparation and properties of quaternary ammonium chitosan-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) superabsorbent hydrogels. **Reactive and Functional Polymers**, v. 111, p. 14-21, 2017.

HENNIG, E. L. Utilização de quitosana obtida de resíduos de camarão para avaliar a capacidade de adsorção de íons Fe^{+3} . **Dissertação de Mestrado**. Rio Grande-RS, 2009.

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for Biomedical Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.43, p.3-12, 2002.

HU, LIMING; SUN, YUN; WU, YAN. Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. **Nanoscale**, v.5, n.8, p. 3103-3111, 2013.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., NAIR, S. V., TOKURA, S., TAMURA, H., SELVAMURUGAN, N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v.55, n.7, p. 675-709, 2010.

JIAO, T. F.; ZHOU, J.; ZHOU, J.X.; GAO, L. H.; XING, Y. Y.; LI, X. H. Synthesis and characterization of chitosan-based Schiff base compounds with aromatic substituent groups. **Iranian Polymer Journal**, v. 20, n. 2, p. 123-136, 2011.

JUCKER, B. A.; HARMS, H.; HUG, S. J.; ZEHNDER, A. J. B. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.9, p. 331-343, 1997.

JUNG, J. E.; YOUN, D. K.; LEE, H. S.; NO, K. H.; HÁ, G. J.; PRINYAWIWATKU, W. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 676–682, 2010.

KADOSAKI, L. L.I; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 93, n. 2, p. 128-135, 2012.

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, n.1, p.51–63, 2010.

KUMAR, M. N. A Review of Chitin and Chitosan Applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, n.1, p.1-27, 2000.

KUMAR, R & RAVIKANT. Review on Synthesis and Application of Schiff base and its transition metal complexes. **Research Journal of Chemical and Environmental Sciences**, v.2, n.2, p. 01-04, 2014.

KURITA, K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v.8 n.3, p.203-226, 2006.

KYZAS, G. Z & BIKIARIS, D. N. Recent modifications of chitosan for adsorption applications: A critical and systematic review. **Marine drugs**, v.13, n.1, p.312-337, 2015.

LAGO, M.A et al. Preparation and Characterization of Antimicrobial Films Based on Chitosan for Active Food Packaging Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, p. 2932-2941, 2014.

LI, PENG et al. A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability. **Nature Materials**, v.10, n. 2, p. 149–156, 2011.

LI, X.-F.; FENG, X.-Q.; YANG, S. A mechanism of antibacterial activity of chitosan against Gram-negative bacteria. **Chinese Journal of Polymer Science**, v.31, n.13, p.148-153, 2010.

Li, Y.; ZHANG, S.; MENG, X.; CHEN, X., REN, G. The preparation and characterization of a novel amphiphilic oleoyl-carboxymethyl chitosan self-assembled nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**. v.83, p. 130-136, 2011.

LI, Z.; YANG, F.; YANG, R. Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 378–387, 2015.

LOPES, M. C.; LOBO, J., M., S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

LUCENA, G. L.; SILVA, A. G.; HONÓRIO, L. M. C.; SANTOS, V. D. Avaliação da Capacidade de Adsorção da Quitosana Quaternizada na Remoção de Íons Cu^{2+} e Cr^{3+} . **Revista Virtual Química**, v.7, n. 6, p. 2166-2179, 2015.

LUO, Y., ZHANG, B., CHENG, W.-H., WANG, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Journal of Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 942-951, 2010.

LUO, Z.; WU, Q.; ZHANG, M. The Synergistic Antibacterial Effects of Water Soluble N-succinyl-chitosan with Ceftriaxone against Escherichia coli. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, n.9, p. 848-852, 2012.

MACHADO, M. O.; LOPES, E. C.N.; SOUSA, K.S.; AIROLDI, C. The effectiveness of the protected amino group on crosslinked chitosans for copper removal and the thermodynamics of interaction at the solid/liquid interface. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n.4, p. 760-766, 2009.

MAHMOUDZADEH, M.; FASSIHI, A.; EMAMI, J.; DAVIES, N.M.; DORKOOSH, F. Physicochemical, pharmaceutical and biological approaches toward designing optimized and efficient hydrophobically modified chitosan-based polymeric micelles as

a nanocarrier system for targeted delivery of anticancer drugs. **Journal of Drug Targeting**, v.21, p. 693–709, 2013.

MALHOTRA, B.; KESHWANI, A.; KHARKWAL, H. Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-9, 2015.

MARTINS, G.S.; MANGIAVACCHI, B. M.; BORGES, F.V.; LIMA, N.B. Uso indiscriminado de antibióticos pela População de São José do Calçado (Es) e o perigo das superbactérias. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v, 6, n.2, p. 84-96, 2015.

MARTINS, A. F.; BUENO, P. V.; ALMEIDA, E. A.; RODRIGUES, F. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International journal of biological macromolecules**, v.57, p.174-184, 2013.

MARTINS, A. F.; PEREIRA, A. G.; FAJARDO, A. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Characterization of polyelectrolytes complexes based on N, N, N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions. **Carbohydrate polymers**, v. 86, n. 3, p. 1266-1272, 2011.

MARTINEZ-RUVALCABA, A. et al. Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid/chitosan hydrogels. **Express Polym Lett**, v. 3, n. 1, p. 25-32, 2009.

MELAKE, N. A.; MAHMOUD, H. A.; AL-SEMARY, M. T. Bactericidal activity of various antibiotics versus tetracycline-loaded chitosan microspheres against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 25, p. 5387-5398, 2012.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENG, X.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; LI, K.; QIN, Y.; LI, P. Molecular weight and pH effects of aminoethyl modified chitosan on antibacterial activity in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 918 - 24, 2012.

MOHAMED, N. A.; SABAA, M. W.; EL-GHANDOUR, A. H.; ABDEL-AZIZ, M. M.; ABDEL-GAWAD, O. F. Quaternized N-substituted carboxymethyl chitosan derivatives as antimicrobial agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 156-164, 2013.

MOHAMED, R. R & FEKRY, A. M. Antimicrobial and anticorrosive activity of adsorbents based on chitosan Schiff base. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 2488–2508, 2011.

MORENO, A. H & SALGADO, H. R. N. Development and Validation of the Quantitative Analysis of Cefotaxime in Powder for Injection by Infrared Spectroscopy. **Physical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2012.

MOURYA, V. K.; INAMDARA, N. N.; TIWARIB, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Advanced Materials Letters**, v.1, n.1, p. 11-33, 2010.

MU, H.; ZHANG, A.; ZHANG, L.; NIU, H.; DUAN, J. Inhibitory effects of chitosan in combination with antibiotics on *Listeria monocytogenes* biofilm. **Food Control**, v. 38, p. 215-220, 2014.

MUZZARELLI, R. A. A & MUZZARELLI, C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 151–209, 2005.

NG, V. W. L et al. Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 46–62, 2014.

ODONKTOR, S.T & ADDO, K.K. Bacteria Resistance to Antibiotics: Recent Trends and Challenges. **International Journal of Biological & Medical Research**, v.2, n.4, p. 1204-1210, 2011.

OLIVEIRA, K. R & MUNARETTO, P. Uso racional de antibióticos: Responsabilidade de Prescritores, Usuários e Dispensadores. **Revista Contexto & Saúde**, v. 9, n. 18, p. 43-51, 2010.

PARK, J. H.; SARAVANAKUMAR, G. K.; KWANGMEYUNG, K.; ICK, C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 28-41, 2010.

PARK, J. K.; CHUNG, M. J.; CHOI, H. N.; PARK, Y. II. Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 266–277, 2011.

QIN, C. Q.; LI, H.R.; XIAO, Q.; LIU, Y.; ZHU, J.C.; DU, Y. M. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 367-374, 2006.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

REGE, P. R.; GARMISE, R. J., BLOCK, L. H. Spray-dried chitinosans Part I: preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252 p. 41–51, 2003.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

RORRER, G. L.; HSIEN, T. Y.; WAY, J. D. Synthesis of porous magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from wastewater. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 9, p. 2170–8, 1993.

SAJOMSANG, W.; TANTAYANON, S.; TANGPASUTHADOL, V.; DALY, W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 18, p. 2502-2511, 2009.

SALAMA, H. E.; SAAD, G. R.; SABAA, M. W. Synthesis, characterization and biological activity of Schiff bases based on chitosan and arylpyrazole moiety. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 996-1003, 2015.

SANTO, C. E.; QUARANTA, D.; GRASS, G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. **Microbiology Open**, v.1, n.1, p.46-52, 2012.

SANTOS, J. E; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Synthesis and Characterization of Schiff Bases From Chitosan and salicylaldehyde derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 277–282, 2005.

SASHIKALA, S & SHAFI, S. S. Synthesis, Characterization and Antimicrobial activity of chitosan 4-chlorobenzaldehyde Schiff base. **Research Journal of Chemical Sciences**, v. 5, n. 9, p. 27-33, 2015.

SASHIKALA, S & SHAFI, S. S. Synthesis and characterization of chitosan Schiff base derivatives. **Der Pharmacia Lettre**, v. 6, n. 2, p. 90-97, 2014.

SASHIWA, H., & AIBA, S. Chemical modification chitin and chitosan as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 887–908, 2004.

SETHI R. K.; BARIK B. B.; SAHOO, S. K. “Preparation and Determination of Drug-Polymer Interaction and In-vitro Release of Didanosine Microspheres made of Cellulose Acetate Phthalate or Ethyl cellulose Polymers”. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, n. 2, p.341-353, 2013.

SINGH, AKHILESH V. Biopolymers in drug delivery: A review. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 666-674, 2011.

SOLIMAN, E. A.; EL-KOUSY, S. M.; ABD-ELBARY, H. M.; ABOU-ZEID, A. R. Low molecular weight chitosan-based Schiff bases: synthesis, characterization and antimicrobial activity. **American Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 17–30, 2013.

SONG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, J.; DING, C. Synthesis and Property Studies of N - Carboxymethyl Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 1, p. 3282–3285, 2012.

SUPPER, S.; ANTON, N.; SEIDEL, N.; RIEMENSCHNITTER, M.; CURDY, C.; VANDAMME, T. Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, p. 249–267, 2014.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I.; SAWAI, J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 485-491, 2008.

TAVARES, L. C. QSAR: A ABORDAGEM DE HANSCH. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013.

TIN, S.; LIM, C. S.; SAKHARKAR, M. K.; SAKHARKAR, K. R. Synergistic Combinations of Chitosans and Antibiotics in Staphylococcus aureus. **Letters in Drug Design & Discover**, v. 7, p. 31-35, 2010.

TIN, S.; SAKHARKAR, K. R.; LIM, C. S.; SAKHARKAR, M. K. Activity of chitosans in combinations with antibiotics in Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 153-160, 2009.

The Merk Index. **An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 14th ed. New York: Merck Co; 2006.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, P.K. Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications. **Polymers**, v. 93, p. 1–7, 2008.

UPADHYAYA, L.; SINGH, J.; AGARWAL, V.; TEWARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate polymers**, v.91, n.1, p. 452-466, 2013.

UYGUN, A.; KIRISTI, M.; OKSUZ, L.; MANOLACHE, S.; ULUSOY, S. R. F hydrazine plasma modification of chitosan for antibacterial activity and nanofiber applications. **Journal of Carbohydrate Research**, v. 346, p. 259-265, 2011.

VINSOVA, J.; VAVRÍKOVA, E. Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities – a Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3596-3607, 2011.

VINSOVA, J.; VAVRÍKOVA, E. Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosan . **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 1311-1326, 2008.

WU, Q. X.; LIN, D. Q.; YAO, S. J. Design of Chitosan and Its Water Soluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes. **Marine Drugs**, v. 12, p. 6236-6253, 2014.

YALINCA, Z.; YILMAZ, E.; TANERI, B.; BULLICI, F, T. A comparative study on antibacterial activities of chitosan based products and their combinations with gentamicin against *S. epidermidis* and *E. coli*. **Polymer Bulletin**, v. 70, n. 12, p. 3407–3423, 2013.

YANG, T. C.; CHOU, C. C.; LI, C. F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 237-245, 2005.

YIN, X.; CHEN, J.; YUAN, W.; LIN, Q.; JI, L.; LIU, F. Preparation and antibacterial activity of Schiff bases from O-carboxymethyl chitosan and para-substituted benzaldehydes. **Polymer Bulletin**, v. 68, p. 1215-1226, 2012.

ZAKHEM, E.; RAGHAVAN, S.; BITAR, K.N. Neo-innervation of a bioengineered intestinal smooth muscle construct around chitosan scaffold. **Biomaterials**, v.35, p. 1882–1889, 2014.

ZOU, P.; YANG, X.; WANG, J.; LI, Y.; YU, H.; ZHANG, Y.; LIU, G. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1174-1181, 2016.

Anexo



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 11:22 horas do dia 15/12/2014, sob o número de Protocolo do INPI: 000110 o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado “**PROCESSO PARA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA AUSÊNCIA DE SOLVENTE PARA OBTENÇÃO DE DERIVADOS ANTIBACTERIANOS**”, com o número **BR 10 2014 032178 0** desenvolvido pelos inventores:

EDSON CAVALCANTI DA SILVA FILHO

HUMBERTO MEDEIROS BARRETO

LUIZÂNGELA REIS OZÓRIO

Teresina, 21 de junho de 2016.

Prof. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia