



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA**  
**DOS MATERIAIS**

**QUITOSANA QUIMICAMENTE MODIFICADA PARA A FORMAÇÃO DE NOVAS  
BASES DE SCHIFF E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

**Janete Martins Sousa**

**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**Teresina - Piauí**

**2017**

**JANETE MARTINS SOUSA**

**QUITOSANA QUIMICAMENTE MODIFICADA PARA A FORMAÇÃO DE NOVAS  
BASES DE SCHIFF E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar a obtenção do título de Mestre em Ciências e Engenharia dos Materiais.

**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**Teresina - Piauí**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S725q Sousa, Janete Martins.  
Quitosana quimicamente modificada para a formação de novas bases de Schiff e suas propriedades biológicas / Janete Martins  
Sousa. – 2017.  
142 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.  
“Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho”.

1. Ciências dos Materiais. 2. Quitosana. 3. Citotoxicidade.  
I. Título.

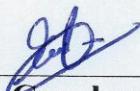
CDD 620.112

**QUITOSANA QUIMICAMENTE MODIFICADA PARA A FORMAÇÃO DE NOVAS  
BASES DE SCHIFF E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos materiais.

**APROVADA EM 31/07/2017**

**Banca Examinadora:**



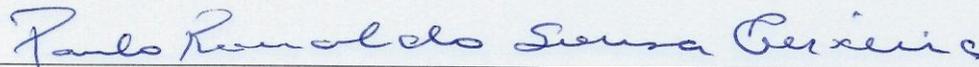
---

**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**  
Universidade Federal do Piauí  
Orientador



---

**Profa. Dra. Alessandra Braga Ribeiro**  
Universidade Federal do Piauí  
Examinadora Interna



---

**Prof. Dr. Paulo Ronaldo Sousa Teixeira**  
Instituto Federal do Piauí  
Examinador Externo

**Teresina - Piauí**

**2017**

**E no final você ainda vai olhar para trás e agradecer cada tropeço. Acredite Deus não  
falha. Grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros.**

**Mahatma Gandhi**

## DEDICATÓRIA

**Dedico essa dissertação a meus pais, Aluísio e Francisca, meu esposo Joelto, e a meus irmãos Aluísio J.r, Juliana e Hallyson (irmão de coração), que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Muito obrigada por tudo. Amo muito vocês.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a **Deus**, meu companheiro em todas as horas, e graças a minha fé, nunca desisti de nada. Orai e confiai sempre. **Tudo no tempo de Deus.**

Tudo antes de ser fácil, é difícil, então darei o mérito a quem merece, e não posso deixar de evidenciar que **duas** pessoas foram essenciais para esse trabalho virar realidade.

A primeira delas meu orientador e amigo, Prof. **Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**, que me ajudou e orientou, acreditou em mim até mais que eu mesma, e não me abandonou nem me julgou nos momentos difíceis, conte comigo sempre. Deus o abençoe eternamente.

A segunda, minha amiga, irmã de coração e comadre, **Dr<sup>a</sup>. Luizângela da Silva Reis**, que foi fundamental, desde as disciplinas, parte prática e discussões deste trabalho, sempre disposta a me ajudar sem se cansar, me recebeu em sua casa e em Floriano de braços abertos e ao Antônio Victor (o eterno bebezinho da madrinha), muito obrigada. Deus os proteja sempre.

Os agradecimentos sempre são extensos, pois vivemos em sociedade e somos todos irmãos devemos nos ajudar, para tornarmos esse mundo um lugar melhor para se viver. Então agradeço:

A minha mãe **Francisca**, minha melhor amiga e companheira, a melhor mãe, graças a Deus é a minha, me dizia sempre, minha filha estude e se apegue com Deus, vai dar tudo certo. Mãe a amo demais. Obrigada por tudo e por ser minha mãe.

A meu pai, **Alúcio**, que sempre que foi preciso, puxou minhas orelhas, mostrando que o estudo abre portas que ninguém fecha, pois é abençoado por Deus. Obrigada pai por nunca desistir de mim. Amo o senhor. Deus o proteja sempre.

Meu esposo, **Joelto Pires**, que nunca se cansou de ficar ao meu lado, me apoiando e ajudando em tudo. Obrigada por tudo. Deus abençoe nosso amor para sempre.

A meu irmão **Aluísio J.r.**, que me ajudou a aprender a mexer nos programas computacionais e ficou sempre ao meu lado dizendo que tudo ia dar certo. Obrigada irmão querido, o melhor de todos, presente de Deus. Amo muito você.

A meu irmão de coração, **Hallyson Henrique** e sua mãe **Ercília**, e minha Irmã **Juliana**, que sempre me incentivaram a concluir este curso. Muito obrigada de coração.

A meus animais Lola, Pretinha e Alvin, em especial a **Lola**, que sempre esteve comigo, sua presença incansável próximo à janela do cômodo que eu ficava estudando, obrigada pelos momentos de descontração quando estava cansada ia lá e brincava um pouquinho com ela para reanimar minhas forças.

As minhas amigas **Leudimar Aires** e **Deuzilene Cunha**, obrigada pelo apoio e amizade incondicional. Adoro vocês. Deus abençoe nossa amizade para sempre.

A toda minha família, amigos e compadres que sempre torceram por mim. Obrigada a todos.

Aos meus amigos, da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, na cidade de Teresina-PI, em especial aos da Comissão Permanente de Licitação, que me apoiaram e torceram por mim: **Lara Cristina, Valéria Nogueira, Ana Lídia Vasconcelos, Layzianna Lima, Denyse Vasconcelos, Daniele Alves, Eva, Paulo, Lúcia Coelho, Fabrícia, Heldania, Sr. Almir, Letícia, Andréia, Dona Irá, Erandi Júnior, Sr. George, Sr. Martins** e **Mariano**. Amigos que moram em meu coração. Muito obrigada a todos.

Aos meus professores, eternos mestres e amigos, que ao ficarem sabendo deste mestrado me incentivaram das mais diversas formas, assim agradeço: **Dr<sup>a</sup> Ângela Celis de Almeida Lopes, Dr<sup>a</sup> Regina Lúcia Ferreira Gomes, Dr. José Walmar Setubal, Dr. Ademir Sérgio Ferreira Araújo, Esp. Edmar Rodrigues Júnior, Me. Carla Patrícia Carvalho de Oliveira, Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior e Me. Joubert Aires de Sousa**. Obrigada pelas palavras sinceras e amigas. Cheguei aqui graças a vocês. Muito obrigada.

Aos companheiros do NUPCelt- UFPI, (Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco), muito obrigada a todos.

A Professora, **Dr<sup>a</sup> Andréia Bagliotti Meneguim** e toda sua equipe, pela ajuda nos testes de citotoxicidade e **RMN <sup>13</sup>C** pela utilização do Laboratório de Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) - UNIARA, Araraquara – SP. Muito obrigada.

Aos amigos do Campus Amilcar Ferreira Sobral, na cidade de Floriano-PI, **Sr. Wiuston, Leanne, Cibele, Samira, Adalgisa, Clésia, Diane Ferreira (Didi), Dr. Mauro Sérgio (diretor do campus), Dr<sup>a</sup>. Regiane (vice- diretora do campus), e Dr<sup>a</sup>. Luizângela**, pelo apoio e ajuda, sei da torcida amiga e sincera, muito obrigada a todos.

A **Carlinha**, técnica do laboratório de microbiologia, sua ajuda nos repiques das cepas e suas dicas. Excelente profissional, sempre disposta a ajudar a todos. Muito obrigada de coração.

Aos companheiros de mestrado, todos da minha turma de 2015.2, (Joana Medeiros, José Weliton (Sheik), Lívia Raquel, Wesley Rick, Patrício da Silva, Ricardo de Araújo, Rafael Teixeira, Felipe Fabrício e Antonio Bruno, turma excelente nos ajudamos e construímos o início de uma caminhada na amizade e na paz. Saúde, sucesso e muitas bênçãos de Deus a todos vocês). Agradeço também: a Gabriela Celso, Francisca (Fran), Idglan, Ângela Maria, Elton, Solranny, Emerson, Raquel e a Raquelzinha, os companheiros dos laboratórios da professora Rita e da professora Carla e todos os companheiros do grupo Edson e Josy. Muito obrigada por tudo. **Cada um tem sua contribuição neste trabalho.**

A toda a família LIMAV – UFPI, (Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados), a todos os professores do programa de Pós- Graduação em Ciências e Engenharia dos Materiais, técnicos dos laboratórios: Elton, Edgar, Heldeney e Luciano, pelo apoio e amizade, ao meu amigo Kelson (secretário do curso, digno e exemplar em suas funções, sabe ser amigo e cobrar nos momentos certos sem magoar ou ofender), equipe de apoio e limpeza (Fábrica, Kilson, Raimundo, Alan e Tia Giselle) e aos vigilantes, em especial Sr. João. Muito obrigada a todos. **Vai deixar saudade esse tempo de estudante de pós-graduação. Permanecerá sempre em minha memória.**

Os agradecimentos são uma pequena forma de expressar meu reconhecimento a todos àqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. Gratidão é a memória do coração. **Esse trabalho é nosso.**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURA E SIMBOLOS .....	X
RESUMO .....	XII
ABSTRACT .....	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIA .....	3
2.CAPÍTULO 1: QUITOSANA QUIMICAMENTE MODIFICADA PARA A FORMAÇÃO DE DERIVADOS COM BASE DE SCHIFF E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS: UMA PROSPECÇÃO.....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO.....	9
METODOLOGIA.....	11
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	13
ANÁLISE DOS ARTIGOS .....	13
ANÁLISE DOS RESULTADOS COM AS PALAVRAS-CHAVE “CHITOSAN” AND “SCHIFF BASE” .....	14
ANÁLISE DOS RESULTADOS COM AS PALAVRAS-CHAVE “CHITOSAN” AND “IMINES” AND ANTIBACTERIAL” .....	18
ANÁLISE DOS RESULTADOS COM AS PALAVRAS-CHAVE “CHITOSAN” AND “IMINES” AND “ANTIMICROBIAL” AND “ BIOLOGICAL PROPERTIES” .....	23
ANÁLISE DOS RESULTADOS DA BUSCA COM AS PALAVRAS-CHAVE: “CHITOSAN” AND “IMINES” AND “ BIOLOGICAL PROPERTIES” .....	26
ANÁLISE DAS PATENTES .....	31
ANÁLISE DOS RESULTADOS COM AS PALAVRAS-CHAVE “CHITOSAN” AND “SCHIFF BASE”.....	32
DIGITE O TÍTULO DO CAPÍTULO (NÍVEL 1) .....	35
CONCLUSÃO.....	37
REFERENCIAS .....	38

3.CAPÍTULO 2:ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA E DERIVADOS COM ANIDRIDO FTALICO E POSTERIOR REAÇÃO COM ETILENODIAMINA .....	43
RESUMO .....	45
ABSTRACT .....	46
INTRODUÇÃO .....	47
PARTE EXPERIMENTAL .....	51
MATERIAS E REAGENTES .....	51
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA .....	51
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ANIDRIDO FTÁLICO .....	51
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ETILENODIAMINA .....	51
CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL .....	52
ANÁLISE ELEMENTAR .....	52
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO CARBONO 13 (RMN <sup>13</sup> C).....	53
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) .....	53
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	53
ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) .....	53
TESTES ANTIBACTERIANOS .....	53
CEPAS BACTERIANAS.....	53
PREPARO DO INÓCULO .....	54
TESTE DE CONTATO DIRETO .....	54
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE .....	55
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
RESULTADO E DISCUSSÃO .....	57
ANÁLISE ELEMENTAR .....	57
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO CARBONO 13 (RMN <sup>13</sup> C).....	59
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) .....	60
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	61
ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) .....	64
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	68
ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DA QUITOSANA E DERIVADOS .....	71

CONCLUSÃO .....	75
REFERENCIAS .....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	84
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	85
3.CAPÍTULO 2:ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA E DERIVADOS COM ANIDRIDO MALEICO E POSTERIOR REAÇÃO COM ETILENODIAMINA .....	86
RESUMO .....	88
ABSTRACT .....	89
INTRODUÇÃO .....	90
PARTE EXPERIMENTAL .....	93
MATERIAS E REAGENTES .....	93
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA .....	93
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ANIDRIDO MALEICO.....	93
MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM ETILENODIAMINA .....	93
CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL .....	94
ANÁLISE ELEMENTAR .....	94
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) .....	94
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	95
ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) .....	95
TESTES ANTIBACTERIANOS .....	95
CEPAS BACTERIANAS.....	95
PREPARO DO INÓCULO .....	95
TESTE DE CONTATO DIRETO .....	96
AValiação DA CITOTOXICIDADE .....	97
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	98
RESULTADO E DISCUSSÃO .....	99
ANÁLISE ELEMENTAR .....	99
DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) .....	101
ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	102
ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG) .....	104

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	108
ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DA QUITOSANA E DERIVADOS .....	111
CONCLUSÃO .....	114
REFERENCIAS .....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	120
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	121

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Estrutura química da quitosana.....	9
Figura 2 . Evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base” .....	14
Figura 3. Revistas e quantidade de publicações, resultando da busca das palavras- chave: “Chitosan” and “Schiff base”, no período de 2007 a 2016.....	15
Figura 4. Quadro com reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, e seus respectivos grupos funcionais, resultando da busca com as palavras- chave: “Chitosan” and “Schiff base”, no período de 2007 a 2016.....	16
Figura 5. Quadro com a evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras chaves “Chitosan” and “Schiff base” and “ antimicrobial” .....	19
Figura 6. Quadro com os reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras chaves “Chitosan” and “Schiff base” and “ antimicrobial”, no período de 2007 a 2016.....	20
Figura 7. Quadro com os microrganismos usados nos testes de atividade antimicrobiana testadas nas modificações da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “ Schiff base” and “ antimicrobial”, no período de 2007 a 2016.....	22
Figura 8. Quadro com resumo dos artigos resultantes busca com as palavras-chave “Chitosan” and “imines” and “antibacterial”, no período de 2007 a 2016.....	23
Figura 9. Quadro com a evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras chaves: “Chitosan” and “Schiff base” and “ antibacterial” .....	26
Figura 10. Quadro com as revistas mais publicadas e suas respectivas quantidades de publicações, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base” and “ antibacterial” .....	27
Figura 11. Quadro com os reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras- chave: “Chitosan” and	

“Schiff base” and “antibacterial”, no período de 2007 a 2016.....	28
Figura 12. Quadro com microrganismos usados nos testes de atividade antimicrobiana testadas nas modificações da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base” and “antimicrobial, no período de 2007 a 2016.....	31

## Capítulo 2

Figura 1. Estrutura química da quitosana.....	48
Figura 2. Fluxograma do processo de modificação química da quitosana .....	52
Figura 3. Equação do efeito inibitório.....	55
Figura 4. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana (Q) com anidrido ftálico (QF).....	58
Figura 5. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana ftálico (QF) e sua reação com etilenodiamina (QFE).....	58
Figura 6. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido da quitosana (Q) e os derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).....	59
Figura 7. Difratoograma de Raios-X da quitosana (Q) e dos derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) .....	60
Figura 8. Espectro na região de infravermelho da quitosana (Q) e de seus derivados modificados anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), em pó para solução injetável em pastilhas de brometo de potássio.....	61
Figura 9. Curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e dos derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).....	65
Figura 10. Derivadas das curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina QFE.....	66
Figura 11. Esquema da Parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	69

## Capítulo 3

Figura1.Estrutura química da quitosana.....	111
Figura2.Fluxograma do processo de modificação química da quitosana.....	115
Figura3.Equação do efeito inibitório.....	117
Figura 4.Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana com anidrido malêico.....	121
Figura 5.Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana malêico e posterior reação com etilenodiamina.....	121
Figura 6.Difratograma de Raios-X da quitosana (Q) e do derivado de quitosana modificada com anidrido malêico (QM).....	122
Figura 7. Difratograma de Raios-X da quitosana modificada com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME).....	123
Figura 8. Espectro na região de infravermelho da quitosana (Q) e de seus derivados modificados anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME), em pó para solução injetável em pastilhas de brometo de potássio.....	123
Figura 9. Curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados QM (quitosana modificada com anidrido malêico) e QME (quitosana modificada com anidrido malêico e posterior reação com etilenodiamina).....	125
Figura 10.Derivadas das curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados QM (quitosana modificada com anidrido malêico) e QME (quitosana modificada com anidrido malêico e posterior reação com etilenodiamina).....	127
Figura 11. Esquema da Parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.....	130

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos e patentes nos bancos de dados.....	11
Tabela 2. Número de artigos encontrados nos bancos de dados scopus, web of science e scielo, no período de 2007 a 2016 .....	13
Tabela 3. Número de depósitos de patentes encontradas nas bases EPO, USPTO e INPI .....	32
Tabela 4. Resumos das patentes depositadas na epo até 31 de dezembro de 2016, resultantes da busca das palavras-chave: “chitosan” and “schiff base” .....	32
Tabela 5. Resumos das patentes depositadas na uspto até 31 de dezembro de 2016, resultantes da busca das palavras-chave: “chitosan” and “imines .....	35

### Capítulo 2

Tabela 1. Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos .....	57
Tabela 2. Principais bandas do espectro de infravermelho da quitosana (Q) e derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) .....	63
Tabela 3. Resultados de TG/DTG para os derivados da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).....	67
Tabela 4. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) sobre cepa padrão <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923). Os valores representam as médias das placas $\pm$ desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.....	68
Tabela 5. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) sobre cepa padrão <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922). Os valores representam as médias das placas $\pm$ desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata .....	68

Tabela 6. % de viabilidade das amostras de quitosana(Q) e de seus derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) sobre fibroblastos humanos (GM07492A), após 52h pelo ensaio de redução ao [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)).]. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.....72

### Capítulo 3

Tabela 1. Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados modificado com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME), razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos ..... 120

Tabela 2. Principais bandas do espectro de infravermelho da quitosana (Q) e derivados quitosana malêico (QM) e quitosana ftálico etilenodiamina (QME) ..... 125

Tabela 3. Resultados de TG/DTG para os derivados da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME).... 128

Tabela 4. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) sobre cepa padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os valores representam as médias das placas  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata..... 129

Tabela 5. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) sobre cepa padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os valores representam as médias das placas  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata ..... 129

Tabela 6. % de viabilidade das amostras de quitosana(Q) e de seus derivados quitosana malêico (QM) e quitosana ftálico etilenodiamina (QME) sobre fibroblastos humanos (GM07492A), após 52h pelo ensaio de redução ao [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)).]. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata ..... 133

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C- Grau Celsius

μL- Microlitros

ABTS - Captura do Radical Livre

AE- Análise elementar

ANOVA- Análise de variância

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusion

CIP - Classificação Internacional de Patente

DMA- N-N'-Dimetilacetamida

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- Dimetilsulfóxido

DO- Densidade óptica

DRX- Difração de Raios X

DTG- Termogravimétrica derivativa

*E. coli* - *Escherichia coli*

EPO- European Patent Office

FTIR- Espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier

GM07492A (Fibroblasto Humano)

HCT 116- Células carcinoma do colón retal humano.

Hela- Henrietta Lacks

*In vitro*- Em vidro- processo observado fora do organismo vivo.

*In vivo*- dentro do vivo- processo realizado dentro de um organismo vivo e em funcionamento.

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

ISO- Organização Internacional de Normalização.

mg- Miligramas

mL- Mililitros

MTT- Brometo de [3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio]

PBS- Phosphate buffered saline/ Solução Tampão Fosfato Básico Salino

pH- potencial Hidrogeniônico

Q- Quitosana pura

QF- Quitosana modificada com anidrido ftálico

QFE- Quitosana ftálico e etilenodiamina

QM- Quitosana modificada com anidrido malêico

QME- Quitosana malêico e etilenodiamina

RMN <sup>13</sup>C- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

*S.aureus- Staphylococcus aureus*

SBF- Soro fetal bovino

SIHA- câncer de colo uterino humano ou câncer cervical

TG – Termogravimetria

UFC- Unidade formadora de colônia

UFPI- Universidade Federal do Piauí

USPTO- United States Patent and Trademark Office

µg / mL<sup>-1</sup> - Micrograma por mililitro

## RESUMO

Materiais poliméricos com propriedades antimicrobianas ganharam um crescente interesse, devido a sua vasta possibilidade de aplicações, e a quitosana, que é um polissacarídeo, derivado da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, vem despertando interesse da comunidade científica, por apresenta em sua estrutura grupos reativos amina e hidroxilas, que favorecem diversas modificações químicas, ampliando sua faixa de aplicação nas áreas, biológica e médico- farmacêuticas e a sua associação a outros materiais visando melhorar suas propriedades biológicas. O objetivo deste trabalho foi modificar e caracterizar a quitosana e seus derivados com anidrido ftálico, obtendo o derivado (QF) e com anidrido malêico, obtendo derivado (QM) e posterior reação com etilenodiamina, obtendo assim QFE e QME, pelas técnicas de Análise elementar, Ressonância magnética nuclear do carbono 13, Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), e Análise Termogravimétrica (TG) e investigar a atividade antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e avaliar o potencial citotóxico da quitosana e derivados sobre células de fibroblastos humanos. No Capítulo 1, será apresentado um estudo prospectivo sobre as modificações da quitosana para formação de derivados com base de Schiff e suas principais propriedades biológicas. No Capítulo 2, serão apresentados os resultados e discussões das caracterizações e atividades biológicas dos materiais sintetizados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE). No Capítulo 3, serão apresentados os resultados e discussões das caracterizações e atividades biológicas dos materiais sintetizados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME).

Palavras chaves: quitosana, modificações químicas, atividade antibacteriana e citotoxicidade.

## ABSTRACT

Polymeric materials with antimicrobial properties have gained increasing interest due to their wide possibility of applications, and chitosan, which is a polysaccharide derived from chitin, the second polysaccharide most abundant in nature, has aroused interest in the scientific community, as it presents in its structure reactive amine and hydroxyl groups, favoring various chemical modifications, widening its range of application in the biological and medical-pharmaceutical areas and its association with other materials aiming to improve its biological properties. The objective of this work was to modify and characterize chitosan and its derivatives with phthalic anhydride, obtaining the derivative (QF) and malic anhydride, obtaining derivative (QM) and subsequent reaction with ethylenediamine, thus obtaining QFE and QME, by the techniques of Elemental Analysis, Nuclear Magnetic Resonance of Carbon 13, X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Thermogravimetric Analysis (TG) and to investigate the antibacterial activity against strains of *Escherichia coli* (negative) and *Staphylococcus aureus* (gram-positive) and to evaluate the cytotoxic potential of chitosan and derivatives on human fibroblast cells. In Chapter 1, a prospective study will be presented on chitosan modifications for the formation of Schiff-based derivatives and their main biological properties. In Chapter 2, the results and discussions of the biological characterization and activities of the materials synthesized with phthalic anhydride (QF) and subsequent reaction with ethylenediamine (QFE) will be presented. In Chapter 3, the results and discussions of the characterization and biological activities of the materials synthesized with malic anhydride (QM) and subsequent reaction with ethylenediamine (QME) will be presented.

Key words: chitosan, chemical modifications, antibacterial activity and cytotoxicity.

## INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo formado pela repetição de unidades  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino-2-desoxi-D-glicose, derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, superado pela celulose (Santos, Cirilo & Nunes .2011).

Apresentando propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade (Azevedo, et al. 2007) baixa toxicidade (Sabudin, et al. 2012), atividade antimicrobiana ( Sayari, et al. 2016), além de ser de origem natural e com baixo custo (Souza- Neto& Batista 2014), a quitosana, tem despertado a atenção dos pesquisadores devido as suas exclusivas características físico-químicas e atividades biológicas (Goy, Brito, & Assis, 2009; Goy, Morais &Odílio,2016).

Com todas estas características a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos. Exibindo assim características excelentes, neste sentido algumas propriedades especialmente desejadas para uma aplicação particular, podem ser incorporadas com uma nova modificação química em sua estrutura (Suresh, Deppa & Moganavally, 2016).

Atividade antimicrobiana da quitosana, é uma de suas propriedades biológicas mais estudadas (Edin, et al .2008) e tem aumentando assim a sua utilização em formulações biomédicas, pois suas diversas modificações químicas podem proporcionar o aumento do seu efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos e auxiliar no combate às enfermidades causadas por microrganismos resistentes, devido a sua natureza básica e seu teor de amina (Sang- Hoon & Samuel, 2004;Chetouani, et al.2017).

A quitosana, destaca-se em relação ao seu uso em reações de iminização (ligações duplas entre C=N, conhecidas por bases de Schiff) (Shi, et al.2013), fato associado ao grupamento amino primário com um par de elétrons livres não ligantes capaz de reagir com

grupos aldeídos de agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, formaldeído e etc. (Araújo 2015; Oliveira, et al .2009).

Com o objetivo de conhecer os principais reagentes e seus grupos funcionais utilizados nas sínteses de novos derivados de quitosana com base de Schiff, bem como suas aplicações, dando ênfase as suas propriedades biológicas, foi realizado o estudo prospectivo com base em artigos e patentes.

Artigos já relataram que os derivados de quitosana com base de Schiff foram mais eficientes do que a quitosana pura, no que diz respeito às atividades antimicrobiana e citotóxica. Quanto às patentes, nenhuma traz modificação química da quitosana com base de Schiff e suas propriedades biológicas.

Apesar de ser uma área ainda pouco explorada, percebeu-se um aumento nos últimos anos no número de artigos e de depósito de patentes. A partir da análise dessas publicações constatou-se que os derivados provenientes deste tipo de modificação podem ser usados nas mais diversas áreas das ciências biomédicas.

Diante das potencialidades deste polissacarídeo, foram desenvolvidos quatro derivados da quitosana(Q), os dois primeiros com anidridos orgânicos ftálico (QF) e malêico (QM) e ambos com posterior reação com etilenodiamina formando os derivados quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) e quitosana malêico etilenodiamina (QME) e foi investigada a atividade antibacteriana, pelo teste do contato direto, frente às cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e foi avaliado o potencial citotóxico em células de fibroblasto humano (GM07492A), pelo teste de redução ao brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)]. A quitosana e os derivados foram caracterizados por Análise elementar, Ressonância magnética no nuclear do carbono 13, Difratometria de raios-X(DRX), Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), e Análise térmica (TG).

## REFERÊNCIAS

Araújo, E.L. (2015). Preparação e caracterização de base de Schiff e complexos metálicos a partir da quitosana e derivados de salicialdeído. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo.

Azevedo, V.V., Chaves, S.A., Bezerra, D.C., Lia Fook, M.V., Costa, A.C. F.(2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2, 27-34.

Chetouani, A., Follain, N., Marais, S., Benachour, D., Le Cerf, D. (2017). Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. International Journal of Biological Macromolecules, 97, 348-356.

Eldin, M.S.M., E. A. Soliman, E.A., A.I., Hashem, A.I., Tamer, T.M. (2008). Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified. Trends in Biomaterials & Artificial, 22-3, 125-137.

Goy, C. R., Morais, T. B. S., & Odilio, B.G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. Revista Brasileira de Farmacognosia, 26, 122-127.

Goy, R. C., Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 19, 241-247.

Oliveira, I.R.W.Z., Fatibello-Filho, O., Fernandes, S.C., Vieira, I.C.(2009) Immobilization of laccase in microparticles of chitosan obtained by spray drying and used in the biosensors construction. Química Nova, 32-5, 1195-1201.

Sabudin, S., Derman, M.A., Zainol, I., Noorsal, K. (2012). In Vitro Cytotoxicity and Cell Seeding Studies of a Chitosan-silver Composite for Potential Wound Management Applications. Journal of Engineering Science, 8, 29-37.

Sang-Hoon, L., & Samuel, M.H.(2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. Carbohydrate Research, 339, 313-319.

Santos, M.C., Cirilo, A. T. O. &, Nunes, M. L.(2011). Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). *Scientia plena*, 7, 1-3.

Shi, B., Zhang, H., Shen, Z., Bi,J., Dai, S.(2013). Developing a chitosan supported imidazole Schiff-base for high- efficiency gene delivery. *Polymer Chemistry*, 4, 840-850.

Suresh, R., Deepa, M, & Moganavally, P.(2016). A Study on Biological and Catalytic Activity of CSB Derivative and its Cobalt and Nickel Complexes. *Oriental journal of chemistry*, 32, 2509-2516.

## **CAPÍTULO 1: ESTUDO PROSPECTIVO**

**QUITOSANA MODIFICADA PARA A FORMAÇÃO DE DERIVADOS COM BASE  
DE SCHIFF E SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS: UMA PROSPECÇÃO**

*Janete Martins Sousa<sup>1</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais,*

*Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV*

## RESUMO

O aumento no número de microrganismos patogênicos resistentes tem estimulado a busca por novos agentes antimicrobianos resultantes de produtos naturais que sejam ecologicamente sustentáveis e com baixo custo. Nesse contexto, a quitosana que reúne essas características e associadas, a sua estudada atividade antimicrobiana, vem sendo empregada em formulações biomédicas e na área das ciências da saúde. A inserção de grupos novos grupos funcionais na cadeia molecular da quitosana pode conferir melhores propriedades antimicrobianas aos derivados, como as aminas e anidridos orgânicos, que vêm sendo utilizados com êxito em modificações na estrutura química da quitosana. Esta prospecção teve como objetivo conhecer os principais reagentes e seus grupos funcionais, utilizados para modificar a quitosana para formar derivados com base de Schiff, enfatizando suas propriedades biológicas. O trabalho foi realizado através do estudo em artigos e patentes. Dentre reagentes, merecem destaque: Benzaldeído, Aldeído, Polipropileno, Metoxibenzaldeído, Salicialdeído e Cinnamaldeído, e os derivados foram utilizados para diversas aplicações, incluindo a área das ciências biomédicas e da saúde. As patentes que mais se expressaram foram classificadas internacionalmente nas áreas C08B, A01P e A01N, indicando que os derivados podem ser aplicados nas ciências médicas ou veterinária, agricultura, cultura de células entre outros relacionados à área da saúde ou biofarmacêutica.

Palavras-Chaves: Quitosana, Modificação, Propriedades biológicas.

## ABSTRACT

The increase in the number of resistant pathogenic microorganisms has stimulated the search for new antimicrobial agents resulting from natural products that are ecologically sustainable and at low cost. In this context, the chitosan that combines these characteristics and associated, its studied antimicrobial activity, has been used in biomedical formulations and in the area of health sciences. The insertion of new groups functional groups in the molecular chain of chitosan can confer better antimicrobial properties to the derivatives, such as amines and organic anhydrides, that have been successfully used in modifications in the chemical structure of chitosan. This prospect aimed to know the main reagents and their functional groups, used to modify the chitosan to form derivatives based on Schiff, emphasizing its biological properties. The work was carried out through the study of articles and patents. Among the reagents, it is worth mentioning: Benzaldehyde, Aldehyde, Polypropylene, Methoxybenzaldehyde, Salidaldehyde and Cinnamaldehyde, and the derivatives were used for several applications, including biomedical and health sciences. The most expressive patents were classified internationally in the areas C08B, A01P and A01N, indicating that the derivatives can be applied in the medical sciences or veterinary, agriculture, cell culture among others related to health or biopharmaceutical.

Keywords: Chitosan, Modification, Biological properties.

## 1. INTRODUÇÃO

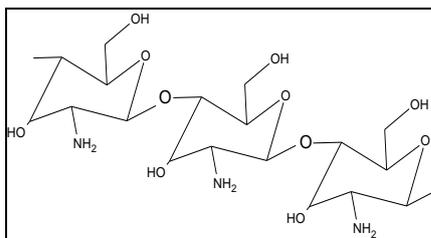
A contaminação microbiana em alimentos leva a uma redução de vida nas prateleiras, doenças e perdas econômicas. Além disso, um grande problema de saúde pública em todo mundo que é o surgimento de microrganismos resistentes a diversas enfermidades, reduzindo assim as opções de tratamento. Neste contexto, tem havido um crescente interesse no desenvolvimento de substâncias antimicrobianas a partir de produtos naturais, e a quitosana, tem se mostrado promissora devido a sua vasta possibilidade de aplicação (Sayari, et al. 2016; Aranaz, Hariz & Heras , 2010; Paiva ,Souza- Neto, & Batista ,2014).

Atualmente, a quitosana, tem sido proposta como um biomaterial potencialmente atraente para usos diversos, como na área alimentícia, biotecnologia, ciência dos materiais, tratamento de água, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental e terapia genética (Azevedo, et al. 2007) e por reunir propriedades dentre as quais se destaca, ser um produto natural, baixo custo, renovável (Azevedo, et al. 2007), abundante com quase nenhuma toxicidade em seres humanos e animais (Berger, et al. 2011), ser biocompatível e biodegradável (Freddo, et al.2014) e possuir atividade antimicrobiana comprovada frente a uma gama de bactérias e fungos (Azevedo, et al. 2007; Paiva ,Souza- Neto & Batista, 2014; Araújo, et al. 2017).

Sendo constituída das unidades químicas, 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-desoxi-D- glicopirranose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , o copolímero quitosana, derivado da desacetilação alcalina da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, têm em sua estrutura química, os grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) bastantes reativos, e também as hidroxilas (OH), que por terem a capacidade de doar pares de elétrons livres, fazem com que a quitosana seja solúvel em soluções ácidas diluídas, apresentando dessa forma uma oportunidade relevante de modificações químicas, conforme se

visualiza na figura 1 (Guibal, 2004; Santos, Cirilo & Nunes, 2011; Berger, Stamford & Stamford, 2011; Quelelesa, et al.2017).

**Figura 1. Estrutura química da quitosana.**



Fonte: autoria própria (2017)

A partir da imobilização de novos grupos funcionais na cadeia polimérica da quitosana, pode-se obter uma variedade de derivados para atingir as finalidades desejadas, nesse sentido, podem ser feitas várias reações de modificações, dentre as quais se destacam as reações de que levam a formação de derivados com bases de Schiff que ocorrem com a condensação do grupo amino livre da quitosana com aldeídos ou cetonas, formando a ligação imina (C=N), que apresentam uma estratégia eficaz de proteção do grupo amino no carbono C-2 aumentando assim a estabilidade do biopolímero (Lima, 2010; Sashikala, & Shafi, 2015).

Derivado de quitosana com base de Schiff, geralmente melhoram suas propriedades biológicas (Edin, et al. 2008), as mais estudada são as atividades, antimicrobiana (Mohamed, et al. 2013) e a citotóxica (Sabudin, et al. 2012) sugerindo assim aplicações em formulações farmacêuticas (Mourya & Inamdar, 2008) e na área das ciências da saúde (Goy, Morais & Odilio, 2016).

Com base nessas informações, este estudo prospectivo teve como objetivo conhecer os principais reagentes e seus grupos funcionais que levaram a formação de derivados de quitosana com base de Schiff ou iminas destacando suas propriedades biológicas.

## 2. METODOLOGIA

Esta prospecção foi realizada em maio de 2017, por meio da busca de artigos e patentes em bancos de dados utilizando-se as palavras-chave listadas na Tabela 1. Os bancos de dados utilizados na busca dos artigos foram: *Scielo*, *Web of Science* e *Scopus*. Já para a busca das patentes, consultaram-se os pedidos de depósitos do Banco Europeu de Patentes (European Patent Office - EPO), do Banco Americano de Marcas e Patentes (United States Patent and Trademark Office - USPTO) e do Banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), resumos, palavras-chave e títulos foram os campos utilizados para as buscas. Para a busca de artigos, restringiu-se o tempo para as publicações ao período de 2007 a 2016. Para a busca das patentes não houve restrição de tempo. Para a busca dos artigos no banco Scielo e do depósito de patentes no banco INPI, utilizou-se as palavras-chave em português.

**Tabela 1. Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos e patentes nos bancos de dados.**

<b>Palavras- chave</b>
<b>Chitosan</b>
<b>Chitosan and Schiff base</b>
<b>Chitosan and imines</b>
<b>Chitosan and imines and antimicrobial</b>
<b>Chitosan and imines and antibacterial</b>
<b>Chitosan and imines and biological properties</b>

Fonte: autoria própria (2017)

Artigos que eram de revisão, e artigos patentes repetidos ou que não se tratavam da quitosana modificada para a formação de derivados com base de Schiff e suas propriedades biológicas foram excluídos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise dos Artigos

Na Tabela 2, encontram-se os resultados da busca de artigos publicados no período de 2007 a 2016 nos bancos de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*.

**Tabela 2. Número de artigos encontrados nos bancos de dados *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*, no período de 2007 a 2016.**

<i>Palavras-chave</i>	<i>Scopus</i>	<i>Web of Science</i>	<i>Scielo</i>
<b>Chitosan</b>	39.287	39.217	478
<b>Chitosan and Schiff base</b>	336	460	1
<b>Chitosan and imines</b>	81	146	0
<b>Chitosan and imines and antimicrobial</b>	11	15	0
<b>Chitosan and imines and antibacterial</b>	7	9	0
<b>Chitosan and imines and biological properties</b>	4	4	0

Fonte: autoria própria (2017)

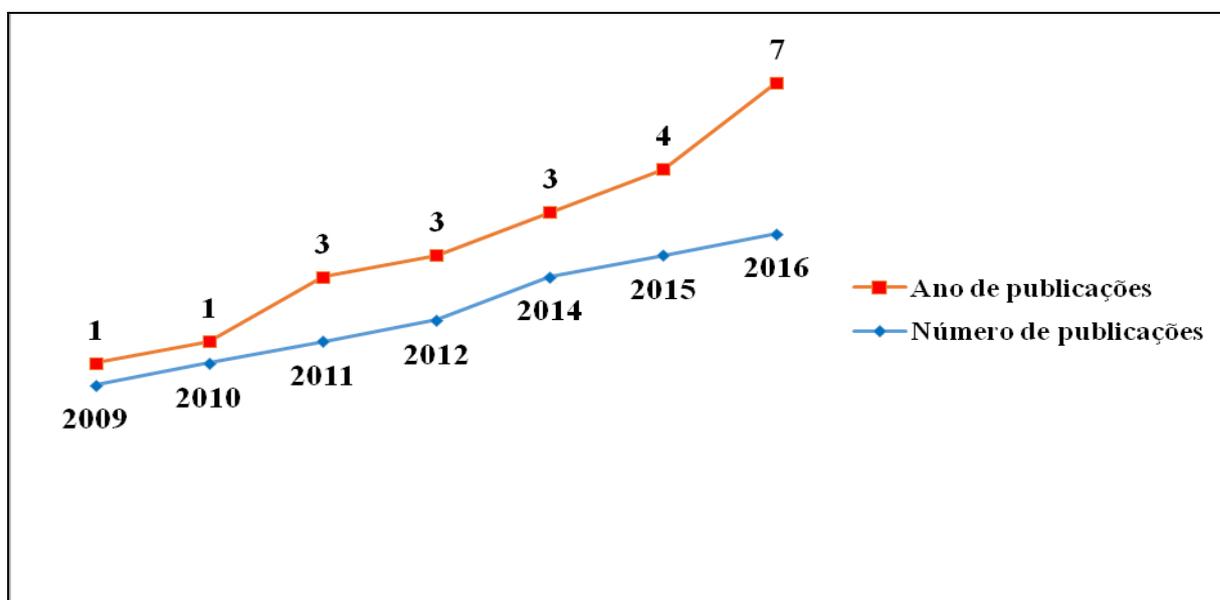
Como inicialmente pretendeu-se analisar as modificações na quitosana que resultaram na formação de base de Schiff e quais as aplicações biológicas dos derivados obtidos, restringiu-se a análise dos artigos àqueles encontrados com a combinação das palavras-chave “Chitosan” and “Schiff base”. Dos 797 artigos encontrados nas três bases de dados (336 da *Scopus*, 460 da *Web of Science* e 1 da *Scielo*), encontravam-se 226 em duplicidade, 134 não tratavam do assunto da busca e 7 se tratavam de artigos de revisão.

Dos 430 artigos remanescentes, apenas 116 (72 da *Scopus* e 44 da *Web of Science*) tratavam da quitosana suas modificações e destes apenas 22 tratam realmente da quitosana modificada para a formação de derivados com base de Schiff, sendo, portanto, os artigos utilizados para a confecção das figuras e tabelas para a discussão deste trabalho.

### 3.1.1 Análise dos resultados referentes à busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base”.

Analisando os 22 artigos que tratam da modificação da quitosana para a formação de derivados com base de Schiff, os reagentes mais utilizados estão listados abaixo conforme figura.

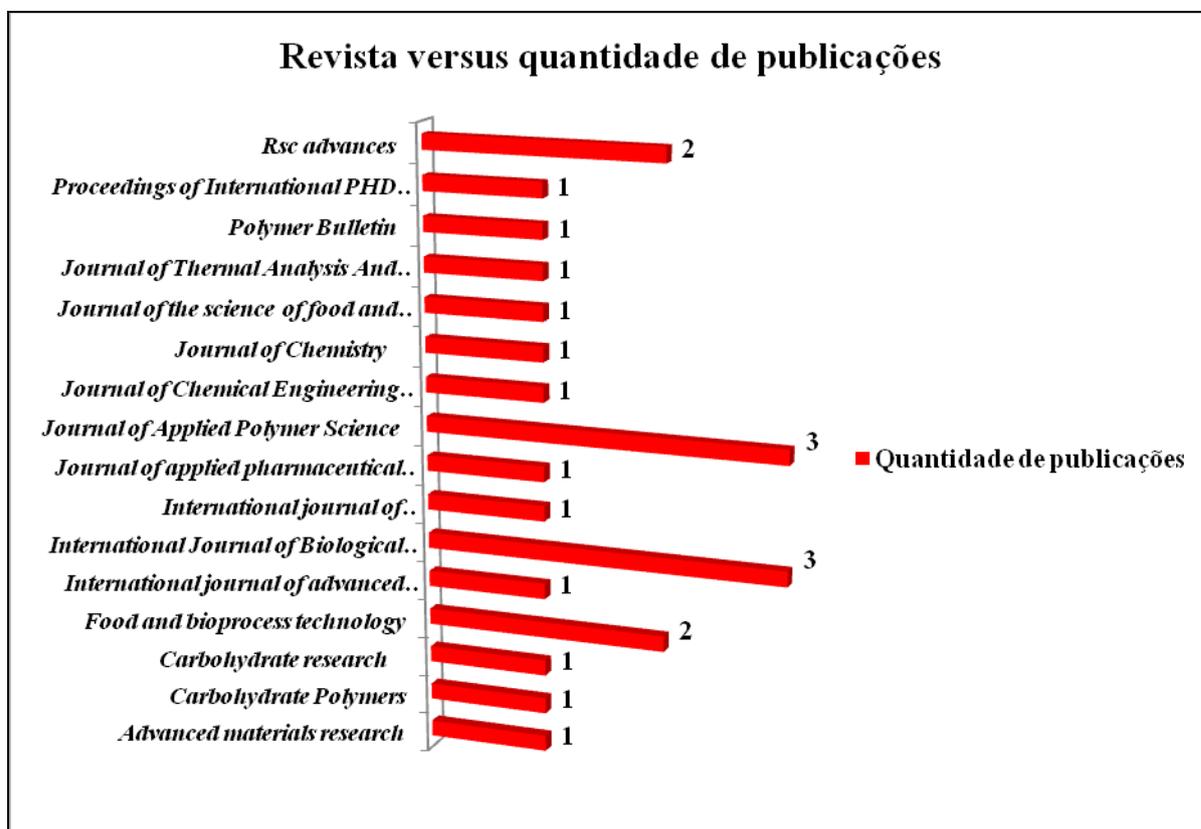
**Figura 2. Evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base”.**



Fonte: autoria própria (2017)

Pela figura acima se observa um efeito crescente ao longo dos anos, 2009 a 2016, em pesquisas que envolvem a quitosana e seus derivados com base de Schiff.

Figura 3. Revistas e quantidade de publicações, resultando da busca das palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base”, no período de 2007 a 2016.



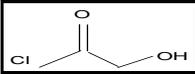
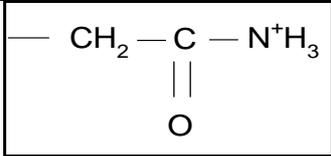
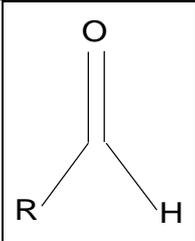
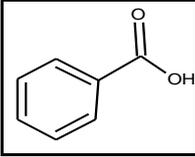
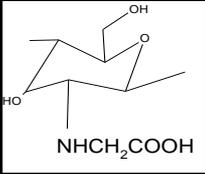
Fonte: autoria própria (2017)

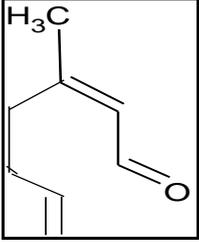
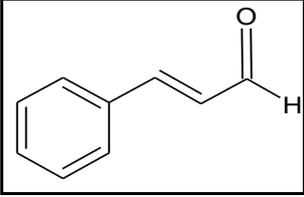
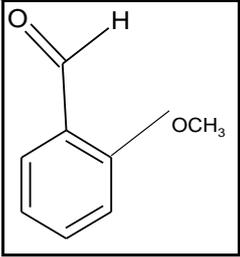
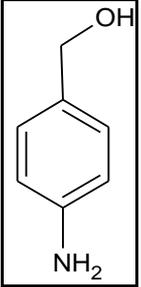
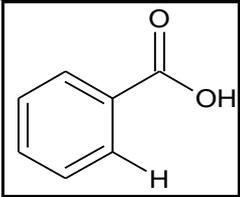
Revistas bem conceituadas como: International Journal of Biological Macromolecules (Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas) é uma revista internacional reconhecida por pesquisa sobre aspectos químicos e biológicos de todas as macromoléculas naturais, e a quitosana e suas pesquisas para diversas aplicações, tem publicações de destaque nesta revista, bem conceituada e atual, com fator de impacto, nos últimos 5 anos, 3.671. Já o Journal of Applied Polymer Science (Jornal da Ciência dos Polímeros Aplicados), é um documento de pesquisa mais completos, abrange publicações que vão desde revisões a todas as aplicações de polímeros, de materiais compostos e estruturais, que são utilizados em embalagens, implantes biomédicos, eletrônicos, plásticos, energia e muito mais. Possui fator

de impacto calculado em 2015, 1.866. A RSC Advances é um jornal internacional que traz todas as ciências químicas, incluindo áreas multidisciplinares e emergentes. Seu fator de impacto atual é 3.108. Essas revistas citadas se destacaram por apresentarem mais 2(dois) artigos na área da busca.

A figura a seguir traz um resumo dos reagentes, seus grupos funcionais e sua quantidade de publicações envolvendo a área da busca.

**Figura 4. Quadro com reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, e seus respectivos grupos funcionais, resultando da busca com as palavras- chave: “Chitosan” and “Schiff base”, no período de 2007 a 2016.**

Reagente	Grupo funcional	Número de artigos
Ácido cloroacético		1
Acilamino		1
Aldeído		4
Benzaldeído		3
N- Carboximetil-quitosana		2

<b>Citral</b>		<b>1</b>
<b>Cinnamaldeído</b>		<b>3</b>
<b>Dietilaminoetil</b>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\    \\  \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{H} \\    \\  \text{CH}_2 - \text{CH}_3  \end{array}  $	<b>1</b>
<b>Metoxibenzaldeído</b>		<b>3</b>
<b>P-aminobenzil</b>		<b>1</b>
<b>Salicialdeído</b>		<b>2</b>

Fonte: autoria própria (2017)

Pela figura, destacam-se os reagentes: Aldeído, Benzaldeído, Carboximetil, Metoxibenzaldeído e Salicialdeído que são usados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff.

As bases de Schiff, ou iminização, na quitosana, ocorrem quando esta é submetida à funcionalização com aldeídos e cetonas (Kumar, et al. 2004; Laranjeira, & Fávère. 2009; Suresh, Deppa & Moganavally, 2016; Chetouani, et al. 2017).

Os reagentes Benzaldeído e Salicialdeído e suas aplicações na modificação da quitosana para a formação de derivados com base de Schiff, foram testadas as atividade antibacteriana e citotóxica, a primeira frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, e a segunda em outro artigo foi testada a toxicidade da quitosana e derivados frente às células de *Hela*, no ensaio de redução ao brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))].

Os reagentes Carboximetil e o Metoxibenzaldeído foram usados na avaliação da atividade antimicrobiana sendo testado em bactérias e fungos, na quitosana e derivados com base de Schiff.

O Cinamaldeído é citado em 3(três) artigos e em ambos a modificação foi utilizada para formação de derivados de quitosana com Base de Schiff e foram investigadas a atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos e avaliada a atividade antioxidante pelo método ABTS (Captura do Radical Livre ) sugerindo que derivados com base de Schiff podem ser utilizados na área das ciências médicas.

A vanilina (4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído) reagiu com a quitosana formando derivado em forma de esferas com base de Schiff biopolimérica sugerindo a sua aplicação na área biomédica (Perobelli, et al.2015).

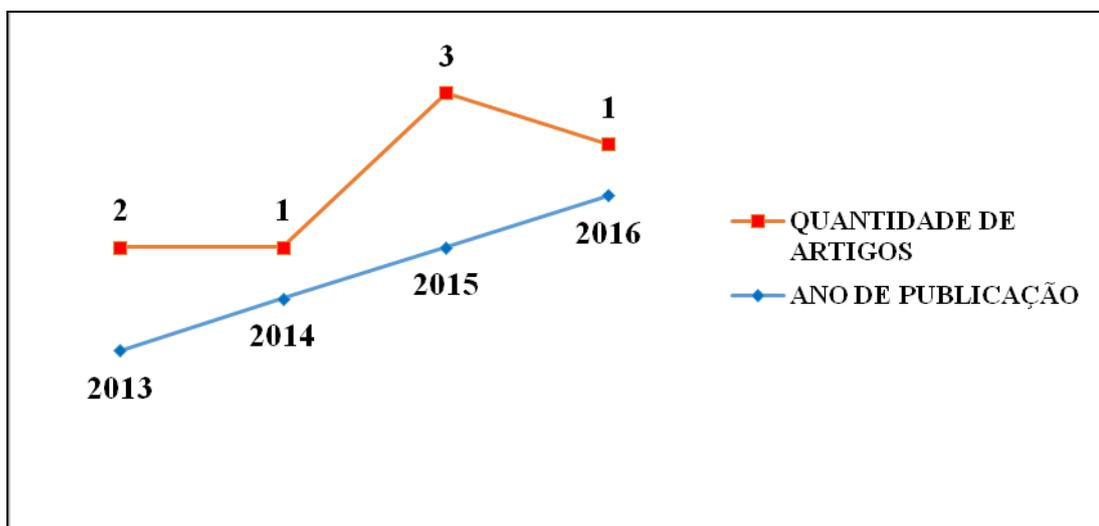
Aldeídos aromáticos, tais como benzaldeído e cinnamaldeído têm estudos relatados em na quitosana e seus derivados com base de Schiff, e o material formado induz a melhora da atividade antibacteriana frente a *E.coli* e *S.aureus* (Yin, et al. 2011).

Marin e seus colaboradores (2015) relataram a preparação de filmes imínicos com biopolímero quitosana e vários aldeídos, destacando, salicialdeído e o benzaldeído, ambos com ação fungistática, frente ao fungo *Candida albicans*.

### 3.1.2. Análise dos resultados da busca com as palavras-chave “Chitosan” and “imines” and “antimicrobial”.

Quando se restringiu a busca, acrescentando palavras-chave “antimicrobial” o número de artigos diminuiu para 26(vinte e seis). Excluindo-se os artigos repetidos e aqueles que não relatavam a modificação da quitosana para formação de base Schiff e suas propriedades biológicas, restaram apenas 7(sete) artigos e estes foram usados para elaboração das figuras e tabelas a seguir.

**Figura 5. Quadro com a evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras chaves “Chitosan” and “Schiff base” and “antimicrobial”.**

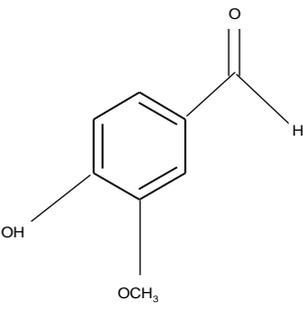
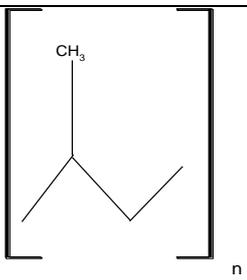
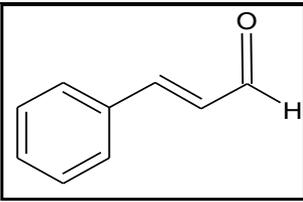
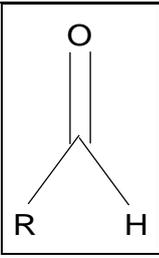


Fonte: autoria própria (2017)

Analisando a figura expressa acima, no ano de 2015 foram encontradas 3(três) artigos na área, no ano de 2013 ocorreram 2(duas) publicações no campo da busca e nos anos de 2014 e 2016 com 1(uma) publicação anual, expressando que o interesse em pesquisas

envolvendo a quitosana, suas modificações e estudo de suas propriedades biológicas tem sido expressa ao longo dos anos .

**Figura 6. Quadro com os reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras chaves “Chitosan” and “Schiff base” and “ antimicrobial”, no período de 2007 a 2016.**

Reagente	Grupo funcional	Número de artigos
Vanilina		1
Polipropileno		3
Cinamaldeído		1
Aldeído		2

Fonte: autoria própria (2017)

A figura 6 expõe claramente diversos reagentes usados para a modificação da quitosana para a formação de Base de Schiff, em destaque tem o polipropileno, que tratam da avaliação da atividade citotóxica da quitosana e seus derivados usando o método de ensaio de viabilidade celular pela redução ao brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)).], em células de câncer de colo uterino humano ou câncer cervical (SiHa) (Sadeghi-Kiakhani, & Safapour, 2016) e o outro destaque em células de osteoblastos fetais humanos (Sadeghi-Kiakhani, Mokhtar & Kamaladin, 2013).

A reação de modificação da quitosana com aldeídos também se destacou em dois artigos, formando derivados mais solúvel, em meios aquosos, resultando assim em um polieletrólito, que possui propriedades físicas, químicas e biológicas: alta viscosidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, capacidade de formar géis, e solubilidade em amplo intervalo de acidez, que ampliam as possibilidades de aplicação (Chen, Yumin & Zeng, 2003; Silva, 2011).

A versatilidade química da quitosana resulta principalmente da presença dos grupos amina em sua estrutura, os quais oferecem muitas possibilidades de modificações, como formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (Gonsalves, et al. 2011; Santos, et al.2003).

A atividade antimicrobiana foi testada em uma variedade de microrganismo, destacando fungos e bactérias, enfatizando claramente que as bactérias, mais comum no cotidiano, despertam maior interesse de estudo pelos pesquisadores, a *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva, patógeno situacionista, que tem relação com a pele, tecidos e infecções nosocomiais (hospitalares), principalmente, devido a sua capacidade de resistência frente a antibióticos, e a *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa, tendo como principal habitat o trato intestinal de humanos e mamíferos em geral. Sua transmissão ao homem pode ocorrer pelo consumo de alimentos contaminados, principalmente leite, carne e ovos crus ou

malcozidos, e também pelo consumo de vegetais crus e também de pessoa a pessoa, pela via fecal- oral. Ambas são um problema de saúde pública devido aos prejuízos que trazem para a saúde da população humana, motivos estes que evidenciam a necessidade de estudos para combatê-las (Rosa, Barros & Santos, 2016; Quelemesa, et al. 2017).

Na figura 7 relatam os microrganismos mais testados em materiais derivados da quitosana com base de Schiff, dentre eles estão fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

**Figura 7. Quadro com os microrganismos usados nos testes de atividade antimicrobiana testadas nas modificações da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “ Schiff base” and “ antimicrobial”, no período de 2007 a 2016.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Número de citações</b>	<b>Classificação Biológica</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>1</b>	<b>Bactéria Gram -negativa</b>
<i>Aspergillus fumigates</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	<b>1</b>	<b>Bactéria Gram- positiva</b>
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Botrytis cinerea</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Claviceps purpurea</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Erwinia carotovora</i>	<b>1</b>	<b>Bactéria Gram -negativa</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>5</b>	<b>Bactéria Gram -negativa</b>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Fusarium solani</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>
<i>Phytophthora infestans</i>	<b>1</b>	<b>Fungo</b>

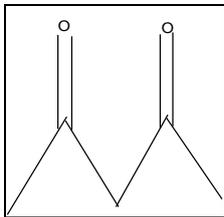
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Bactéria Gram -negativa
<i>Pythium debaryanum</i>	1	Fungo
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	Bactéria Gram- positiva
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1	Fungo

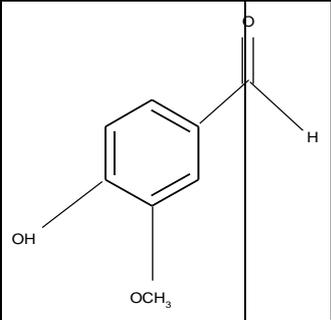
Fonte: autoria própria (2017)

### 3.1.3. Análise dos resultados da busca com as palavras-chave “Chitosan” and “imines” and “antibacterial”.

Quando se restringiu a busca, acrescentando palavras-chave “antibacterial” o número de artigos diminuiu para 16. Excluindo-se os artigos repetidos e aqueles que não relatavam a modificação da quitosana para formação de base Schiff ou iminas e suas propriedades biológicas, restaram apenas 2 artigos e estes foram usados para elaboração da figura abaixo:

**Figura 8. Quadro com resumo dos artigos resultantes busca com as palavras-chave “Chitosan” and “imines” and “antibacterial”, no período de 2007 a 2016.**

Título do artigo	Revista/ autores	Resumo	Reagente/ grupo funcional
Antibacterial Activity of a Chitosan Derivative Obtained in the Absence of a Solvent. Tradução:	<b>Materials Science Forum.</b> Osório, et al. 2016.	Um novo derivado de quitosana foi preparado através da reação direta de quitosana pura com acetilacetona (Qac) na ausência de um solvente. A quitosana e o Qac foram caracterizados por análise elementar, espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e	<b>Acetilacetona</b> 

<p>Atividade antibacteriana da quitosana e derivado obtido na ausência de um solvente.</p>		<p>espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) de <math>^{13}\text{C}</math>. Foi avaliada a propriedade antibacteriana pelo método de contato direto contra estirpes resistentes a diversos fármacos a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>. Os resultados das caracterizações foram consistentes comprovando a modificação na estrutura química. O derivado Qac exibiu uma melhor atividade antibacteriana comparado com quitosana contra a bactéria gram-negativa <i>E.coli</i>, fato que pode está associado à incorporação da ligação de imina (C=N, ou base de Schiff), provocando um aumento do efeito inibitório, fato não observado na bactéria Gram-positiva <i>S.aureus</i>.</p>	
<p>Chitosan grafted with vanillin: Its antioxidant and antibacterial activity and</p>	<p><b>China</b> <b>Pulp and Paper.</b> Yu, et al. 2014.</p>	<p>A quitosana foi modificada com vanilina (VA) com auxílio de um catalisador, formando o derivado VA-quitosana. A quitosana e a VA-quitosana, foram caracterizados por titulação potenciométrica linear e por espectroscopia de infravermelho de</p>	<p><b>Vanilina</b></p> 

<p>application in papermaking.</p> <p>Tradução:</p> <p>Quitosana enxertada com vanilina: sua atividade antioxidante e antibacteriana e a aplicação na fabricação de papel.</p>		<p>transformação de Fourier (FTIR). Foram avaliadas as propriedades biológicas atividade antibacteriana contra a bactéria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> e atividade antioxidante pelo método ABST. Os resultados mostraram que a proporção de enxerto de VA-quitosana foi de 10,2%. O FTIR apresentou diminuição de absorção de grupos amino e uma nova banda chegando a 1637 <math>\text{cm}^{-1}</math> correspondente às vibrações da C=N que são características de iminas devido à base de Schiff formada entre os grupos amino do quitosano e o hidroxilo fenólico de Vanillina. O <math>\text{IC}_{50}</math> foi de 1,62mg / mL para o abatimento ABTS de VA- quitosana, uma medida de poder de redução mostrada em uma absorbância a 700nm era aumentou 0,321 em comparação com quitosana na concentração de 5mg/ mL, assim como resultados sugeriram que a atividade antioxidante da VA-quitosana foi melhorada. Como a atividade</p>	
--	--	---	--

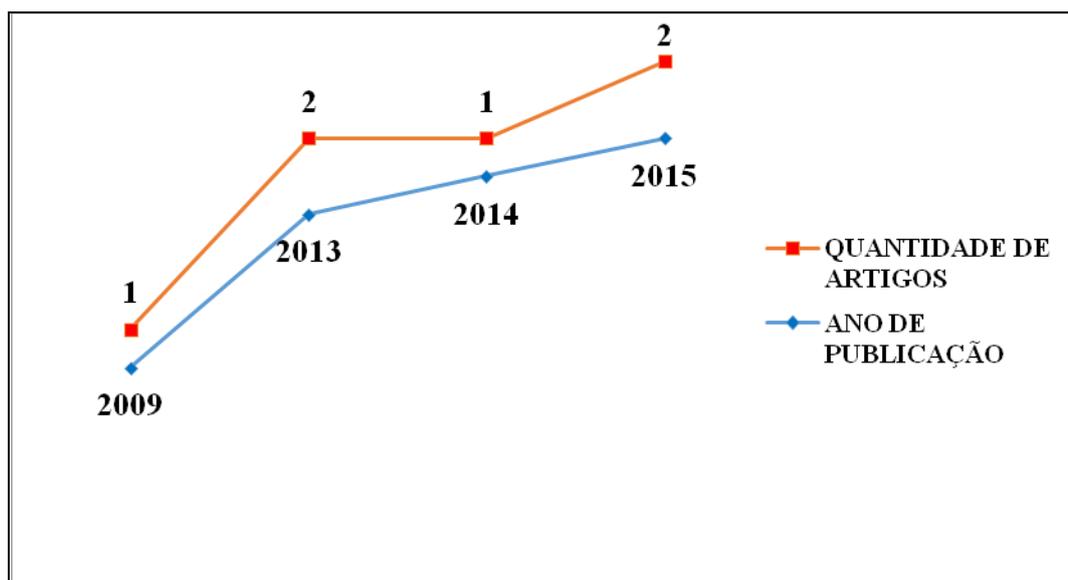
		antibacterianas de VA-quitosana contra <i>E. coli</i> foi melhor que a da quitosana pura.	
--	--	---	--

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.1.4. Análise dos resultados da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “ imines” and “ biological properties”.

Quando se restringiu a busca, acrescentando palavras-chave “biological properties” o número de artigos diminuiu para 8(oito). Excluindo-se os artigos repetidos e aqueles que não relatavam a modificação da quitosana para formação de base Schiff ou iminas e suas propriedades biológicas, restaram apenas artigos 6(seis) e estes foram usados para elaboração das tabelas e figuras a seguir:

**Figura 9. Quadro com a evolução anual de publicação de artigos, no período de 2007 a 2016, resultado da busca com as palavras chaves: “Chitosan” and “Schiff base” and “antibacterial”.**

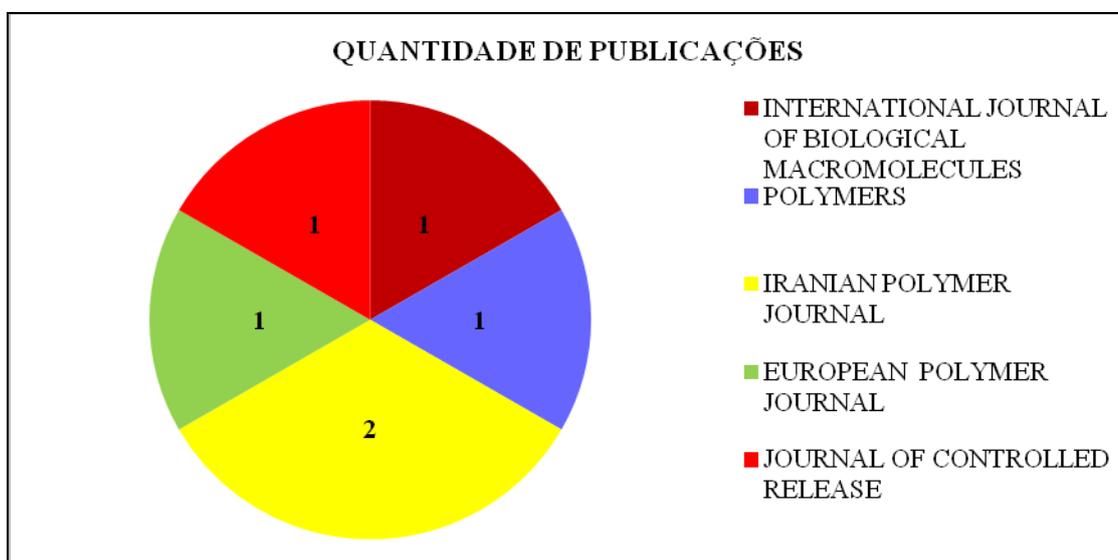


Fonte: autoria própria (2017)

Na figura acima, o ano de 2013 e 2015, tiveram destaques nas publicações, como já foi expressos em resultados de busca anteriores, enfatizando o uso da quitosana e de seus derivados é de interesse notório pela comunidade científica.

As revistas encontradas estão expressas na figura abaixo, e se destaca a Iranian Polymer Journal (Jornal de Polímeros Iraniano), com duas publicações , esta revista está amplamente distribuído no exterior e geralmente está disponível nos departamentos de ciência, química e engenharia química de polímeros em universidades, bibliotecas e nos centros de pesquisa de mais de quarenta países da Ásia, Austrália, África, Europa e América. A submissão de artigos de fontes mundiais é um sinal promissor de que o IPJ, em sua curta vida, ganhou reconhecimento internacional. Além disso, os resumos de seus artigos são referenciados em publicações nacionais e internacionais especializadas, sendo uma revista com mais de 25 anos de mercado, com início em 1992, possui fator de impacto, ano base 2016, 1.80. Conforme figura abaixo:

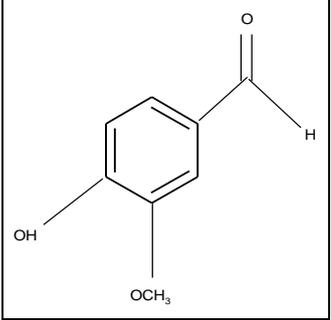
**Figura 10. Quadro com as revistas mais publicadas e suas respectivas quantidades de publicações, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base” and “ antibacterial”.**

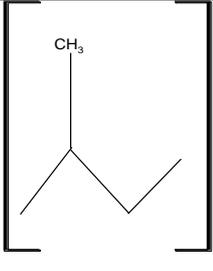
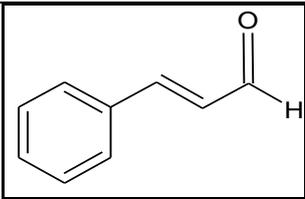
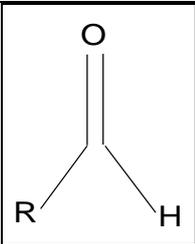
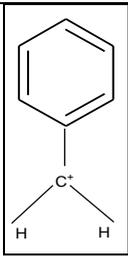
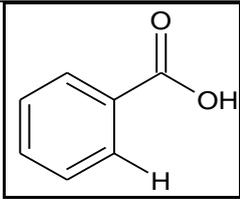
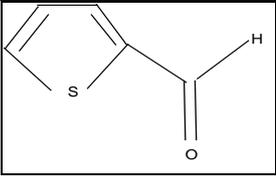


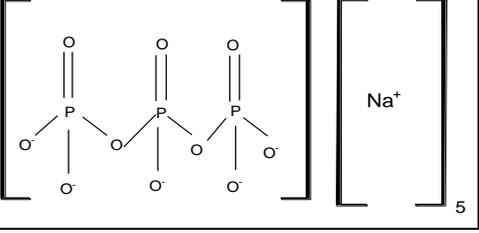
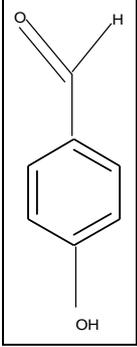
Fonte: autoria própria (2017)

Na figura a seguir estão expressos os reagentes com seus respectivos grupos funcionais, mais utilizados nas reações de modificações da quitosana para obtenção de derivados com base de Schiff, destacando seus grupos funcionais, evidenciando que em um mesmo artigo forma citados mais de um reagente, como o “Synthesis, characterization, and thermal decompositions of Schiff base polymers containing chitosan unit”, onde foram utilizados 4(quatro) reagentes, para a formação de derivados com base de Schiff: salicilaldeído, polipropileno, hidroxibenzaldeído e a vanilina (Karaer, & Kaya, 2015), na revista Iranian Polymer Journal. Outro reagente, bem descrito na literatura, usado na modificação de quitosana para formar derivados com base de Schiff, são os aldeídos, que foram citados em 2(dois) artigos distintos.

**Figura 11. Quadro com os reagentes utilizados na modificação da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras- chave: “Chitosan” and “Schiff base” and “antibacterial”, no período de 2007 a 2016.**

Reagente	Grupo funcional	Número de citações nos artigos
Vanilina		1

<b>Polipropileno</b>		<b>3</b>
<b>Cinamaldeído</b>		<b>1</b>
<b>Aldeído</b>		<b>2</b>
<b>Benzil</b>		<b>1</b>
<b>Salicialdeído</b>		<b>1</b>
<b>Tiofenocarboxaldeído</b>		<b>1</b>

<b>Tripolifosfato</b>		<b>1</b>
<b>Hidroxibenzaldeído</b>		<b>1</b>

Fonte: autoria própria (2017)

Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana dos demais polissacarídeos destaca-se a atividade antimicrobiana. Esse polímero provoca a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganence*, *Erwinia sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* e *Candida*. Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento. (Silva, Santos & Ferreira, 2006), essa diversidade foi encontrada na busca realizada nas bases de dados, conforme se visualiza na figura abaixo:

**Figura 12. Quadro com microrganismos usados nos testes de atividade antimicrobiana testadas nas modificações da quitosana para formação de derivados com Base de Schiff, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “ Schiff base” and “antimicrobial, no período de 2007 a 2016.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Número de citações</b>	<b>Classificação biológica</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2	Bactéria Gram-negativa
<i>Erwinia carotovora</i>	2	Bactéria Gram- negativa
<i>Alternaria alternata</i>	1	Fungo
<i>Botrytis cinerea</i>	1	Fungo
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	1	Fungo
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	Fungo
<i>Fusarium solani</i>	1	Fungo
<i>Pythium debaryanum</i>	2	Fungo
<i>Phytophthora infestans</i>	1	Fungo

Fonte: autoria própria (2017)

### **3.2. Análise das Patentes**

Na Tabela 3 encontram-se as combinações de palavras-chave utilizadas na busca das patentes nos bancos de depósitos EPO, USPTO, e INPI bem como o número de patentes encontradas para cada combinação. As buscas foram realizadas nos campos de título e abstract. O banco EPO foi o que retornou maior número de depósitos de patentes para todas as combinações de palavras-chave consultadas. As patentes depositadas com a palavra-chave “Chitosan” nos três bancos somaram-se 9.597. Combinando-se a esta a palavra-chave “Schiff base”, apenas 9 patentes retornaram na busca, e acrescentando-se a estas, a palavra -chave “ imines”, apareceram duas patentes na base USPTO, em seguida foram acrescentadas a busca as palavras- chaves : “ antimicrobial”, “antibacterial” e por fim” biological properties” e ambas as buscas não retornaram em nenhuma patente. As duas patentes patente do banco USPTO se tratavam, na verdade, das mesmas patentes, que se encontrava depositada no banco

EPO. Excluindo-se as repetições, restaram 7 patentes todas disponíveis no banco da EPO. As Tabelas 3, 4 e 5 foram construídas com base nestes resultados. Para a segunda busca foram analisadas as duas patentes da base EPO referentes ao resultado “Chitosan” and “imines”.

**Tabela 3. Número de depósitos de patentes encontradas nas bases EPO, USPTO e INPI.**

Palavras-chave	EPO	USPTO	INPI
<b>Chitosan</b>	8007	1412	178
<b>Chitosan and Schiff base</b>	7	2	0
<b>Chitosan and imines</b>	2	0	0
<b>Chitosan and imines and antimicrobial</b>	0	0	0
<b>Chitosan and imines and antibacterial</b>	0	0	0
<b>Chitosan and imines and biological properties</b>	0	0	0

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.2.1. Análise dos resultados das patentes, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “Schiff base”.

Na tabela abaixo, destaca-se que entre os anos de 2010 a 2016, tiveram depósitos de patentes referentes à busca e que todas foram depositadas na China, país que se destaca por ser um dos maiores produtores mundiais de quitina e quitosana (Abram 2004). E as universidades se destacam em número de depósitos, seguidas das empresas.

**Tabela 4 . Resumos das patentes depositadas na EPO até 31 de dezembro de 2016, resultantes da busca das palavras-chave “ Chitosan” and “ Schiff base”.**

Número do	Resumo	Classificação
-----------	--------	---------------

<b>depósito/ autores/ ano de depósito/ depositante.</b>		<b>internacional de patentes (CIP)</b>
CN105475375 Wei, et al. 2016 UNIVERSIDADE	A invenção trata da produção de um óleo essencial formado por oligossacarídeos de quitosana com base de Schiff. O derivado pode ser utilizado diretamente na área de agricultura com efeitos para inibir a ação de bactérias e fungos nas culturas atuando assim como biopesticida.	A01N25/30; A01N43/16; A01N65/28; A01P21/00; A01P3/00.
CN104530259 Guomei, et al 2015. UNIVERSIDADE	A presente invenção descreve um detergente de limpeza formado a partir da reação da quitosana com hidroxibenzaldeído formado um derivado de quitosana com base de Schiff. O derivado possui uso seguro, baixo custo e livre de veneno.	C08B37/08; C11D1/72; C11D3/22; C11D3/48
CN102863555 Zhanyong, et al 2013. UNIVERSIDADE	A invenção refere-se a um método de obtenção de derivado sulfato de quitosana com base de Schiff através da esterificação desta com ácido sulfúrico e aldeído protocatecuico, derivado solúvel em água. Sugere-se sua aplicação na área de medicamentos por ser dotado de forte atividade biológica.	C08B37/08.
CN102321196 Lin, Han, & Tan, 2012. EMPRESA	A invenção descreve um agente bacteriostático natural à base de quitosana, salicilaldeído esterilizado e salicilato de ácido salicílico para formação de um derivado de quitosana com base de Schiff. Este produto pode ser utilizado na área biomédica, pois	A01N43/16; A01P1/00; A01P3/00; C08B37/08.

	tem efeito inibitório frente aos patógenos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
CN101988202 Li, W., Li, Y., Zhang, S., Cao, K., Hou, B. (2011). EMPRESA	A presente invenção sugere um inibidor de corrosão em água do mar de aço carbônico, formado a partir de quitosana e carboximetil formado um derivado com base de Schiff, sendo hidrossolúvel e possibilitando um produto inibidor de corrosão verde "ecológico" com uma ampla gama de perspectivas promissoras e com alta eficiência e valor de aplicação.	C23F11/14.
CN101875704 Ying, et al 2011. UNIVERSIDADE	A invenção descreve um produto derivado de quitosana com base de Schiff, solúvel em água com capacidade de eliminar radicais livres e podendo ser usado como agente antioxidante e antibacteriano.	A61K31/722; A61P31/00; A61P39/06; C08B37/08.
CN102321271 Qian, et al 2010. UNIVERSIDADE	A presente invenção refere-se andaime poroso extracelular de osso natural, que pode ser usado na área biomédica, com micro-nanopartículas de quitosana com base de Schiff formada através de ligação cruzada. Esse andaime poroso com alta estabilidade química alia excelentes vantagens, como suavidade, alta elasticidade, razão de expansão de aumentada em cerca de 30 vezes, atividade biológica versátil, associados assim a propriedades mecânicas e excelente desempenho contra degradação.	A61L27/44; A61L27/46; A61L27/56; C08B15/00; C08B37/00; C08B37/04.

Fonte: autoria própria(2017)

Em relação à CIP, a maioria das patentes foi classificada internacionalmente na seção C (Química; Metalurgia), classe 08 (compostos macromoleculares orgânicos; preparação ou seu processamento químico), subclasse B (polissacarídeos; seus derivados).

A segunda classificação internacional mais citada foram as A01P e A01N, enfatizando suas subclasse P e N as invenções estão relacionadas a preparações com finalidades que vão desde a área de ciências médicas ou veterinária, agricultura, cultura de células entre outros relacionados à área da saúde ou biofarmacêutica. A busca retornou em uma patente que trata da ação bacteriostática da quitosana e de seus derivados para a formação de Base de Schiff, enfatizando as bactérias mais estudadas que são *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o fungo da cerveja *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo assim aplicações nas áreas, biomédica, agricultura e na indústria.

### **3.2.2. Análise dos resultados das patentes, resultado da busca com as palavras-chave: “Chitosan” and “imines”.**

Na tabela abaixo estão apresentados os dados das 2(duas) patentes encontradas na base USPTO, enfatizando os seguintes dados: numero de depósito, ano, autores, depositantes, classificação internacional de patentes (CIP) e o resumo de cada patente.

**Tabela 5 . Resumos das patentes depositadas na USPTO até 31 de dezembro de 2016, resultantes da busca das palavras-chave “ Chitosan” and “ imines”.**

<b>Número de depósito/ autores/ ano</b>	<b>Depositante/ CIP</b>	<b>Resumo</b>
---	-----------------------------	---------------

CA2950339 Lizio, et al. 2015.	Empresa. A61K.	A invenção refere-se a uma nanopartícula de quitosana, formada a partir da reação desta com polietileno, formando derivado com ligações iminas.
US4835265 Muzzarelli, R. 1989	Universidade. C08B.	A invenção sugere um gel formado à base de quitosana com poliglucosamina e ligações iminas, com elevado poder adsorvente e seletivo a interações com íons metálicos.

Fonte: autoria própria (2017)

#### **4. CONCLUSÃO**

As modificações realizadas na quitosana que resultaram em derivados com base de Schiff foram testadas com efeito promissor em diversas áreas de atuação como: biomédica, indústria e agricultura. Os reagentes Benzaldeído, Carboximetil, Metoxibenzaldeído, Salicialdeído e Cinnamaldeído foram os mais utilizados neste tipo de modificação.

Apesar de ser uma área ainda pouco explorada, a associação do estudo dos artigos e das patentes permitiu constatar que os derivados provenientes deste tipo de modificação podem ser utilizados nas mais diversas áreas da saúde devido à versatilidade de formas, que estes derivados podem assumir, como por exemplo, filmes, nanopartículas, géis e pós, o que torna possível sua utilização nos mais diversos tipos de formulações farmacêuticas, tudo isso associado ao seu potencial para melhorar a atividade antimicrobiana e citotóxica da quitosana e derivados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, F.R.(2009). Polyelectrolyte derivatives of chitosan: preparation and characterization of N,N,N- trimethylchitosan and O,N- carboxymethylchitosan. *Biomaterials Science*, 2,107-121.

Aranaz, I., Harris, R., & Heras, A.(2010). Chitosan amphiphilic derivatives, chemistry and applications. *Current Organic Chemistry*, 14, 308-330.

Araújo, E.L., Barbosa, H.F.G., Dockal, E.R., Cavaleiro, É.T.G.(2017).Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes of biopolymeric Schiff bases of salicylaldehydes and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 168-176.

Azevedo, V.V., Chaves, S.A., Bezerra, D.C., Lia Fook, M.V., Costa, A.C. F.(2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2, 27-34.

Berger, R.R. L., Stamford, M.Ch. T., & Stamford, P.N.(2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura, *Revista Ibero americana de Polímeros*, 12, 195-215.

Chen, L., Yumin, D., & Zeng, X.(2003). Relationship between the molecular estrutura and moisture-absortion and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan. II. Effect of degree de desacetilations an carboxymethylation. *Carbohydrate Research*, 338, 333-340.

Chetouani, A., Follain, N., Marais, S., Benachour, D., Le Cerf, D. (2017). Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* ,97, 348-356.

Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: antimicrobial and anti-proliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 163-171.

Eldin, M.S.M , E. A. Soliman, E.A, A.I., Hashem, A.I , Tamer, T.M.(2008). Antibacterial Activity of Chitosan Chemically Modified *Trends in Biomaterials & Artificial*, 22 , 125-137.

Freddo, A.R., Mazaro, S.M., José Bruno, E.L., Wagner -Júnior, A.(2014). A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*. Revista Ciência Rural, 44,1-4.

Gonsalves, A.A.G., Araújo, C.R.M., Soares, N.A., Goulart, M.O.F., Abreu, F.C.(2011). Diferentes Estratégias para a Reticulação de Quitosana. Química Nova, 34, 1215-1223.

Goy, C. R., Morais, T. B. S., & Odilio, B.G.(2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. Revista Brasileira de Farmacognosia, 26, 122-127.

Guibal, E.(2004). Interactions of metal ions chitosan-based sorbents: a review. Separation and Purification Technology, 38, 43-74.

Guomei, X., Chenggen, X., Huaifen, L., Hongrong, H.(2015). Chitosan type Schiff base, preparing method thereof and feather cleaning deodorant based on same. CN104530259.

Karaer, H., & Kaya, I.(2015). Synthesis, characterization, and thermal decompositions of Schiff base polymers containing chitosan unit. Iranian Polymer Journal, 24, 471-480.

Sadeghi-Kiakhani, M., Mokhtar, A., & Kamaladin, G.(2013). Application of a biopolymer chitosan-poly(propylene)imine dendrimer hybrid as an antimicrobial agent on the wool fabrics. Iranian Polymer Journal, 22, 931-940.

Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical Reviews, 104, 6017-6084.

Laranjeira, M.C.M., & Favere, V.T.(2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, Química Nova, 32, 672-678.

Li, W., Li, Y., Zhang, S., Cao, K., Hou, B. (2011). Carboxymethyl chitosan oligosaccharide schiff base organic carbon steel seawater corrosion inhibitor and application thereof. CN101988202.

Lima, E.C.N. L.(2010). Quitosana quimicamente modificada através de cloretos orgânicos e o uso como fonte para remoção catiônica. Tese de doutorado em Ciências. Universidade Estadual de Campinas.

Lin, Q., Han, Y., & Tan, F. (2012). O-salicylic acid esterified oligo-chitosan salicylaldehyde Schiff base bacteriostatic agent and preparation method thereof. CN102321196.

Lizio, R., Grimm , S., Petereit, H-U., Epple, M., Dordelmann, G.(2015). Nanoparticle. CA2950339.

Silva,H.S.R.C.;Santos,K.S.C.R.;Ferreira.E.I.(2006).Chitosan: hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. Química Nova, 29.4, 776-785.

Marin,L.,Ailincal,D.,Mares,M.,Paslaru,E.,Cristea,M.,Nica,V.,Simionescu,B.C.(2015).Imino chitosan biopolymeric films, obtaining, self- assembling, surface antimicrobial properties. Carbohydrates' Polymers, 117,762-770.

Mourya, V. K & Inamdar, N. N., (2008).Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. Reactive & Functional Polymers, 68, 1013-1051.

Muzzarelli, R.(1989) Substituted and crosslinked glucans, process and intermediates for preparing them and use thereof. US4835265.

Osório, L.R., Lima,I.S., Barreto,H.M., Osajima,J.A., Silva Filho, E.C.(2016). Antibacterial Activity of a Chitosan Derivative Obtained in the Absence of a Solvent. Materials Science Forum, 869, 869-873.

Paiva, W. S., Souza- Neto, F. E. & Batista, A.C. L.(2014). Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. Perspectivas online biologia e saúde, 13, 37-43.

Perobelli, G., Cavalcante, N. G. S., Pontes, A.C.C.B.,Pontes, D. L.(2015).Esferas de Quitosana: Produção de Bases de Schiff.Chemical Engineering Proceedings,3,402-409.

Qian, J., Xu, M., Jin, X., Yang, T. (2010). Chitosan oligosaccharide Schiff base phosphonate as well as preparation method and application thereof . CN102321271.

Quelemesa, P.V., De Araújo, A.R., Plácido, A. Delerue-Matos, C., Maciel, J. S. Bessa, L. Ombredane, A.S., Joanitti, G.A., Soares, M.J.S., Eatona, P., Silva, D.A., Leite, J.R.S.A. (2017). Quaternized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. *Carbohydrate Polymers*, 157, 567-575.

Rosa, J.L. Barros, R.F. & Santos, M.O. (2016). Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (ehc). *Revista saúde & ciência em ação*, 2, 66-78.

Sabudin, S., Derman, M.A., Zainol, I., Noorsal, K. (2012). In Vitro Cytotoxicity and Cell Seeding Studies of a Chitosan-silver Composite for Potential Wound Management Applications. *Journal of Engineering Science*, 8, 29-37.

Santos, J. E., Soares, J. P., Dockal, E. R., Campana Filho, S. P., Cavalheiro, E. T. G. (2003). Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens Polímeros: Ciência e Tecnologia, 13, 242- 249.

Santos, M.C., Cirilo, A. T. O. & Nunes, M. L. (2011). Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). *Scientia plena*, 7, 1-3.

Sashikala, S & Shafi, S. S. (2015). Synthesis, Characterization and Antimicrobial activity of chitosan 4-chlorobenzaldehyde Schiff base. *Research Journal of Chemical Sciences*, 5, 27-33. Sayari, N., Sila, A., Abdelmalek, B .E., Rihab, B. A., Semia, E-C., Ali, B., Rafik, B. (2016).

Suresh, R., Deepa, M. & Moganavally, P. (2016). A Study on Biological and Catalytic Activity of CSB Derivative and its Cobalt and Nickel Complexes. *Oriental journal of chemistry*, 32, 2509-2516.

Wei, X., Wenqing, Z., Zhizhen, X., Lingfan., Z., Shu, Z., Tianyi., G., Peng,Z., Haiyang., J., Si., Z., Nianqiang,J.(2016). Chitosan oligosaccharide-Schiff base composite essential oil-containing plant-derived disease-resistant activator. CN105475375.

Ying, G., Xiong,W., Wang, H., Yi,Y.(2011). Water-soluble chitosan schiff base derivative and preparation method and application thereof. CN101875704.

Yu, C.H., Pei, J.C., Zhang, F.D., Dun, Q.X., Wang, B.(2014).Chitosan grafted with vanillin: Its antioxidant and antibacterial activity and application in papermaking. China Pulp and Paper, 33, 1-7.

Zhanyong, G., Jianming,R. Ting, Z., Fang,D., Qing, L.(2013). Chitosan sulfate Schiff base and synthetic method thereof. CN102863555.

**CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA  
E DERIVADOS COM ANIDRIDO FTÁLICO E POSTERIOR REAÇÃO COM  
ETILENODIAMINA**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA E  
DERIVADOS COM ANIDRIDO FTÁLICO E POSTERIOR REAÇÃO COM  
ETILENODIAMINA**

*Janete Martins Sousa<sup>1</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais,*

*Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV*

## RESUMO

As inserções de cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas na molécula de quitosana podem melhorar a sua atividade antibacteriana, ampliando sua faixa de aplicação em diversas áreas das ciências médico- farmacêuticas. O objetivo deste trabalho foi ampliar a atividade antibacteriana da quitosana através da reação de modificação com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE). A quitosana e derivados obtidos foram caracterizados por Análise elementar, Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG), onde foi possível comprovar a modificação química. Ambos os materiais apresentaram maior efeito inibitório antibacteriano frente à bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, merecendo destaque a atividade antibacteriana frente a bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*, valores acima de 70% de efeito inibitório, sendo este um resultado promissor. Os ensaios com células de fibroblastos humanos pelo teste de redução ao brometo de [3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difenil tetrazolio (MTT)], não indicaram toxicidade nos materiais. Ambos os materiais derivados se mostraram promissores para aplicações biomédicas visto que aliaram excelente atividade antibacteriana frente às cepas gram-positivas e gram-negativas e não apresentaram cito toxicidade.

Palavras-Chave: Quitosana; Modificação; Atividade antibacteriana; Citotoxicidade.

## ABSTRACT

The insertions of hydrophobic and hydrophilic chains in the chitosan molecule can improve its antibacterial activity, expanding its range of application in several areas of the medical-pharmaceutical sciences. The objective of this work was to increase the antibacterial activity of chitosan by reaction with phthalic anhydride (QF) and subsequent reaction with ethylenediamine (QFE). The chitosan and derivatives obtained were characterized by Elemental Analysis, Nuclear Magnetic Resonance of Carbon 13 (<sup>13</sup>C NMR), X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric (TG) where it was possible to prove the chemical modification. Both materials presented higher antibacterial inhibitory effect against the Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus*. The antibacterial activity against Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, values above 70% of inhibitory effect, was a promising result. Human fibroblast cell assays by the [3- (4,5-dimethylthiazolyl) -2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)] bromide reduction test did not indicate toxicity in the materials. Both derived materials have shown promise for biomedical applications since they allied excellent antibacterial activity against gram-positive and gram-negative strains and showed no cytotoxicity.

Keywords: Chitosan; Modification; Antibacterial activity; Cytotoxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

Materiais poliméricos orgânicos pertencem a um grupo de materiais constituídos por longas cadeias de átomos de carbono na cadeia principal, o que confere a eles uma série de características que os diferenciam em relação aos outros polímeros. Estes materiais com propriedades antimicrobianas tomaram um crescente interesse tanto do ponto de vista acadêmico quanto do ponto de vista industrial e de saúde pública (Munoz- bonila, & Garcia, 2012).

O aumento do interesse está nas possibilidades desses materiais apresentarem vantagens na sua composição químicas, serem amplamente encontrados na natureza, e adquiridos a partir de fontes naturais ,seja de origem vegetal ou animal, destacam-se assim, os materiais poliméricos, tais como: celulose, quitina, quitosana, entre outros (Costa-Silva, et al. 2006; Mendes, et al. 2011; Azevedo, et al. 2007; Sayari, et al. 2016).

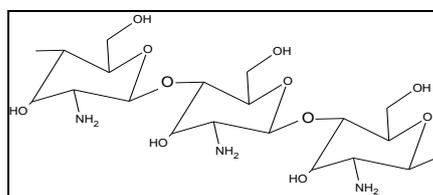
A quitina e a quitosana são polissacarídeos e exemplos desses materiais, ambas constituídas pela repetição dos monômeros 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-acetamida-2-desoxi-D-glicopirranose unidos por ligações beta glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$ (Pires,Bierhalz & Moraes, 2015; Crini, & Badott, 2008).

A quitosana é obtida pela reação de desacetilação alcalina da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, sendo assim assumido como o segundo composto orgânico mais abundante da natureza, superado pela celulose, tem sua aplicação em relevância por reunir diversas características atraentes (Mendes, et al. 2011; Azevedo, et al. 2007), tais como ser um produto natural, com baixa toxicidade, custo acessível , renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (Laranjeira, & Favere, 2009).

A quitosana é considerada como um polieletrólito catiônico devido a presença dos grupos funcionais amino ( $\text{NH}_2$ ), bastante reativo, e duas hidroxilas ( $\text{OH}$ ) presentes na estrutura da

quitosana permitem que a mesma seja quimicamente modificada, proporcionando ao polímero uma maior disponibilidade de grupos pendentes que possibilitam um comportamento nucleófilo, facilitando a ocorrência de diversas modificações químicas tais como N-alquilação, N-acilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (Vinsová & Vavříková, 2011; Mohamed, et al. 2013; Quelemesa, et al. 2017; Sabadurin, et al. 2007), a funcionalização não afeta estruturalmente a cadeia polimérica da quitosana, pois mantém a estrutura física e as propriedades bioquímicas originais e agrega ao polímero propriedades melhoradas, conforme mostra a Figura 1 (Kumar, et al. 2004; Laranjeira, & Favere, 2009; Santos, et al. 2003; Mukhopadhyay, et al. 2012; Assis & Silva, 2003, Mendes, et al. 2016).

**Figura 1. Estrutura química da quitosana.**



Fonte: autoria própria (2017)

Derivados de quitosana N-acilados podem ser obtidos partir da reação da quitosana com anidridos orgânicos. A incorporação de grupos hidrofóbicos na cadeia da quitosana confere a esta novas propriedades físico-químicas, tais como, géis, pós, filmes, membranas, fibras, entre outras (Mourya & Inamdar, 2008; Layek & Singh, 2012; Zong, et al. 2000; Airoidi, 2008).

A inclusão de grupos funcionais aminas na estrutura da quitosana tem chamado bastante atenção por parte dos pesquisadores, pois as interações catiônicas do grupo funcional (NH<sub>2</sub>) da quitosana com as aminas introduzidas sugerem uma diversidade de aplicações, nas quais se destacam as propriedades biológicas, dentre estas se expressam as atividades

antibacteriana (Sayari, et al. 2016), antifúngica (Berger, Stamford & Stamford, 2011), antimicrobiana (Costa- Silva, Santos & Ferreira, 2006) e antitumoral (Azevedo, et al. 2007).

Devido ao vasto leque de aplicações da quitosana, apenas um pequeno número delas será apresentado a seguir. Na indústria farmacêutica e de cosmético, tem sido aplicada na forma de microesfera e microcápsula (Gupta & Jabrail, 2008; Pandey & Hhuller, 2004; Shanmuganathan, et al. 2008; Dantas, et al. 2016) na terapia de câncer (Son, et al. 2003; Ta, Dass & Dustan,2008), na engenharia de tecidos tem sido utilizada como suporte (Laranjeira, & Favere , 2009), enxerto de pele artificial e suturas (Shanmuganathan, et al. 2008). Na agricultura, tem sido aplicada como biofilme na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deterioração por microrganismos, para estimular o sistema imune da planta e protegê-la contra o ataque de patógeno (Hernandez-Lauzardo, et al. 2008; Fráguas, et al.2015). Na área médica tem sido utilizada como antioxidante anti-inflamatório e anticoagulante. Na odontologia e na medicina oral é usada como revestimento de próteses e dispositivos biomédicos, suturas cirúrgicas e implantes dentários (Azevedo, et al. 2007).

O espectro de atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados estende-se aos fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo mais ativos frente a bactérias Gram positivas a bactérias Gram negativas (Jeon, Park & Kim, 2001; No, et al. 2002; Muzzarellia, et al. 2012).

Certo de suas propriedades antimicrobianas, a quitosana é um material especialmente promissor para embalagem de alimentos (Ahmed, & Ikram, 2015) e para a utilização na cicatrização de ferimentos (Tu, et al. 2015). Além disso, sua modificação química pode oportunizar o aumento do seu efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos e contribuir no combate às enfermidades causadas por microrganismos resistentes.

Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo modificar e caracterizar quimicamente a quitosana(Q) e seus derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina

(QFE), pelas técnicas Análise Elementar, Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG), e investigar a atividade antibacteriana da quitosana e derivados frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e avaliar o potencial citotóxico da quitosana e derivados em células de fibroblastos humanos.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Materiais e reagentes**

A quitosana com grau de desacetilação (95%) foi obtida da Primex, extraída de carapaça de caranguejo. Os reagentes utilizados foram etilenodiamina (VETEC), anidrido ftálico (VETEC), ácido acético (VETEC), o solvente N-N'-dimetilacetamida-DMA (SIGMA-ALDRICH), Dimetilsulfóxido (DMSO- SIGMA) e cloreto de sódio (IMPEX). Meios de cultura Brain Heart Infusion -BHI (HIMEDIA) e Ágar Nutriente (HIMEDIA), GM07492A (Fibroblasto Humano), DMEM (GIBCO/ THERMOFISHER), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF- NUTRICELL). Antibióticos penicilina e estreptomicina a 10U/mL<sup>-1</sup> (SIGMA). Todos sem prévia purificação.

### **2.2. Modificações da Quitosana**

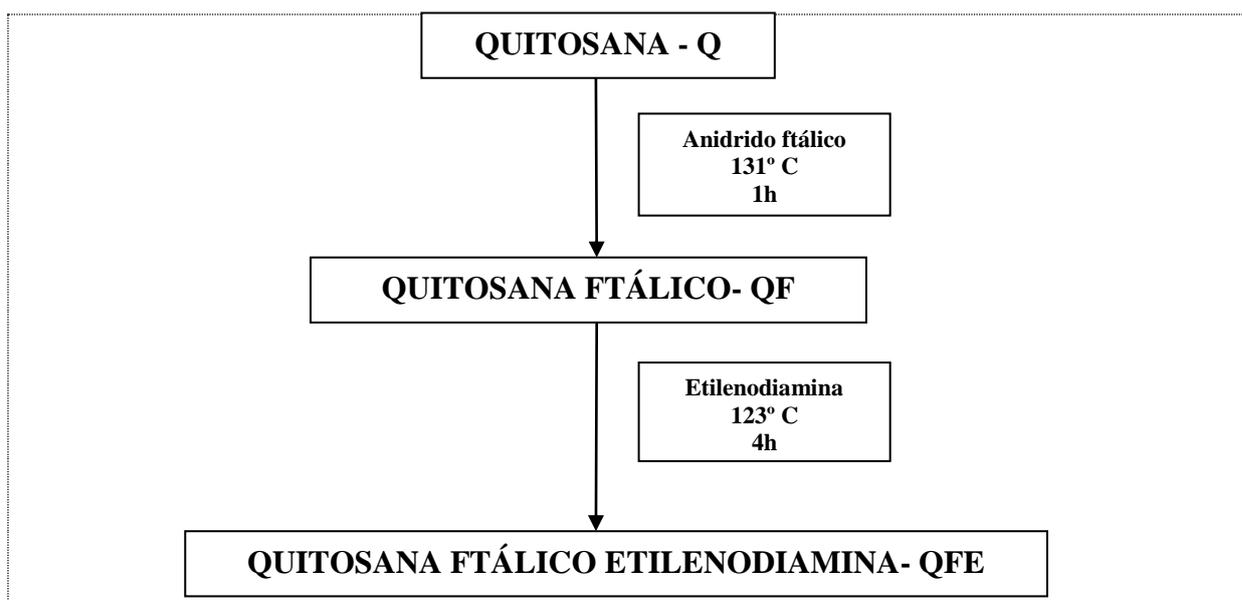
#### **2.2.1. Modificação com anidrido ftálico**

A modificação da quitosana com anidrido ftálico foi realizada conforme Vieira, et al. 2010. Primeiramente colocou-se 11,5g anidrido ftálico em um balão de fundo redondo e sob agitação e aquecimento até sua fusão a 131 °C, em seguida foi adicionado 5g de quitosana e após 1 hora de agitação e aquecimento, 25 mL de DMA, foi acrescentado para finalização da reação. Em seguida o produto foi retirado, lavado e centrifugado várias vezes com água de Milli-Q, verificando o pH (potencial Hidrogeniônico) a cada três lavagens, e quando a faixa de pH, estava em meio neutro, o produto obtido foi retirado e seco em uma estufa a 45°C, em seguida macerado, armazenado e denominado QF.

#### **2.2.2. Modificação com etilenodiamina**

A reação posterior do derivado QF com etilenodiamina foi realizada conforme descrito por Osório, 2013. Para a reação acontecer 3,5g do derivado QF reagiu com 10mL de etilenodiamina, sob-refluxo e agitação magnética durante 4 h a 123 °C. Em seguida, o sólido foi lavado e centrifugado por várias vezes com água de Milli-Q para a retirada do excesso de reagente, verificando o pH (potencial Hidrogeniônico) a cada três lavagens, e quando a faixa de pH, estava em meio neutro, o produto obtido foi retirado e seco em uma estufa à 45°C, em seguida macerado, armazenado e denominado QFE.

**Figura 2. Fluxograma do processo de modificação química da quitosana.**



Fonte: autoria própria (2017)

### 2.3. Caracterização do Material

A quitosana e os derivados obtidos foram caracterizados pelas seguintes técnicas:

#### 2.3.1. Análise elementar

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

### **2.3.2. Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear do 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 5s e tempo de contato de 1ms.

### **2.3.3. Difração de Raios-X (DRX)**

Os gráficos de Raios – X, foram obtidos com o instrumento Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa  $2\theta$  entre  $1,4$  e  $70^\circ$ . A velocidade de varredura foi de  $5^\circ \text{ min}^{-1}$ , utilizando a fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , com comprimento de onda  $154,06 \text{ pm}$ .

### **2.3.4. Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando pastilhas de KBr com 1% de amostra, na faixa de  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , com 32 acumulações, em um espectrômetro Bomem - Hartmann & Braun MB, com transformada de Fourier.

### **2.3.5. Análise Termogravimétrica (TG)**

As curvas termogravimétricas foram obtidas através do aparelho DuPont, modelo 9900, com fluxo de aquecimento de  $10^\circ \text{C min}^{-1}$ , em atmosfera de argônio, a temperatura de  $25^\circ \text{C}$  a  $1000^\circ \text{C}$ .

## **2.4. Testes antibacterianos**

### **2.4.1. Cepas bacterianas**

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

#### **2.4.1.1. 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 24h. A partir desta cultura em BHI preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala de Mac Farland (~  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, 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 e  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

#### **2.4.1.2. Teste de Contato Direto**

Para avaliação da atividade antibacteriana, soluções da quitosana e de seus derivados foram preparadas com 0,001 g de cada material quitosana(Q), quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE), foram preparadas utilizando ácido acético 2% como solvente, com concentração  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .

O teste de contato direto em meio sólido foi realizado de acordo com Zheng, & Zhu, 2003. Para realização destes ensaios 100µL da suspensão padronizada  $1,5 \times 10^4$  UFC/mL(*S.aureus*) e  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL (*E.coli*) foi transferida para placas de petri contendo o meio ágar nutriente. Em cada placa, foi adicionado 100µL da solução teste. As placas foram semeadas com o auxílio de uma alça de drigalski 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:

**Figura 3. Equação do efeito inibitório.,**

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_2} \times 100$$

Onde  $\eta$  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.

#### **2.4. Avaliação da Citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo teste de redução ao 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(Q) e de seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE). As células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, mantidas em meio de cultura enriquecida com soro fetal bovino (SBF) e antibióticos (penicilina e estreptomicina 10U/mL) e simultaneamente foram preparados os extratos das amostras Q, QF e QFE onde foram pesados 20mg de cada material e colocados em 100mL (do meio de cultura DMEM), gerando a concentração 20mg/mL, sendo incubadas em estufa 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, por 24(vinte e quatro) horas.

Após as primeiras 24h, o meio de cultura DMEM foi substituído pelo extrato de cada amostra, realizados em triplicatas, e mantidas em condições de cultivo por mais 24(vinte e

quatro) horas. Depois dessas 48h, os poços foram lavados com PBS (1x), e foram adicionados 50 $\mu$ L de MTT. Em seguida a placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por mais 4 (quatro) horas. Após esse período, foi adicionado 100 $\mu$ L de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Em seguida as amostras foram agitadas, por aproximadamente 1 minuto, mantidas em ultrassom por 15 minutos e novamente agitadas por mais 1 minuto.

Como controle positivo (C+) de citotoxicidade para os materiais, foi utilizado o Meio Dulbecco Mem (DMEM) acrescido com 30% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Como controle negativo (C-) de material não citotóxico, foram utilizados o Meio Dulbecco Mem (DMEM) acrescido de soro bovino fetal (SBF) e os antibióticos (penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma)). Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 570nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa da amostra e o controle negativo.

## **2.5. Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três experimentos independentes. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey no Graphpad Prism 7.0 e Software Assistat, tomando-se o valor de  $p < 0,05$  como nível máximo de significância estatística (Pocinho & Figueiredo, 2017).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1.1. Análise elementar

Os resultados da análise elementar com os percentuais e as quantidades em  $\text{mmol g}^{-1}$  de carbono, nitrogênio, da quitosana e de seus derivados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos.**

<b>Materiais</b>	<b>%C</b>	<b>%N</b>	<b>C(<math>\text{mmol g}^{-1}</math>)</b>	<b>N(<math>\text{mmol g}^{-1}</math>)</b>	<b>C/N experimental</b>	<b>C/N teórico</b>
<b>Q</b>	40,11	7,20	33,42	5,14	6,50	6
<b>QF</b>	48,40	4,34	40,33	3,10	13,00	14
<b>QFE</b>	40,48	7,90	33,73	5,64	6	5,3

Fonte: autoria própria (2017)

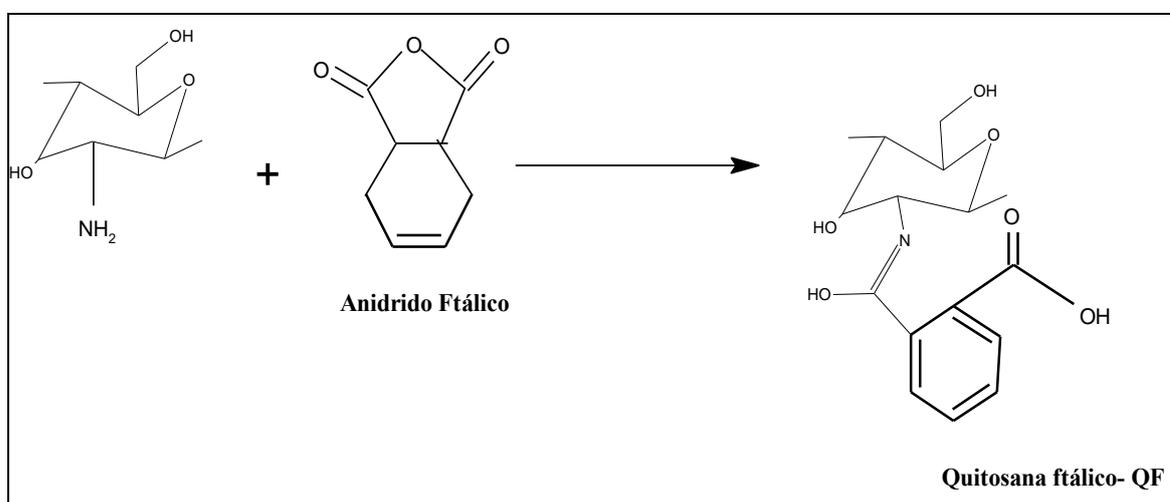
O percentual de carbono do derivado QF apresentado na Tabela 1 é maior em relação à quitosana, e pode-se observar que houve um aumento na quantidade molar desse elemento quando anidrido ftálico foi introduzido à matriz polimérica da quitosana, por outro lado o teor de nitrogênio foi menor, uma vez que, a quitosana possui  $5,14 \text{ mmol g}^{-1}$  de nitrogênio e, após reação com anidrido ftálico, o valor foi reduzido para  $3,10 \text{ mmol g}^{-1}$ , pois o nitrogênio estava presente apenas na quitosana ocasionando assim um aumento na razão C/N de 6,50 para 13,00 comprovando a eficácia da reação.

A introdução das aminas, com etilenodiamina, ao derivado QF na Tabela 1 conduziu ao aumento da quantidade de nitrogênio observado no material QFE como, também uma

diminuição da relação C/N no mesmo quando comparado com o derivado QF como mostrado nos esquemas nas Figuras 4 e 5.

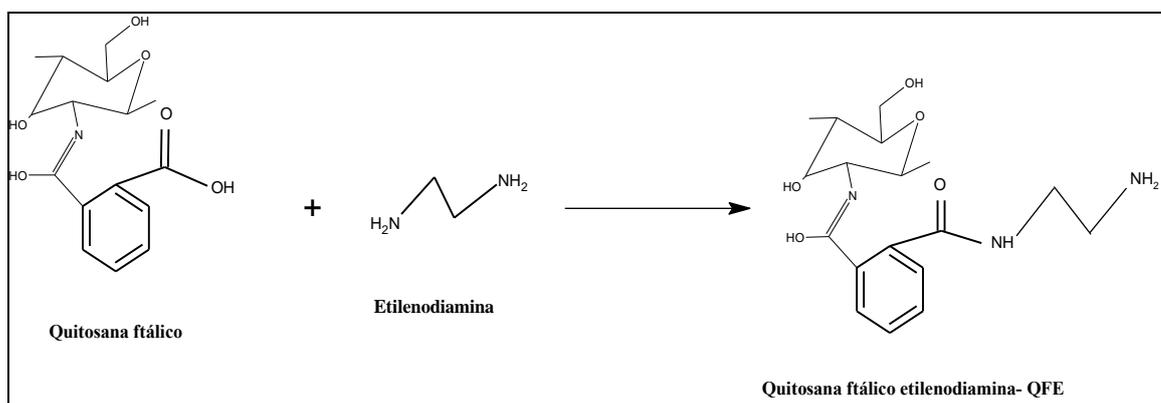
Abaixo estão representadas as propostas de esquema reacional das modificações química realizadas na quitosana, resultando no derivado QF, após reação desta com anidrido ftálico e posterior reação deste com etilenodiamina, resultando no derivado QFE.

**Figura 4. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana(Q) com anidrido ftálico (QF).**



Fonte: autoria própria (2017)

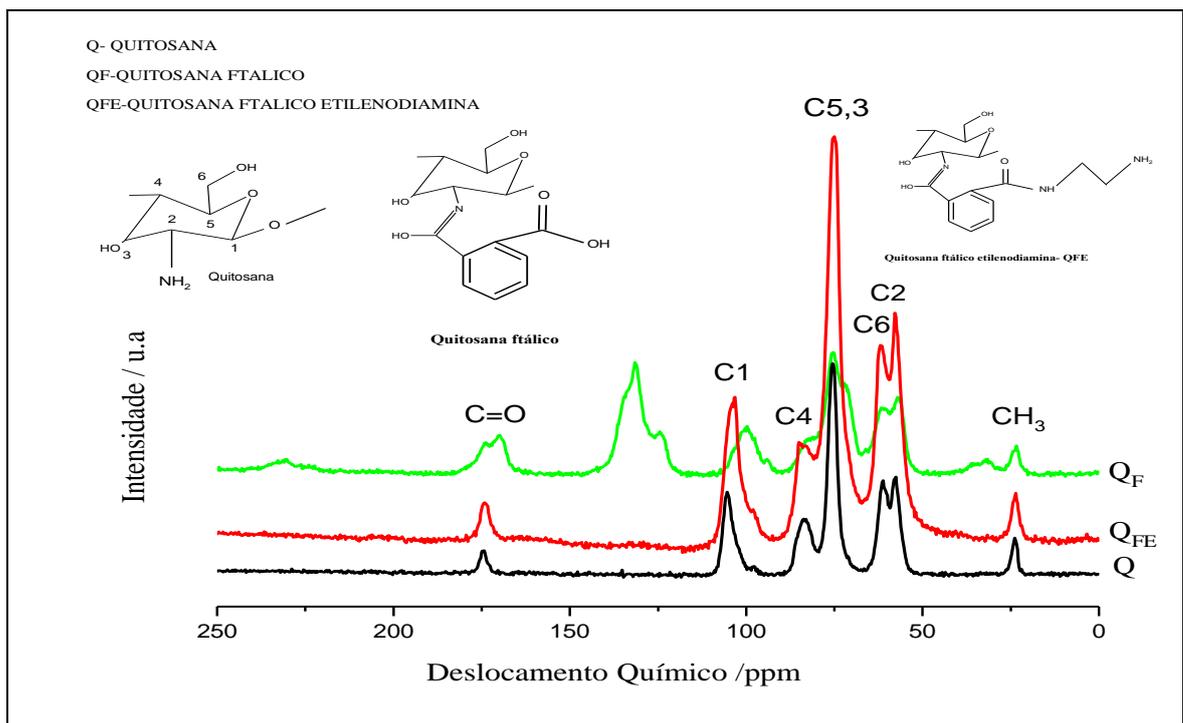
**Figura 5. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana ftálico (QF) e sua reação com etilenodiamina (QFE).**



### 3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 no estado sólido para a quitosana (Q) e os derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), estão na figura 6.

**Figura 6. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 no estado sólido da quitosana (Q) e os derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).**



A quitosana e seus derivados apresentam os deslocamentos característicos em 105.29 e 83.56 referente aos carbonos 1 e 4, respectivamente, que são responsáveis pela ligação para formação da cadeia polimérica. O pico mais intenso em torno de 75.46 ppm, refere-se aos

carbonos 3 e 5, que são carbonos secundários ligados a uma hidroxila e a outros carbonos. Em 61.45 e 57.85 ppm, aparece um sinal largo com um ombro, e esses deslocamentos químicos referem-se ao carbono primário (C6), contendo uma hidroxila e o carbono (C2) característico da quitosana ligado ao grupamento amina, como também sinais em 23.85 e 174.53ppm relacionados respectivamente aos grupos metila (CH<sub>3</sub>) e carbonila (C=O) de amida remanescentes da quitina, devido a quitosana não se está totalmente desacetilada (Park. et al.2010).

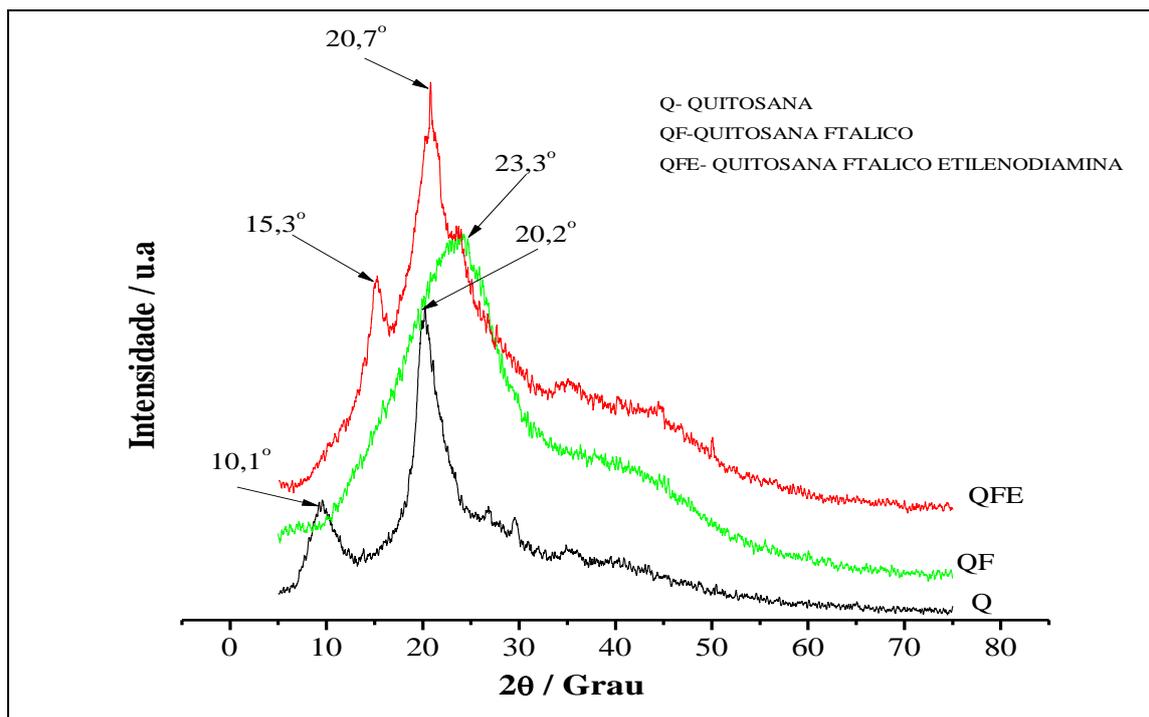
### **3.1.3. Difração de Raios-X**

Os dados de difração de raios-X foram empregados com a finalidade de verificar o grau de cristalinidade dos materiais provenientes das reações. A Figura 6 apresenta os difratogramas de quitosana(Q), quitosana ftálico (QF) quitosana ftálico etilenodiamina (QFE).

A quitosana apresenta um perfil semicristalino, como pode ser observado na Figura 1 com dois picos característicos em  $2\theta = 10,1^\circ$  e  $2\theta = 20,2^\circ$  que correspondem às regiões não-cristalina e cristalina, respectivamente (Luo, et al. 2011; Cruz, et al. 2016).

Podemos observar na Figura 6 o desaparecimento do pico no plano amorfo na região de  $2\theta = 10,1^\circ$  no difratograma de QF quando comparada com a quitosana como também um alargamento e deslocamento de seu pico na região de  $2\theta = 23,3^\circ$ , o que pode está relacionado a presença dos grupos hidrofóbicos presentes no anidrido ftálico, esses grupos levam a uma diminuição nas ligações de hidrogênio provocando uma reorganização no material e consequentemente um aumentando na cristalinidade do material (Braz, 2015; Cruz,et al. 2016).

**Figura 7. Difratograma de Raios-X da quitosana (Q) e dos derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).**



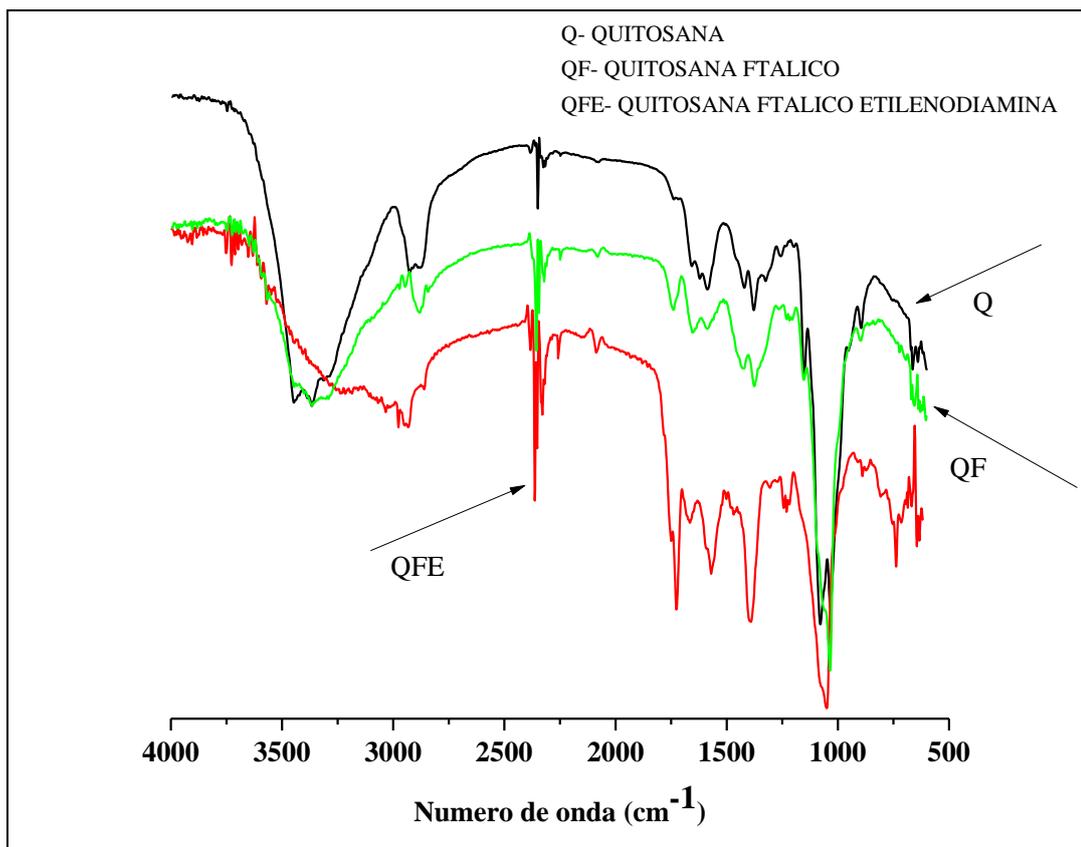
Fonte: autoria própria (2017)

Após incorporação do etilenodiamina no derivado QFE, podemos observar o reaparecimento dos planos semelhantes à quitosana com a reorganização das ligações de hidrogênio formadas novamente e consequentemente uma diminuição da cristalinidade de QFE quando comparada com QF.

#### 3.1.4. Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

O espectrograma da quitosana (Q), dos derivados de quitosana com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) são apresentados na Figura 8.

**Figura 8. Espectro na região de infravermelho da quitosana (Q) e de seus derivados modificados anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), em pó para solução injetável em pastilhas de brometo de potássio.**



Fonte: autoria própria (2017)

O espectro de FTIR da quitosana (Q) apresenta as seguintes bandas características: uma banda intensa na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  a  $3100\text{ cm}^{-1}$  referente às vibrações de estiramento dos grupos N-H assim como também OH das hidroxilas relacionados à presença de água que acompanha o biopolímero (Silva, et al. 2016).

A banda na região de  $2930 - 2860\text{ cm}^{-1}$  resultantes dos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H do polímero. As bandas entre  $1650-1630\text{ cm}^{-1}$  estão associadas ao estiramento C=O de amida I, pois a quitosana não está totalmente desacetilada (Oliveira, Oliveira & Fook, 2015). A região  $1586\text{ cm}^{-1}$  é resultado da sobreposição de duas vibrações: a vibração do grupo amida (designada por amida II) e a vibração de deformação da ligação das aminas primárias presentes nas unidades desacetilada da quitosana. A banda intensa aparece na região de  $1058\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento C-O-C do anel glicopiranosídeo, como também os modos vibracionais associados à ligação beta glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$  estão na região

de  $1153\text{ cm}^{-1}$  e  $893\text{ cm}^{-1}$  referentes aos carbonos 1 e 4, respectivamente (Monteiro, et al. 2015; Da Silva, et al. 2016).

Podemos observar no espectro de QF quando comparado com Q o surgimento das bandas na região de  $1739\text{ cm}^{-1}$  e  $1655\text{ cm}^{-1}$  referentes à ligação C=O de ácido carboxílico e C=N (imina) formada respectivamente, como também o surgimento da banda intensa na região de  $710 - 690\text{ cm}^{-1}$  de deformação angular de OH adjacentes (anéis monossubstituídos) o que confirma a eficácia da reação.

No espectro de QFE quando comparada com QF podemos observar o desaparecimento da banda na região de  $1739\text{ cm}^{-1}$  da ligação C=O acoplada com deformação OH do ácido carboxílico, como também o desaparecimento da banda em  $1632\text{ cm}^{-1}$  relacionada à ligação C=C do anel aromático, a banda na região de  $1662\text{ cm}^{-1}$ , refere-se à ligação C=N (imina) e o surgimento da banda na região de  $1565\text{ cm}^{-1}$  para o derivado em virtude da ligação N-H de amina primária quando incorporada no derivado QFE, confirmando a eficácia da reação.

Na tabela 2 encontram-se o resumo das regiões onde foram encontradas as respectivas bandas do FTIR, na quitosana (Q) e nos derivados QF e QFE.

**Tabela 2. Principais bandas do espectro de infravermelho da quitosana (Q) e derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE).**

GRUPO FUNCIONAL/ MATERIAL	NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )		
	Q	QF	QFE
NH <sub>2</sub> e OH	3400 a 3100	3590-3335	3690-3017
C-H	2930 – 2860	2919	2932
C=O- Amida	1650-1630	1662	1700
C=O (ácido carboxílico)	-	1739	-
C-O-C	1065-1058	1058-1036	1058-1043
β(1→4)	1153-893	1153-893	1153-893
N-H	1586	-	1565
C=C	-	1632	-
OH	-	918	-
C=N	-	1655	1662
Anel aromático	-	690-710	-

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.1.5. Análise Termogravimétrica (TG)

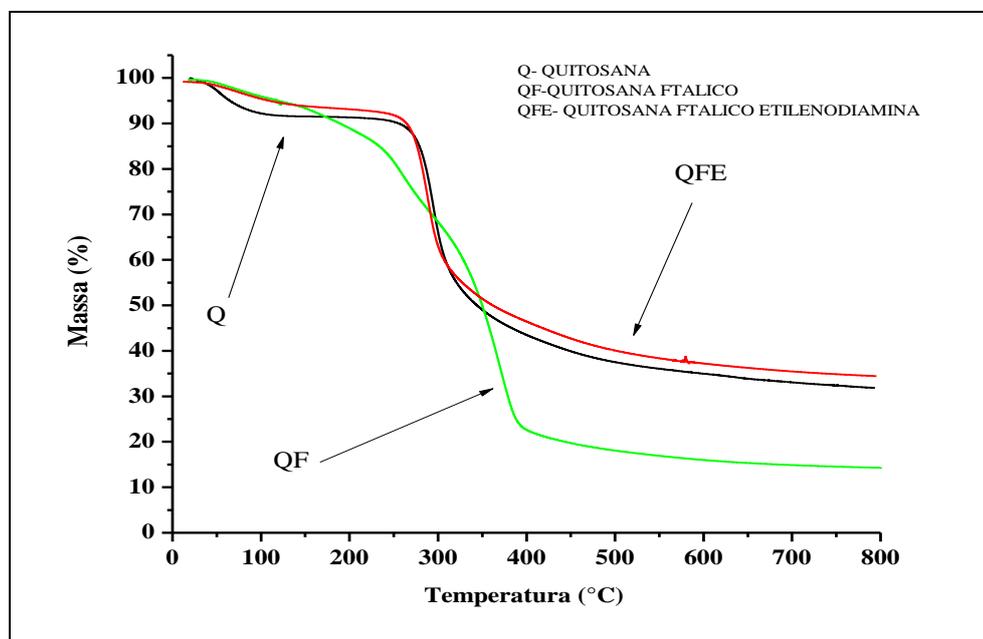
As curvas termogravimétricas foram obtidas com a finalidade de se avaliar a estabilidade térmica dos materiais.

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.

Podemos observar que o perfil de degradação mostra que os processos de decomposição térmica dos materiais quimicamente modificados envolvem mais de um evento térmico, e isso é claramente evidenciado pelas curvas derivadas termogravimétrica (DTG) que apresenta picos distintos tanto pra quitosana quanto para os derivados, como mostra a Figura 10.

Os perfis de degradação térmica da quitosana (Q) e dos derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) estão expressos na figura 9 com suas curvas termogravimétricas.

**Figura 9. Curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e dos derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).**



Fonte: autoria própria (2017)

Na curva de TG para quitosana pura, tem-se o primeiro evento de 26 a 118 °C, com perda de massa de 8,38%, corresponde ao processo de desidratação, pois a quitosana apresenta ao longo de sua cadeia grupos amina (-NH<sub>2</sub>) na posição C-2, grupos hidroxila primários (-OH) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico. Já no segundo evento observa-se uma perda de massa de 59,41% entre a variação de temperatura de 188 a 768 °C, referente à degradação térmica do biopolímero (Dantas, et al. 2016).

A quitosana modificada com anidrido ftálico (QF), apresentou três estágios de degradação, com o primeiro estágio tendo início em 26°C a 130°C com perda de massa de 3,7%. O segundo estágio teve início 186°C a 273°C, com perda de massa 16,8%, e refere-se

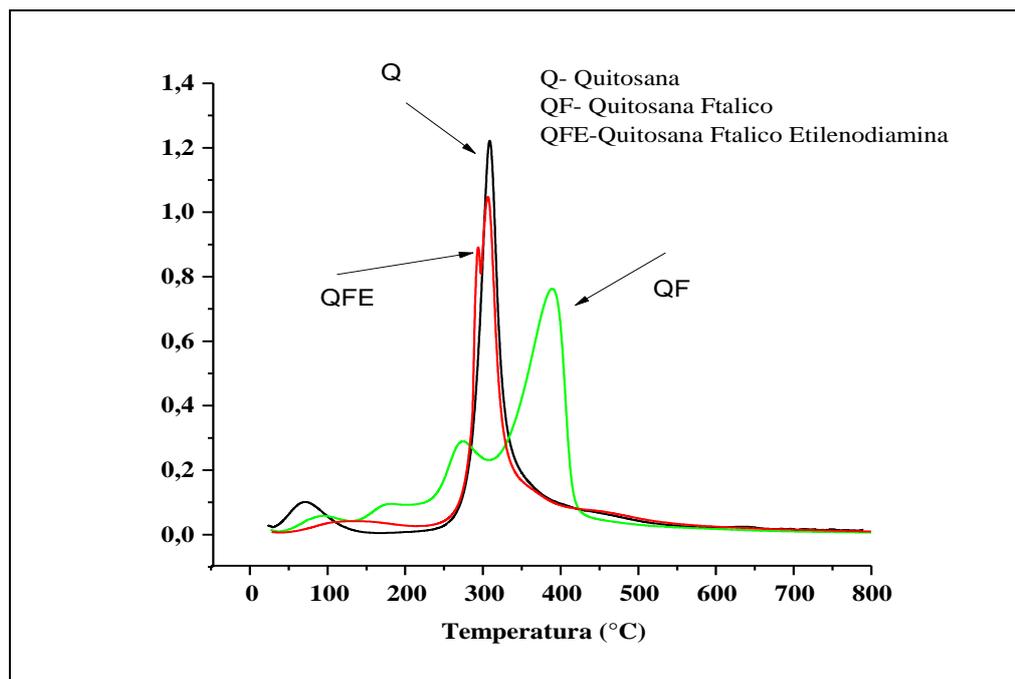
à degradação do grupo funcional mobilizado e no terceiro que vai 303°C a 794°C com perda de massa 55,22%, está relacionado à degradação do polissacarídeo.

Já a quitosana modificada com anidrido ftálico e posterior reação com etilenodiamina (QFE), apresentou dois estágios de degradação, o primeiro vai 30°C a 140°C com perda de massa de 5,15%, e o segundo inicia-se em 223°C a 786°C com perda de massa de 58,26%, relacionado à degradação do material.

A modificação química da quitosana com anidrido ftálico (QF) conduziu os eventos de decomposição térmica para temperaturas ligeiramente superiores quando comparada com Q e QFE, conforme podemos observar analisando os resultados na Tabela 3, além de levar a obtenção de um material com menores porcentagens de perda de massa, conforme se aumenta a temperatura, sugerindo que essa modificação tornou o derivado termicamente mais estável e mais hidrofóbico, quando comparado a Q e ao QFE.

O aumento na estabilidade térmica do derivado QF se deve ao fato de que os grupos hidrofóbicos inseridos 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 QF apresentou um maior índice de cristalinidade.

**Figura 10. Derivadas das curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina QFE.**



Fonte: autoria própria (2017)

Os dados apresentados na tabela 3 mostram que a modificação da quitosana com grupos hidrofóbicos (QF) leva a obtenção de materiais quimicamente mais estável que a quitosana(Q) e, pois ele foi obtido com menor percentagem de perda massa conforme se aumenta a temperatura e também devido a estes grupos serem mais susceptíveis a interações eletrostáticas com o restante da cadeia polimérica aumentando assim a ordenação da estrutura cristalina do mesmo.

**Tabela 3. Resultados de TG/DTG para os derivados da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE).**

Produtos	Intervalo de Temperatura (°C)	Perda de Massa(PM) (%)	Resíduo (100-SOMA%PM)
Q	26 -118	8,38	32,19
	188 - 592	59,43	
QF	26-130	3,7	25,00
	186 -273	16,08	
	303 -794	55,22	

QFE	30 -140	5,15	36,59
	223- 786	58,26	

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.2. Atividade antibacteriana

A quitosana (Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE), apresentaram conforme dados expressos nas tabelas 4 e 5, um amplo espectro de ação sendo capazes de inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, respectivamente.

**Tabela 4. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) sobre cepa padrão *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os valores representam as médias das placas  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.**

AMOSTRAS	EFEITO INIBITÓRIO (%) / DESVIO PADRÃO
	<i>S. aureus</i>
Q	85,85 $\pm$ 6,02 a
QF	97,09 $\pm$ 1,52 b
QFE	99,55 $\pm$ 1,70 b

Fonte: autoria própria (2017)

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.

**Tabela 5. Efeito inibitório da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) sobre cepa padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os valores representam as médias das placas  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.**

AMOSTRAS	EFEITO INIBITÓRIO (%)/ DESVIO PADRÃO
	<i>E. coli</i>
Q	71,80 ± 3,78 a
QF	85,50 ± 1,15 b
QFE	88,12 ± 3,21 b

Fonte: autoria própria (2017)

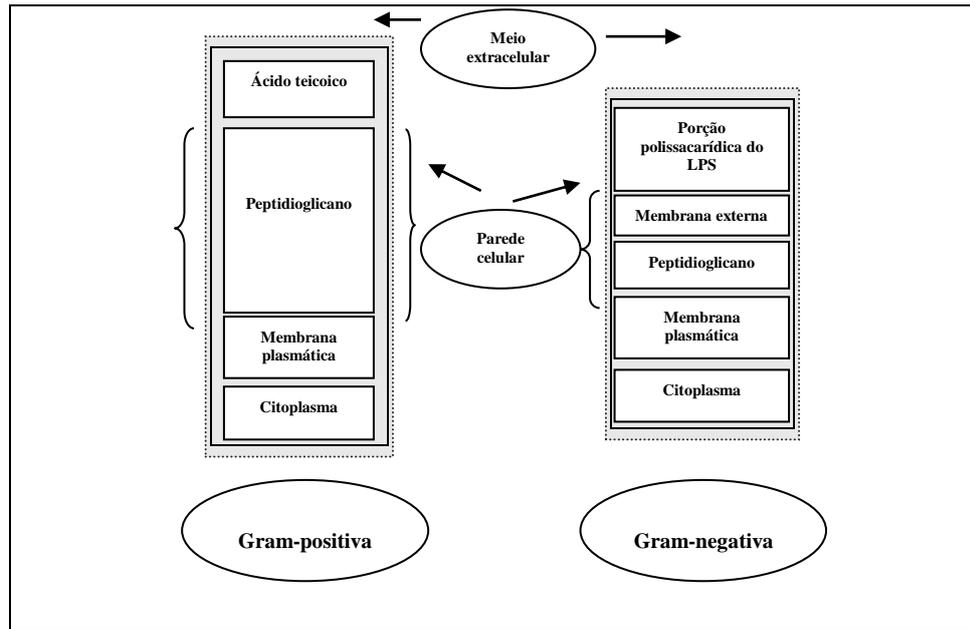
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.

As tabelas 4 e 5 exibem excelentes espectros de ação da quitosana e seus derivados frente a ambas as cepas bacterianas testadas, no geral, acima de 70% de efeito inibitório. O espectro de ação da quitosana(Q) e seus derivados abrangem fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo, no entanto, mais eficaz frente a bactérias Gram-positivas (Jeon, et al. 2001; No, et al. 2002; Rhoades & Roller, 2000).

O mecanismo de ação da quitosana e seus derivados frente aos microrganismos difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Paiva, Souza - Neto, & Batista 2014). Na presença de quitosana e de seus derivados a membrana das Gram-positivas é fragmentada, enquanto nas Gram-negativas, o citoplasma se concentra, e o espaço intracelular é ampliado, e esta diferença pode levar a uma possível redução do efeito inibitório frente a este grupo (Lifeng, et al. 2004; Lacerda, et al.2015).

Estudos revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo, conforme está expresso na figura 12 (Goy, Morais & Assis, 2016).

**Figura 11. Esquema da Parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.**



Fonte: autoria própria (2017)

Na figura 11, visualiza-se a complexidade química da parede celular das bactérias Gram-negativas, composta por múltiplas camadas, que são formadas externamente por lipopolissacarídeos e proteínas (lipoproteínas e as porinas), que tem por função criar uma barreira de permeabilidade contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, esta possui um espaço periplasmático entre a membrana externa e a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano, mais delgada, situada entre essas membranas, sugerindo assim uma maior dificuldade de ação de materiais poliméricos neste grupo de bactérias (Raven, Evert & Eichhorn, 2001; Jung, et al. 2010).

Esta complexidade sugere uma maior barreira, favorecendo assim um possível aumento no efeito inibitório da quitosana e seus derivados frente às bactérias Gram-positivas, que possuem parede celular menos complexa conforme se demonstra na figura 12 (Raven, Evert & Eichhorn, 2001; Mendes, et al. 2016; Eaton, et al. 2008).

Por outro lado, destaca-se também que a parede celular das bactérias Gram-positivas possuem os ácidos teicoico e lipoteicoicos, ausente nas Gram-negativas, e que o derivado (QF) incorpora grupos hidrofóbicos a estrutura da quitosana (Q), e essa incorporação podem

reagir mais facilmente com esses componentes provocando assim um melhor efeito inibitório deste derivado com a bactéria *S. aureus* (Mendes, et al.2016).

Modificação das cadeias de quitosana (que é hidrofílica) com compostos hidrofóbicos pode resultar em produtos com um comportamento anfifílico (hidrofílica e lipofílica). Os derivados de quitosana anfifílicos são capazes de se auto montar e formar micelas sob condições adequadas (El-Fray, Niemczyk & Pabin-szafko, 2012; Muzzarellia, et al. 2012).

O derivado (QFE) com a introdução das aminas em sua estrutura polimérica derivada do (QF) melhorou seu espectro de ação também frente a *S.aureus*, o que pode ser explicado pela interação desse material através de seus grupos catiônicos com os componentes aniônicos da parede celular da bactéria Gram-positiva (Eaton, et al. 2008; Goy, Morais & Assis, 2016; Edin, et al.2015).

Destacando o efeito inibitório do material QFE frente à bactéria *S. aureus* o percentual chegou a 99,5% %, (100% estatisticamente) o que corrobora mais uma vez com a estrutura menos complexa desta bactéria, que pode ser confirmado pela interação iônica na superfície da célula resultando em ruptura da parede celular onde as forças eletrostáticas entre a molécula de quitosana e de seus derivados carregados positivamente ( $\text{NH}_3^+$ ) e os resíduos negativos na superfície celular pode promover modificação na permeabilidade da parede celular, o qual promove distúrbio no balanço osmótico ou também sugerem que esta interação possa hidrolisar peptidoglicanos na membrana do micro-organismo, resultando na perda constituinte da mesma, e esta interação eletrostática leva-se a acreditar que quanto maior for o número de aminas catiônicas maior será o efeito inibitório dos materiais (Goy, Morais & Assis, 2016; Edin, et al.2015; Mendes, et al.2016; Chetouani, et al. 2017).

### **3.3. Estudo da Citotoxicidade da quitosana e derivados**

Para avaliação preliminar da citotoxicidade in vitro da quitosana(Q) e seus derivados modificado com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) foi

realizada pelo método de ensaio de viabilidade celular frente à redução do brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difenil tetrazolio (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 segunda coluna (C (-) = controle negativo).

O teste pela redução frente ao MTT é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))], em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, da cor amarelada para a cor roxa, ocorre apenas em células viáveis, sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes. (Mosmann, 1983).

Os ensaios de viabilidade são passos vitais nos estudos de toxicidade que determinam a resposta celular a um tóxico, fornecendo informações sobre a morte celular e as atividades metabólicas. Neste sentido foi utilizado para avaliar a citotoxicidade *in vitro* da quitosana(Q) e derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) o ensaio redução ao brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))], método rápido e eficaz para testar a atividade mitocondrial, que se correlaciona muito bem com a viabilidade celular (Sabudin, et al. 2012).

Na tabela estão expressos os resultados de viabilidade celular da quitosana(Q) e dos derivados QF e QFE. A porcentagem de células viáveis deve apresentar-se acima de 50%, valor mínimo, para considerar um material biocompatível (Granato, et al. 2009; Medeiros, et al.2016; ISO, 2009).

**Tabela 6. % de viabilidade das amostras de quitosana(Q) e de seus derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) sobre Fibroblastos Humanos**

(GM07492A), após 52h pelo ensaio de redução ao [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))]. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.

AMOSTRAS	MÉDIA / DESVIO- PADRÃO	AGRUPAMENTO
CONTROLE POSITIVO (+)	29,88 $\pm$ 4,04	c
CONTROLE NEGATIVO (-)	100,00 $\pm$ 0	a
QUITOSANA- Q	97,95 $\pm$ 6,35	ab
QUITOSANA FTÁLICO- QF	84,86 $\pm$ 5,42	b
QUITOSANA FTÁLICO ETILENODIAMINA- QFE	92,11 $\pm$ 6,35	ab

Fonte: autoria própria (2017)

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.

Os resultados acima expressam que o controle positivo apresenta um decréscimo celular, caracterizando a morte celular. Observamos claramente que os materiais não afetam o percentual de viabilidade celular, em comparação com o controle negativo. Estes resultados são complementares ao teste de redução ao brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), indicam assim não toxicidade, retratando que os materiais em estudo são considerados biocompatíveis.

Sugere-se que as modificações químicas realizadas nos derivados quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) não revelaram toxicidade, uma vez que a viabilidade celular obtida para as amostras não exibiram variações significativas em relação aos grupos controle positivo (+) e negativo (-), com isso, os resultados evidenciam que os mesmos não apresentaram toxicidade para a cultura de células de fibroblasto humano

(GM07492A), expressando assim que a quitosana e os derivados obtidos, são compatíveis com células fibroblásticas humanas, sugerindo a utilização destes como biomateriais e se mostram promissores para serem testados em ensaios *in vivo*.

#### 4. CONCLUSÃO

A quitosana e derivados foram devidamente caracterizados, apresentando evidências de que a modificação química na cadeia polimérica da quitosana foi efetuada.

A análise elementar foi possível observar o aumento no número de carbono com a inserção do anidrido ftálico no derivado QF e o aumento no número de aminas com a incorporação da etilenodiamina no derivado QFE.

Variações nos picos no espectro de DRX da quitosana e derivados 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 pura.

Os resultados do infravermelho mostraram evidências na efetividade da modificação da quitosana(Q) com o derivado modificado com anidrido ftálico (QF) e com posterior reação com etilenodiamina (QFE) associadas pelo aparecimento e desaparecimento de bandas nos espectros obtidos.

As análises termogravimétricas mostraram que o derivado obtido com anidrido ftálico (QF) apresentou uma maior estabilidade térmica quando comparada com a quitosana(Q). O derivado quitosana ftálico etilenodiamina (QFE) apresenta estabilidade térmica semelhante à quitosana.

Os resultados da atividade antibacteriana da quitosana e derivados são promissores e sugerem que formulações farmacêuticas compostas de QF e QFE poderiam apresentar um melhor efeito terapêutico contra infecções bacterianas do que a quitosana pura, o que poderia ser melhor avaliado por meio de ensaios *in vivo*.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que a modificação da quitosana com anidrido ftálico (QF) e posterior reação com etilenodiamina (QFE) revelam que os materiais em estudo

são considerados compatíveis para uso como biomateriais, devido à ausência de toxicidade, em células de fibroblastos humano, roborando assim, a partir dos resultados, inferir que a quitosana e os derivados produzidos mostram-se promissores para serem testados em ensaios *in vivo*.

Os resultados do presente estudo indicam que a modificações químicas realizadas na quitosana sugerem que esses novos materiais são promissores para futuras aplicações nas áreas- médico- farmacêuticas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, S., & Ikram, S. (2015). Chitosan & Its Derivatives: a review in recente innovations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 14-30.

Airoidi, C. (2008). A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. *Química Nova*, 31, 144-153.

Aranaz, I., Harris, R., & Heras, A.(2010). Chitosan Amphiphilic Derivatives, *Chemistry and Applications*. *Current Organic Chemistry*, 14, 308-330.

Assis, O.B. G & Silva, V. L.S. (2003). Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 223-228.

Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Lia Fook, M. V., Costa, A. C. F. M. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2, 27-34.

Berger, R.R. L, Stamford, M.Ch. T & Stamford, P.N. (2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura, *Revista Ibero-americana de Polímeros*, 12, 195-215.

Braz, E. M de A.(2015). Propriedades Biológicas de Derivados de Quitosana Acilada. *Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais*. Universidade Federal do Piauí.

Chetouani, A., Follain, N., Marais, S., Benachour, D., Le Cerf, D. (2017). Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 348-356.

Costa- Silva, H. S. R., Santos, K. S. C. R. & Ferreira, E. I. (2006). Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. *Química Nova*, 29, 776-785.

Cruz, J.B., Catão, C.D., Barbosa, R. C., Fook, M.V.L. (2016). Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. *Revista Matéria*, 21,129-140.

Dantas, M. J. L., Fidéles, T. B., Carrodeguas, R. G., Fook, M. V. L.(2016). Obtenção e caracterização de esferas de quitosana/hidroxiapatita gerada in situ. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 11,18-24.

Eaton, P., Fernandes, J.C, Pereira, E., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2008). Estudo de microscopia de força atômica dos efeitos antibacterianos de quitosana em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopia*, 108, 1128-1134.

EI- fray, M., Niemczyk, A., & Pabin-szafko, B.(2012) .Chemical modification of chitosan with fatty acids. *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, 17, 29-36.

Eldin, M.M.S., Hashem, A.I., Omer, A.M., Tamer, T.M. (2015).Preparation, characterization and antimicrobial evaluation of novel cinnamyl chitosan Schiff base. *International Journal of Advanced Research*, 3, 741-755.

Fráguas, R. M., Simão, A. A., Faria, P. V., Queiroz, E. R., Oliveira- J.r, E. N., Abreu, C. M. P. (2015). Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. *Revista Polímeros*, 25, 48-53.

Goy, C. R., Morais, T. B. S. & Odilio, B.G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 122–127.

Granato, A.E.C. Soares, C.P., Devitto, A.L., Buzone, L.M., De Oliveira, L.C., Vercik, A. Rigo, E.C.S. (2009). Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 1-4. 16 e 17 de Outubro de 2009.

Gupta, K. C.,& Jabrail, F. H. (2008).Effect of molecular weight and degree of deacetylation on controlled release of isoniazid from chitosan microspheres. *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 432-441.

Hernandez-Lauzardo, A.N., Bautista- Banôs, S., Velázquez- del- Valle, M.G., Mendéz- Monteralvo, M.G., Sánchez – Rivera, M.M., Bello – Pérez, M.A.( 2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Carbohydrate Polymers, 73, 541-547.

ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

Jeon, Y.J., Park, P.J., & Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effect of chito-oligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers, 44, 71-76.

Jung, J. E., Youn, D. K., Lee, H. S., No, K. H., Há, G. J., Prinyawiwatku, W. (2010). Antibacterial activity of chitosan with different degrees of deacetylation and viscosities. International Journal of Food Science and Technology, 45, 676– 682.

Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical Reviews, 104- 12, 6017-6084.

Kyzas, Z.G, & Bikiaris, D.N. (2015). Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. Marine Drugs, 13, 312-337.

Lacerda, W. C., Vale, J. S., Lacerda, W. C., Cardoso, J. L. M.S. (2015). Infecção urinária em mulheres: revisão de literatura. Saúde em foco, 7, 282-295.

Laranjeira, M.C.M., & Favere, V.T. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. Química Nova, 32, 672-678.

Layek, B., Singh, J. (2012). N-hexanoyl, N-octanoyl and N-decanoyl chitosans: Binding affinity, cell uptake and transfection. Carbohydrate Polymers, 89, 403-410.

Lifeng, Q., Zirong, X., Xia, J., Caihong, H., Xiangfei, Z. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate Research, 339, 2693-2700.

Luo, D., Sang, L., Wang, X., Xu, S. Li, X. (2011). Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. *Materials Letters*, 65, 2395-2397.

Medeios, L.A.D.M., Barbosa, R.C., Rosendo, R.A., Oliveira, D.K.M., Fook, M.V.L.(2016). Esferas de quitosana/ *D. ambrosioides* (mastruz) para aplicação como biomaterial. *Revista Brasileira de Odontologia*, 73, 124-129.

Mendes, A. A., Oliveira, P.C., Castro, H. F., Giordano, R. L. C. (2011). Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, 34, 831-840.

Mendes, L.D., Bresolin, J.D., Assis, O.B.G., Britto, D.(2016). Avaliação in vitro da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do *fungo Penicillium expansum*. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, 10,116-128.

Mohamed, N. A., Sabaa, M. W., EL-ghandour, A. H., abdel-aziz, M. M., Abdel-gawad, O. F.(2013).Quaternized N-substituted carboxymethyl chitosan derivatives as antimicrobial agents. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 156-164.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55 - 63.

Mourya, V. K., & Inamdar, N. N.(2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers*, 68, 1013-1051.

Mukhopadhyaya, P., Mishrab, R., Ranac, D., Kundua, P. P.(2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37, 1457-1475.

Muzzarellia, R.A.A., Boudrantb,J., Meyerc,D., Mannod,N., De-Marchisd,M. ,Paolettid, M.G. (2012).Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans,

pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012.

No, H. K., Park, N.Y, Lee, S.H, Meyers ,S. P.(2002).Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.

Osório, L.R. (2013). Propriedades antibacterianas da quitosana e de derivados obtidos na ausência de solvente. Dissertação de mestrado em química. Universidade Federal do Piauí.

Paiva, W.S., Souza- Neto, F.E., & Batista, A.C.L. (2014). Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. *Revista Perspectivas on Line, biologia & saúde*, 14, 37-43.

Pandey, R., & Huller, G. K. (2004).Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 635-640.

Park, J. H., Saravanakumar, G. K., Kwangmeyung, K., Ick, C.(2010). Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 28-41.

Perobelli, G., Cavalcante, N. G. S. Pontes, A.C.C.B. Pontes, D. L.(2015). Esferas de Quitosana: Produção de Bases de Schiff. *Chemical Engineering Proceedings*, 3,402-409.

Pires, R.S., Bierhalz,A.C.K., & Moraes, A.M.(2015). Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, 38,957-971.

Pocinho, M., & Figueiredo, J. P.(2017). Estatística e bioestatística. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra. Coimbra, Portugal, 139 p, (Capítulo 10).

Quelemesa, P.V., De- Araújo, A.R.,Plácido, A. ,Delerue-Matos, C. ,Maciel, J. S., Bessa, L.,Ombredane,A.S,Joanitti,,G.A.,Soares,M.J.S.,Eatona,P.,Silva,D.A.,Leite,J.R.S.A.(2017).Qu

aternized cashew gum: an anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. *Carbohydrate Polymers*, 157, 567–575.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smaghe, G., Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457–1465.

Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. (2001). *Biologia Vegetal* (6<sup>o</sup>Ed), Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan (Capítulo 14).

Rhoades, J., & Roller, S. (2003). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms and laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 80-86.

Sabarudin, A., Noguchi, O., Oshima, M. Higuchi, K., Motomizu, S. (2007). Application of chitosan functionalized with 3,4-dihydroxy benzoic acid moiety for on-line preconcentration and determination of trace elements in water samples. *Microchimica Acta*, 159, 341-348.

Sabudin, S., Derman, M.A., Zainol, I., Noorsal, K. (2012). In Vitro Cytotoxicity and Cell Seeding Studies of a Chitosan-silver Composite for Potential Wound Management Applications *Journal of Engineering Science*, 8, 29-37.

Santos, J.E., Soares, J.P., Dockal, E.R., Campana-Filho, S.P., Cavalheiro, E.T.G. (2003). Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 242-249.

Sayari, N., Sila, A., Abdelmalek, B.E., Rihab, B. A., Semia, E-C., Ali, B., Rafik, B. (2016). Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: antimicrobial and anti-proliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 163–171.

Shanmuganathana, S., Shanmugasundarama, N., Adhirajana, N., Lakshmia, R.T.S., Babua, M. (2008). Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydrate Polymers*, 73, 201-211.

Software Assistat. Versão 7.7. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil. Programa desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de A. S. e Silva. Acesso em 23/06/2017. <http://www.assistat.com/indexp.html>.

Son, Y.J., Jang, J.S., Cho Y.W., Chung, H., Park, R.W., Kwon, I.C., Kim, I.S., Park, J.Y., Seo, S.B., Park, C.R., Jeong, S.Y. (2003). Biodistribution and anti-tumor efficacy of doxorubicin loaded glycol-chitosan nanoaggregates by EPR effect. *Journal of Controlled Release*, 91, 135-145.

Ta, H.T., Dass, C.R., & Dustan, D.E. (2008). Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 126, 205-216.

Tu, Y., Zhou, M., Guo, Z., Li, Y., Hou, Y. Wang, D., & Zhang, L. (2015). Preparation and characterization of thermosensitive artificial skin with a sandwich structure. *Materials Letters*, 147, 4-7.

Vieira, A. P. Santana, S. A. A., Bezerra, C. W. B., Silva, H. A. S., Melo, J. C. P., Silva-Filho, E. C., Airoidi, C. (2010). Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babaçu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. *Chemical Engineering Journal*, 161, 99-105.

Vinsová, J., & Vavříková, E. (2011). Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities – a Review. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 3596-3607.

Zheng, Y. L & Zhu, F. J. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers*, 54, 527- 530.

Zong, Z., Kimura, Y., Takahashi, M., Yamane, H. (2000). Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*, 41, 899-906.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O aumento no número de microrganismos patogênicos resistentes tem estimulado a busca por novos agentes antibacterianos. A modificação química da quitosana com anidridos orgânicos e com aminas tem se mostrado bastante promissora, sugerindo um leque de aplicações e possibilidades.

As modificações feitas na estrutura do polissacarídeo quitosana com o anidrido ftálico e etilenodiamina mostraram que os derivados apresentaram um maior efeito inibitório bacteriano que a quitosana pura. Os ensaios de citotoxicidade em células de fibroblasto humano indicaram não toxicidade em ambos os materiais, tornando-os promissores para futuras aplicações biomédicas, visto que aliaram excelente atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas e não exibiram toxicidade.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Efetuar caracterizações químicas e morfológicas.
- Associar os derivados com fármaco de ação anti-inflamatória.
- Obter um novo derivado na forma de membrana ou filme para uso tópico.
- Efetuar ensaios de liberação.
- Realizar testes *in vitro* e *in vivo*.

**CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA  
E DERIVADOS COM ANDRIDO MALÊICO E POSTERIOR REAÇÃO COM  
ETILENODIAMINA.**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CITOTÓXICA DA QUITOSANA E  
DERIVADOS COM ANDRIDO MALÊICO E POSTERIOR REAÇÃO COM  
ETILENODIAMINA**

*Janete Martins Sousa<sup>1</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais,*

*Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV*

## RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem potencializado a seleção de cepas de bactérias resistentes exigindo a investigação e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido materiais a base de produtos naturais vêm despertando o interesse de muitos pesquisadores, devido ao seu vasto campo de aplicações. A quitosana, principal derivado da quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, tem se destacado por reunir propriedades atraentes, como atividade biológica versátil, biocompatibilidade, biodegradabilidade, ser fonte natural renovável e possuir baixa toxicidade. Modificações na cadeia da quitosana são feitas com intuito de melhorar ou conferir a ela novas propriedades. Este estudo teve como objetivo modificar e caracterizar quitosana e seus derivados obtidos a partir da modificação da quitosana com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME), pelas técnicas de difração de Raios-X, Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Análise termogravimétrica (TG) e investigar a atividade antibacteriana da quitosana e derivados QM e QME frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e avaliar o potencial citotóxico da quitosana e derivados QM e QME sobre fibroblasto humanos, frente ao ensaio de redução ao MTT. Os resultados de Espectroscopia na região do Infravermelho mostraram a eficácia das modificações entre a quitosana com seus derivados pelo surgimento de novas bandas nos espectros obtidos, os dados de Difração de Raios-X e de Análise termogravimétrica mostraram, respectivamente, que os grupos incorporados na estrutura da quitosana provocaram mudanças na cristalinidade e na estabilidade térmica dos materiais quando comparada com a quitosana. Atividade antibacteriana da quitosana e dos derivados apresentaram um melhor efeito inibitório contra cepa gram-positiva, *Staphylococcus aureus* 25923. Em relação à citotoxicidade, o material QM é tóxico, sugerindo sua aplicação na terapia anticâncer, e a Quitosana e o material QME, são promissores para a aplicação como biomateriais sugerindo aplicabilidade no controle de microrganismos.

**Palavras-chave:** quitosana, modificação, atividade antibacteriana e citotoxicidade.

## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics has potentiated the selection of strains of resistant bacteria requiring research and development of new therapeutic strategies. In this sense materials based on natural products have aroused the interest of many researchers due to their vast field of applications. Chitosan, the main chitin derivative, the second most abundant polysaccharide in nature, has been found to have attractive properties such as versatile biological activity, biocompatibility, biodegradability, natural renewable source and low toxicity. Modifications in the chain of chitosan are made with the intention of improving or conferring to it new properties. The aim of this study was to modify and characterize chitosan and its derivatives obtained from the modification of chitosan with malic anhydride (QM) and subsequent reaction with ethylenediamine (QME) by X-ray diffraction techniques. The spectroscopy in the infrared (TG) and to investigate the antibacterial activity of chitosan and QM and QME derivatives against the strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and to evaluate the cytotoxic potential of chitosan and QM and QME derivatives on human fibroblast, MTT reduction test. The results of Spectroscopy in the Infrared region showed the efficacy of the modifications between chitosan and its derivatives by the appearance of new bands in the obtained spectra, the data of X-ray Diffraction and Thermogravimetric Analysis showed, respectively, that the groups incorporated in the structure of the chitosan caused changes in the crystallinity and thermal stability of the materials when compared to chitosan. Antibacterial activity of chitosan and derivatives showed a better inhibitory effect against gram positive strain, *Staphylococcus aureus* 25923. Regarding cytotoxicity, the QM material is toxic, suggesting its application in anticancer therapy, and Chitosan and QME material are promising for the application as biomaterials suggesting applicability in the control of microorganisms.

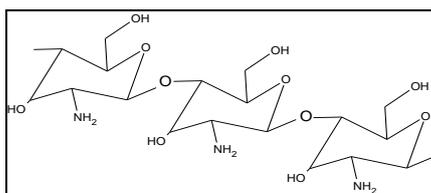
Keywords: chitosan, modification, antibacterial activity and cytotoxicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas têm sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens como ser de fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável, neste contexto a quitosana, tem sido estudada e publicações tem se destacado nas últimas décadas e tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos (Assis & Silva, 2003).

Polissacarídeo derivado da desacetilação alcalina da quitina, a quitosana, constituída, predominantemente, pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- 2-amino-2-desoxi-D-glicose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida- 2-desoxi-D-glicose.(Laranjeira & favere, 2009; Azevedo, et al 2007; Bezerra, 2011; Assis & Silva, 2003) ,tem em sua estrutura grupos funcionais (OH e NH<sub>2</sub>) que podem ser quimicamente modificados utilizando-se a diferença de reatividade desses grupos, estudos de modificações química estão sendo realizados para aumentar as suas possibilidades de aplicação (Elshaarawy, Refaee, & El-Sawi, 2016), conforme expresso na figura 1.

**Figura 1. Estrutura química da quitosana.**



Fonte: autoria própria (2017)

A partir da imobilização de novos grupos funcionais na cadeia polimérica da quitosana, pode-se obter uma variedade de derivados para atingiras finalidades desejadas, nesse sentido, podem ser feitas várias reações de modificações. Dentre as quais se destacam as reações de N,O- acilação, N-alquilação, formação de base de Schiff, carboximetilação, e etc.(Muzzarelli, et al 2012).

A acilação da quitosana em geral, com anidridos orgânicos, ocorre preferencialmente, nos grupos amino livres, sendo a reação com os grupos hidroxilas mais lenta, (Velázquez-del valle, et al .2012; Azevedo, et al .2007), já as bases de Schiff ocorrem com a condensação do grupo amino livre da quitosana com aldeídos ou cetonas, formando a ligação imina(C=N), que é razoavelmente estável sob condições neutras e básicas, mas se hidrolisa em soluções ácidas, as bases de Schiff, são usadas para proteção do grupo amino da quitosana em modificações químicas dos grupos hidroxila resultante( Lima, 2010; Chetouani, et al.2017).

A quitosana exibe atividade antimicrobiana comprovada contra uma gama de bactérias e fungos, abrindo um leque de grande potencial de aplicações em diversas áreas, como na agricultura (Berger, Stamford, & Stamford, 2015), na medicina (Zang, et al.2014), na odontologia (Medeiros, et al. 2016) e em formulações farmacêuticas (Elshaarawy, Refaee, & El-Sawi, 2016). As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, pós, membranas, microesferas e nanopartículas (Campana-Filho, et al 2007).

Certo de suas propriedades antimicrobianas, a quitosana é um material especialmente promissor para embalagem de alimentos (Ahmed, & Ikram, 2015) e para a utilização na cicatrização de ferimentos (Tu, et al. 2015). Além disso, sua modificação química pode oportunizar o aumento do seu efeito inibitório sobre microrganismos patogênicos e contribuir no combate às enfermidades causadas por microrganismos resistentes (Tu, et al. 2015).

Diante da potencialidade de aplicações, este trabalho teve como objetivo modificar e caracterizar quimicamente a quitosana(Q) e seus derivados quitosana malêico (QM) e quitosana malêico etilenodiamina (QME), pelas técnicas de Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG), e investigar a atividade antibacteriana da quitosana e derivados

frentes as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e avaliar o potencial citotóxico da quitosana e derivados QM e QME sobre fibroblasto humanos, frente ao ensaio de redução ao MTT.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Materiais e reagentes**

A quitosana com grau de desacetilação (95%) foi obtida da Primex, extraída de carapaça de caranguejo. Os reagentes utilizados foram etilenodiamina (VETEC), anidrido malêico (VETEC), ácido acético (VETEC), o solvente N-N'-dimetilacetamida-DMA (SIGMA-ALDRICH), Dimetilsulfóxido (DMSO- SIGMA) e cloreto de sódio (IMPEX). Meios de cultura Brain Heart Infusion -BHI (HIMEDIA) e Ágar Nutriente (HIMEDIA), GM07492A (Fibroblasto Humano), DMEM (GIBCO/ THERMOFISHER), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF- NUTRICELL). Antibióticos penicilina e estreptomicina a  $10\text{U/mL}^{-1}$  (SIGMA). Todos sem prévia purificação.

### **2.2. Modificações da Quitosana**

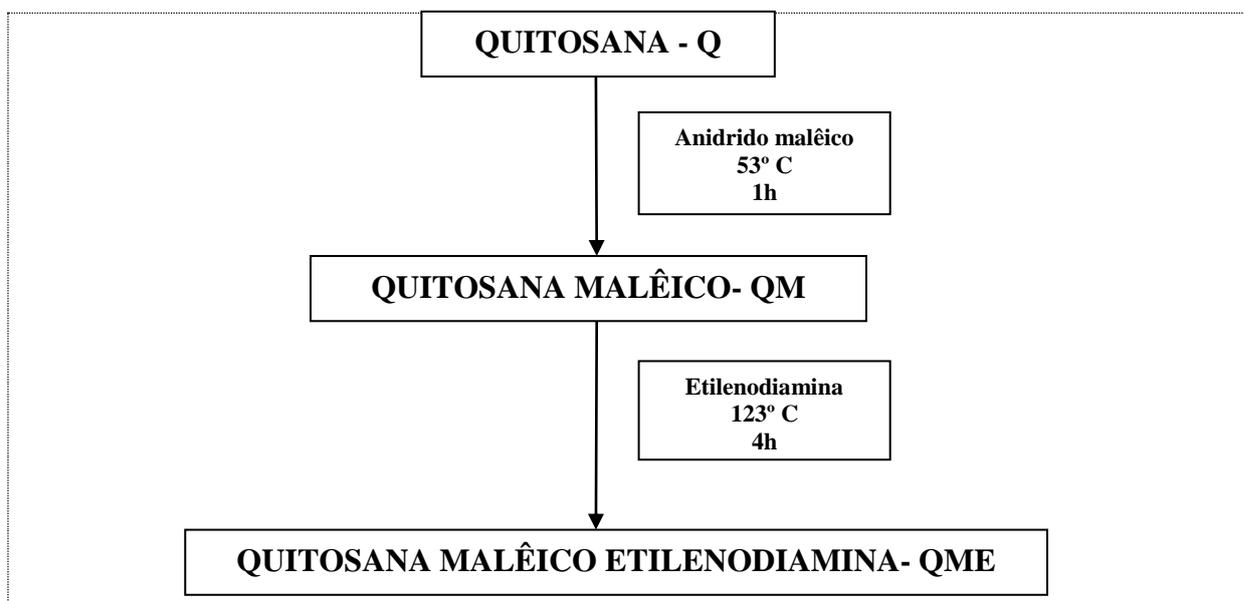
#### **2.2.1. Modificação com anidrido malêico**

A modificação da quitosana com anidrido malêico foi realizada conforme Vieira, et al. 2010. Primeiramente colocou-se 15,6g anidrido malêico em um balão de fundo redondo e sob agitação e aquecimento até sua fusão a  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em seguida foi adicionado 5g de quitosana e após 1 hora de agitação e aquecimento, 25 mL de DMA, foi acrescentado para finalização da reação. Em seguida o produto foi retirado, lavado e centrifugado várias vezes com água de Milli-Q, verificando o pH (potencial Hidrogeniônico) a cada três lavagens, e quando a faixa de pH, estava em meio neutro, o produto obtido foi retirado e seco em uma estufa a  $45^{\circ}\text{C}$ , em seguida macerado, armazenado e denominado QM.

#### **2.2.2. Modificação com etilenodiamina**

A reação posterior do derivado QM com etilenodiamina foi realizada conforme descrito por Osório, 2013. Para a reação acontecer 3,0g do derivado QM reagiu com 10mL de etilenodiamina, sob-refluxo e agitação magnética durante 4 h a 123 °C. Em seguida, o sólido foi lavado e centrifugado por várias vezes com água de Milli-Q para a retirada do excesso de reagente, verificando o pH (potencial Hidrogeniônico) a cada três lavagens, e quando a faixa de pH, estava em meio neutro, o produto obtido foi retirado e seco em uma estufa à 45°C, em seguida macerado, armazenado e denominado QME.

**Figura 2. Fluxograma do processo de modificação química da quitosana.**



Fonte: autoria própria (2017)

### 2.3. Caracterização do Material

A quitosana e os derivados obtidos foram caracterizados pelas as seguintes técnicas:

#### 2.3.1. Análise elementar

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

#### 2.3.2. Difração de Raios-X (DRX)

Os gráficos de Raios – X, foram obtidos com o instrumento Shimadzu, modelo XR-D600 A, na faixa  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $50^\circ$ . A velocidade de varredura foi de  $5^\circ \text{ min}^{-1}$ , utilizando a fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , com comprimento de onda 154,06 pm.

### **2.3.3. Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos utilizando pastilhas de KBr com 1% de amostra, na faixa de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , com 32 acumulações, em um espectrômetro Bomem - Hartmann & Braun MB, com transformada de Fourier.

### **2.3.3. Análise Termogravimétrica (TG)**

As curvas termogravimétricas foram obtidas através do aparelho DuPont, modelo 9900, com fluxo de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , em atmosfera de argônio, a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  a  $1000^\circ\text{C}$ .

## **2.4. Testes antibacterianos**

### **2.4.1. Cepas bacterianas**

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados com cepas bacterianas, Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Gram-negativa, *Escherichia coli* (ATCC 25922), ambas mantidas em ágar nutriente a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **2.4.1.1. 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  $37^\circ\text{C}$  por 24h. 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, 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 e  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL para *S. aureus* e *E.coli*, respectivamente.

#### 2.4.1.2. Teste de Contato Direto

Para avaliação da atividade antibacteriana, soluções da quitosana e de seus derivados foram preparadas com 0,001 g de cada material quitosana(Q), quitosana ftálico (QF) e quitosana ftálico etilenodiamina (QFE), foram preparadas utilizando ácido acético 2% como solvente, com concentração  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$

O teste de contato direto em meio sólido foi realizado de acordo com Zheng, & Zhu, 2003. Para realização destes ensaios  $100 \mu\text{L}$  da suspensão padronizada  $1,5 \times 10^4$  UFC/MI (*S.aureus*) e  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL (*E.coli*) foi transferida para placas de petri contendo o meio ágar nutriente. Em cada placa, foi adicionado  $100\mu\text{L}$  da solução teste. As placas foram semeadas com o auxílio de uma alça de drigalski pelo método *spread plate* e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  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:

#### Figura 3. Equação do efeito inibitório.

$$\eta = \frac{N_1 - N_2}{N_2} \times 100$$

Onde  $\eta$  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.

## **2.5. Avaliação da Citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo teste de redução ao 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(Q) e de seus derivados modificados com anidrido malêico(QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME). As células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços, mantidas em meio de cultura enriquecida com soro fetal bovino (SBF) e antibióticos (penicilina e estreptomicina 10U/mL) e simultaneamente foram preparados os extratos das amostras Q, QM e QME onde foram pesados 20mg de cada material e colocados em 100 mL (do meio de cultura DMEN), gerando a concentração 20 mg/mL, sendo incubadas em estufa 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, por 24(vinte e quatro) horas.

Após as primeiras 24h, o meio de cultura DMEM foi substituído pelo extrato de cada amostra, realizados em triplicatas, e mantidas em condições de cultivo por mais 24(vinte e quatro) horas. Depois dessas 48h, os poços foram lavados com PBS (1x), e foram adicionados 50µL de MTT. Em seguida a placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por mais 4(quatro) horas. Após esse período, foi adicionado 100µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Em seguidas as amostras foram agitadas, por aproximadamente 1 minuto, mantidas em ultrassom por 15 minutos e novamente agitadas por mais 1 minuto.

Como controle positivo (C+) de citotoxicidade para os materiais, foi utilizado o Meio Dulbecco Mem (DMEM) acrescido com 30% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

Como controle negativo (C-) de material não citotóxico, foram utilizados o Meio Dulbecco Mem (DMEM) acrescido de soro bovino fetal (SBF) e os antibióticos (penicilina e estreptomicina 10U/mL (sigma)).

Os valores de densidade óptica (DO) obtidos em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 570nm num espectrofotômetro foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa amostra controle negativo.

## **2.6. Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e três experimentos independentes. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey no Graphpad Prism 7.0 e Software Assistat, tomando-se o valor de  $p < 0,05$  como nível máximo de significância estatística (Pocinho & Figueiredo, 2017).

### 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Análise elementar

Os resultados da análise elementar com os percentuais e as quantidades em  $\text{mmol g}^{-1}$  de carbono, nitrogênio, da quitosana e de seus derivados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Percentuais de carbono (C), nitrogênio (N) para a quitosana (Q) e os derivados modificado com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME), razões (C/N) experimental e teórico, quantidades molares desses elementos.**

Materiais	%C	%N	C( $\text{mmol g}^{-1}$ )	N( $\text{mmol g}^{-1}$ )	C/N	C/N teórico
					experimental	
Q	40,11	7,20	33,42	5,14	6,50	6
QM	42,83	4,0	35,69	2,85	12,52	12,00
QME	40,95	13,69	34,12	9,77	3,49	3,00

Fonte: autoria própria (2017)

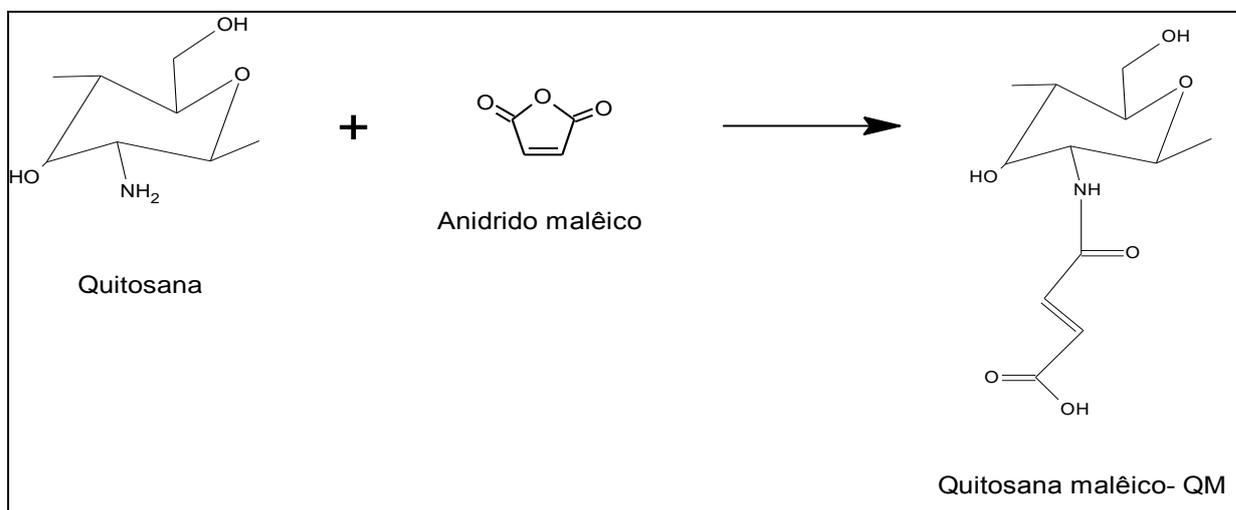
O percentual de carbono do derivado QM apresentado na Tabela 1 é maior em relação à quitosana, e pode-se observar que houve um aumento na quantidade molar desse elemento quando anidrido malêico foi introduzido à matriz polimérica da quitosana, por outro lado o teor de nitrogênio foi menor, uma vez que, a quitosana possui  $5,14 \text{ mmol g}^{-1}$  de nitrogênio e, após reação com anidrido malêico, o valor foi reduzido para  $2,85 \text{ mmol g}^{-1}$ , pois o nitrogênio estava presente apenas na quitosana ocasionando assim um aumento na razão C/N de 6,50 para 12,52 comprovando a eficácia da reação.

A introdução das aminas, com etilenodiamina, ao derivado QM na Tabela 1 conduziu ao aumento da quantidade de nitrogênio observado no material QME como, também uma

diminuição da relação C/N no mesmo quando comparado com o derivado QM como mostrado nos esquemas nas Figuras 4 e 5.

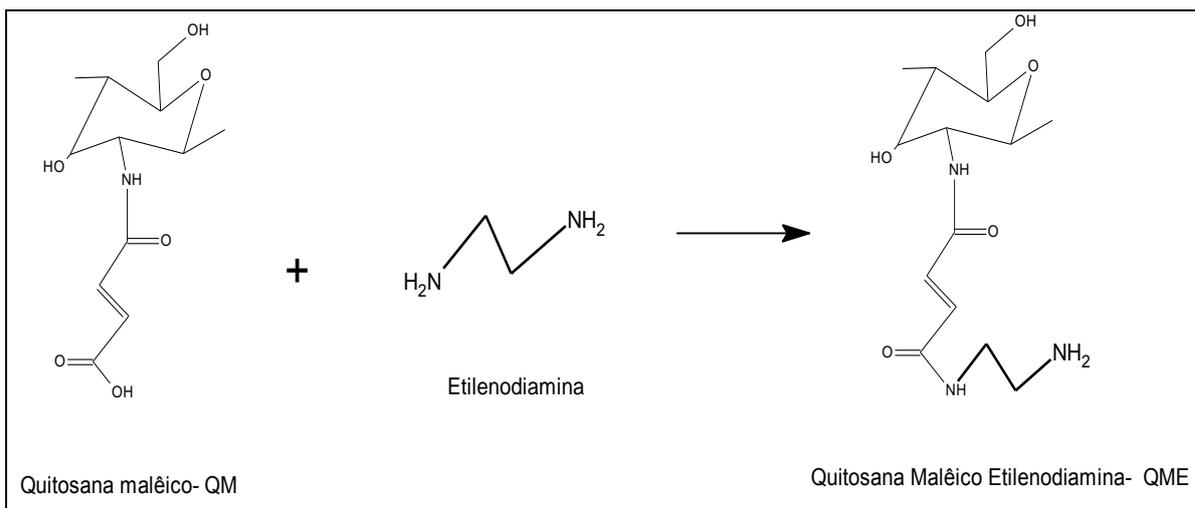
Abaixo estão representadas as propostas de esquema reacional das modificações química realizadas na quitosana, resultando no derivado QM, após reação desta com anidrido malêico e posterior reação deste com etilenodiamina, resultando no derivado QME.

**Figura 4. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana(Q) com anidrido malêico (QM).**



Fonte: autoria própria (2017)

**Figura 5. Proposta de esquema reacional da modificação química da quitosana malêico (QM) e sua reação com etilenodiamina (QME).**



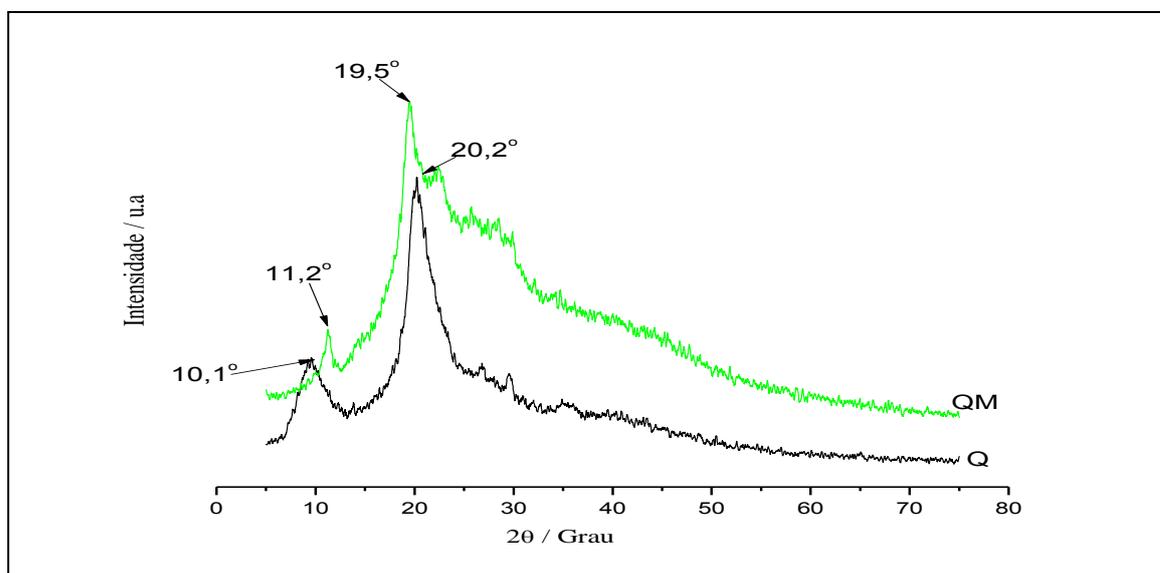
Fonte: autoria própria (2017)

### 3.3.2. Difração de Raios-X

Os dados de difração de raios-X da quitosana e do derivado de quitosana modificada com anidrido malêico são apresentados na Figura 6

Podemos observar que a quitosana apresenta um perfil semicristalino, como pode ser observado na Figura 6 com dois picos característicos em  $2\theta = 10,1^\circ$  e  $2\theta = 20,2^\circ$  que correspondem às regiões não-cristalina e cristalina respectivamente (Luo, et al. 2011; Cruz, et al. 2016).

**Figura 6. Difratoograma de Raios-X da quitosana (Q) e do derivado de quitosana modificada com anidrido malêico (QM).**

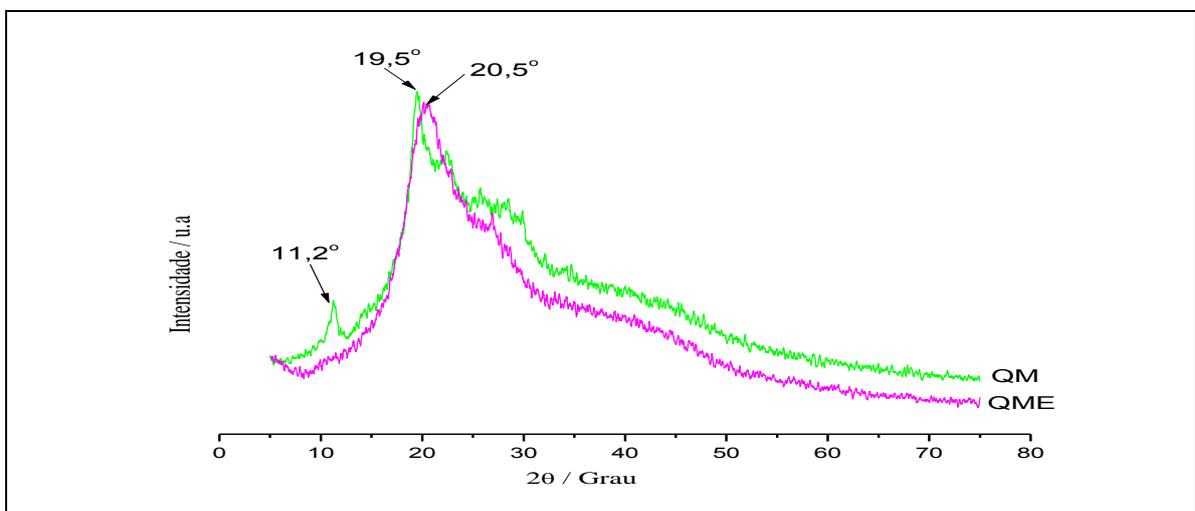


Fonte: autoria própria (2017).

O derivado QM quando comparada com Q observa-se uma diminuição da cristalinidade do derivado em relação ao material precursor, provavelmente devido à introdução dos novos grupos funcionais na sua cadeia polimérica que promovem o rompimento de ligações de hidrogênio intermoleculares da estrutura da quitosana (Braz, 2015; Cruz, et al. 2016).

Já para o derivado QME quando comparado com QM, como podemos observar na Figura 7, ocorre o desaparecimento do pico na região de  $2\theta = 11,2^\circ$  após reação com etilenodiamina e um discreto afinamento do seu pico em  $2\theta = 20,5^\circ$  provando uma aumento na cristalinidade do material.

**Figura 7. Difratoograma de Raios-X da quitosana modificada com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME).**

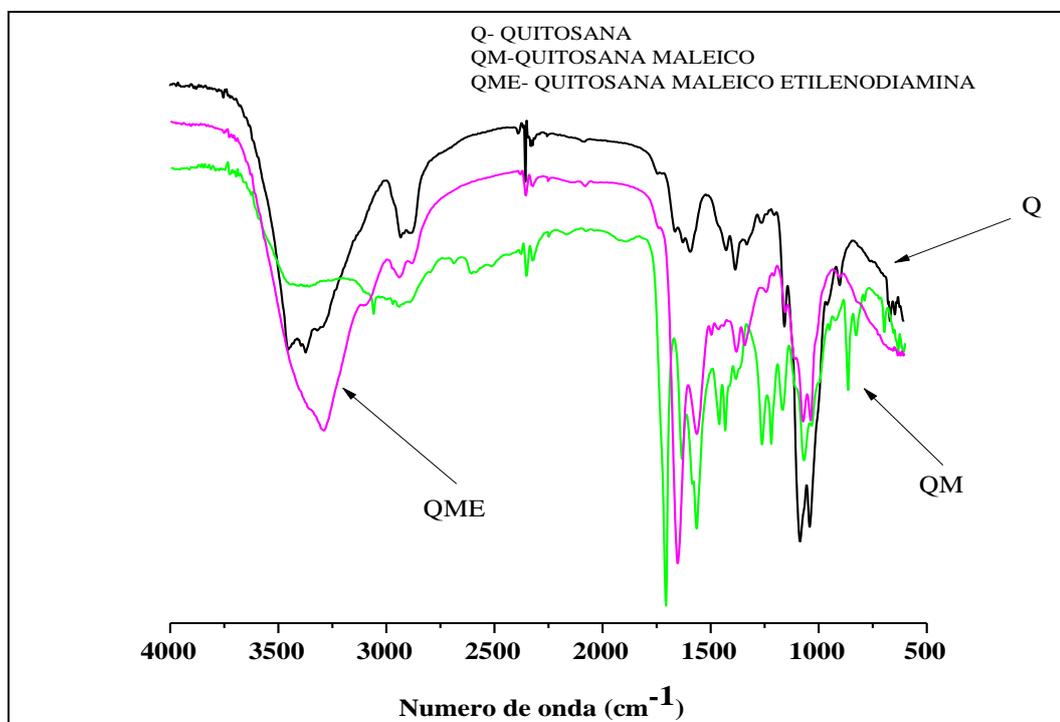


Fonte: autoria própria (2017).

### 3.1.3. Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros da quitosana (Q), dos derivados de quitosana com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) são apresentados na Figura 8.

**Figura 8. Espectro na região de infravermelho da quitosana (Q) e de seus derivados modificados anidrido maléico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME), em pó para solução injetável em pastilhas de brometo de potássio.**



Fonte: autoria própria (2017)

A banda na região de 2930 – 2860 cm<sup>-1</sup> resultantes dos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H do polímero. As bandas entre 1650-1630 cm<sup>-1</sup> estão associadas ao estiramento C=O de amida I, pois a quitosana não está totalmente desacetilada (Oliveira, Oliveira & Fook, 2015). A região 1586 cm<sup>-1</sup> é resultado da sobreposição de duas vibrações: a vibração do grupo amida (designada por amida II) e a vibração de deformação da ligação das aminas primárias presentes nas unidades desacetiladas da quitosana. A banda intensa aparece na região de 1087 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento C-O-C do anel glicopiranosídico, como também os modos vibracionais associados à ligação beta glicosídica β(1→4) estão na região de 1158 cm<sup>-1</sup> e 899 cm<sup>-1</sup> referentes aos carbonos 1 e 4 respectivamente (Monteiro et al., 2015; Da Silva, et al., 2016).

Podemos observar no espectro da QM o surgimento da banda na região de 1740 – 1715 cm<sup>-1</sup> referente à carbonila do ácido carboxílico, como também a banda na região de 1637 cm<sup>-1</sup> relacionada à carbonila do grupamento amida, indicando a incorporação do anidrido maléico na estrutura da quitosana.

No espectro da QME quando comparada com QM observa-se o desaparecimento da banda na região de  $1740\text{ cm}^{-1}$  referente a C=O do ácido carboxílico e o surgimento da banda em  $1557\text{ cm}^{-1}$  da ligação N-H de amina primária após a incorporação do etilenodiamina, comprovando a eficiência da reação quando comparada com QM.

**Tabela 2. Principais bandas do espectro de infravermelho da quitosana (Q) e derivados quitosana malêico (QM) e quitosana malêico etilenodiamina (QME).**

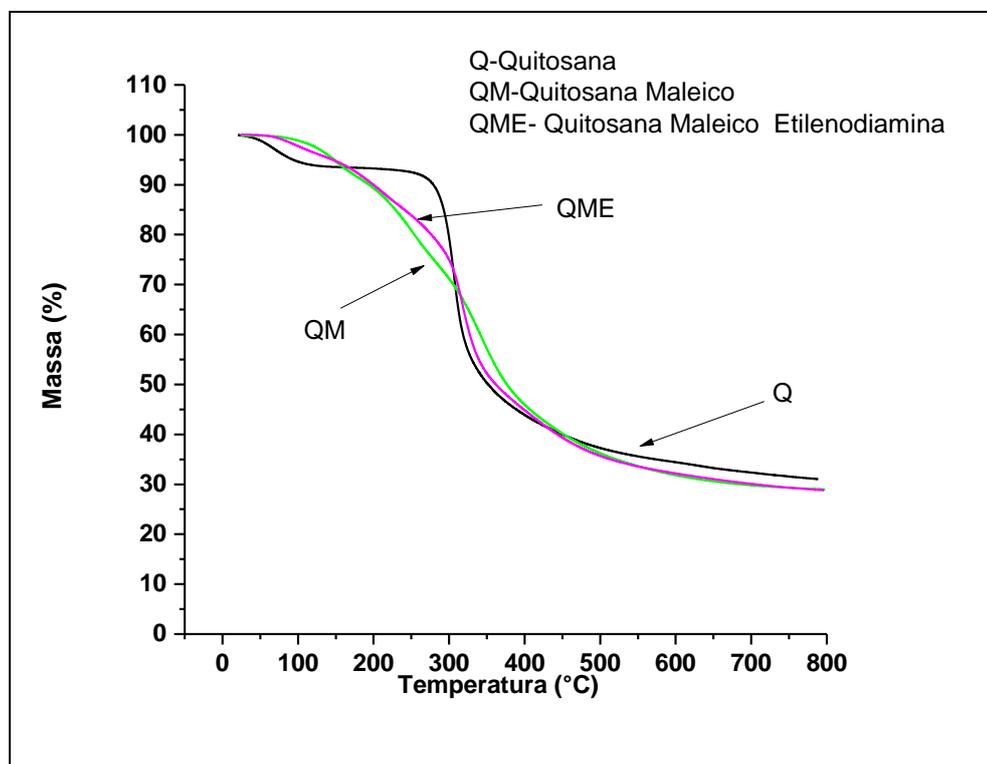
GRUPO FUNCIONAL/ MATERIAL	NÚMERO DE ONDA ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	Q	QM	QME
NH <sub>2</sub> e O-H	3400 a 3100	3395	3278
C-H	2930 – 2860	3004	2999
C=O - Amida	1650-1630	1637	-
C=O (ácido carboxílico)	-	1740-1715	-
C-O-C	1087	1074	1067
$\beta(1\rightarrow4)$	1158-899	1158-893	1158-892
N-H	1586	-	1557
C=C	-	1696	-
C=N	-	1637	1632

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.1.4. Análise Termogravimétrica (TG)

Os perfis de degradação térmica da quitosana e dos derivados de quitosana com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) são apresentados na Figura 9.

**Figura 9. Curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados QM (quitosana modificada com anidrido malêico) e QME (quitosana modificada com anidrido malêico e posterior reação com etilenodiamina).**



Fonte: autoria própria (2017).

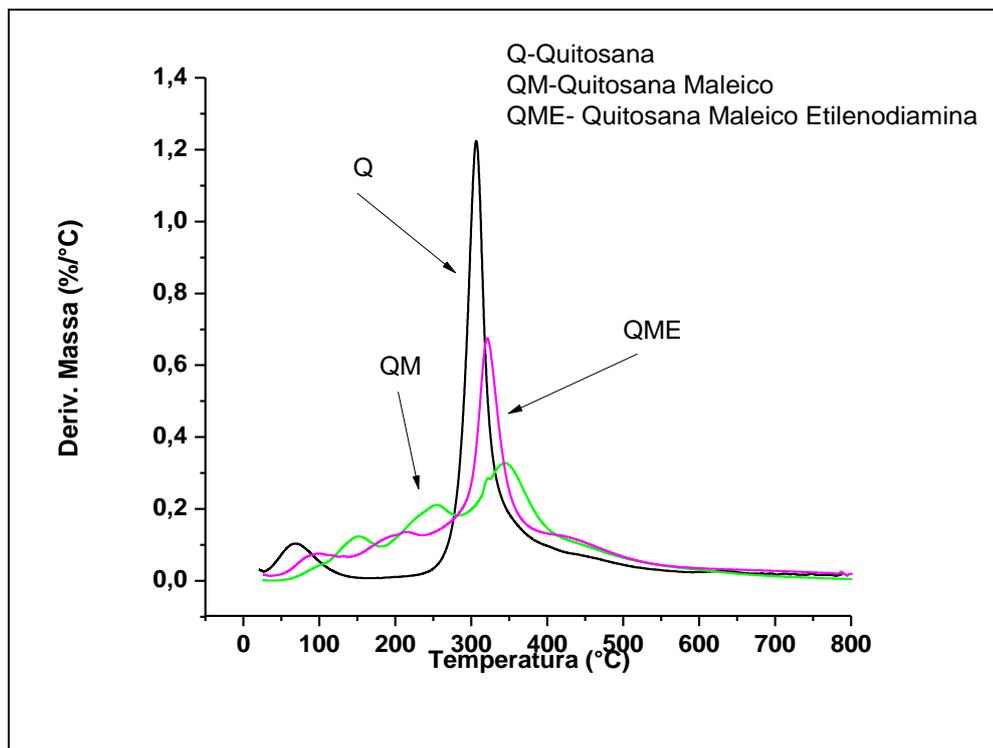
Na curva de TG para quitosana pura, tem-se o primeiro evento de 26 a 118 °C, com perda de massa de 8,38%, corresponde ao processo de desidratação, pois a quitosana apresenta ao longo de sua cadeia grupos amino (-NH<sub>2</sub>) na posição C-2, grupos hidroxila primários (-OH) na posição C-3 e grupos hidroxila secundários na posição C-6. Esses grupos permitem ligações secundárias com a água através de ligações de hidrogênio, o que torna esse polissacarídeo fortemente hidrofílico. Já no segundo evento observa-se uma perda de massa de 59,41% entre 188 a 768°C, referente à degradação térmica do biopolímero (Dantas, et al.2016).

Podemos observar que o perfil de degradação mostra que os processos de decomposição térmica dos materiais quimicamente modificados envolvem mais de um evento

térmico, e isso é claramente evidenciado pelas curvas DTG que apresenta picos distintos tanto pra quitosana quanto para os derivados, como mostra a Figura 10.

Podemos observar que a quitosana modificada com anidrido malêico e posterior reação com etilenodiamina mostraram-se termicamente mais estáveis do que a quitosana como se pode observar analisando os dados da Tabela 3.

**Figura 10: Derivadas das curvas termogravimétricas da quitosana(Q) e derivados QM (quitosana modificada com anidrido malêico) e QME (quitosana modificada com anidrido malêico e posterior reação com etilenodiamina).**



Fonte: autoria própria (2017).

A quitosana modificada com anidrido malêico (QM) apresentou quatro estágios de degradação, sendo no primeiro estágio de degradação térmica com início em 32 a 96°C com perda de massa de 2,02% correspondente à perda de água da superfície do material, os demais estágios referem-se à degradação térmica do material, sendo que o segundo estágio teve início

112 a 160°C, com perda de massa 4,34 %, e o terceiro estágio ocorreu ente 175 a 263°C, com perda de massa 15,6%, ambos referem-se à degradação do grupo mobilizado e o quarto estágio que vai de 285 a 778°C com perda de massa 42,96%, é referente à degradação da quitosana. Assim foi observado um aumento na temperatura de degradação da quitosana gerando uma maior estabilidade na estrutura do polissacarídeo após a modificação.

Já a quitosana modificada com anidrido maléico e posterior reação com etilenodiamina (QME), apresentou três estágios de degradação, o primeiro iniciou-se 26 a 108°C com perda de massa de 6,05%, está relacionado à desidratação do material, o segundo estágio teve início em 137° C e vai até 230°C, com perda de massa de 13,55% , refere-se a degradação do grupo funcional e o terceiro estágio que vai 255° a 798°C com perda de massa de 46,31%, está relacionado a degradação da estrutura do polissacarídeo.

Essa melhor estabilidade térmica dos derivados pode esta relacionada à presença de determinados grupos funcionais inseridos na cadeia polimérica.

**Tabela 3. Resultados de TG/DTG para os derivados da quitosana(Q) e seus derivados modificados com anidrido maléico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME).**

<b>Produtos</b>	<b>Intervalo de Temperatura (°C)</b>	<b>Perda de Massa (PM) (%)</b>	<b>Resíduo (100 – (SOMA% PM))</b>
Q	26 - 118	8,38	32,19
	188 - 592	59,43	
QM	32 – 96	2,02	35,62
	112 – 160	4,34	
	175 – 263	15,06	
	285 - 760	42,96	
QME	26 – 108	6,05	34,09
	137 – 230	13,55	
	255 - 591	46,31	

Fonte: autoria própria (2017)

### 3.2. Atividade antibacteriana

Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana da quitosana (Q) e seus respectivos derivados QM e QME são apresentados nas tabelas a seguir, onde podemos observar que a quitosana (Q) e seus derivados QM e QME apresentaram um melhor efeito inibitório para a cepa *Staphylococcus aureus* quando comparada com a cepa *Escherichia coli*.

**Tabela 4. Efeito inibitório da quitosana (Q) e seus derivados modificados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) sobre cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).**

Amostras	Efeito Inibitório (%) <i>S. aureus</i>
Q	89,85 ± 6,02 b
QM	94,11 ± 2,08 a
QME	81,52 ± 3,00 c

Fonte: autoria própria (2017)

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.

**Tabela 5. Efeito inibitório da quitosana (Q) e seus derivados modificados com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) sobre cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922).**

Amostras	Efeito Inibitório (%) <i>E.coli</i>
Q	71,80 ± 3,78 a
QM	59,00 ± 2,00 b
QME	56,01 ± 3,06 b

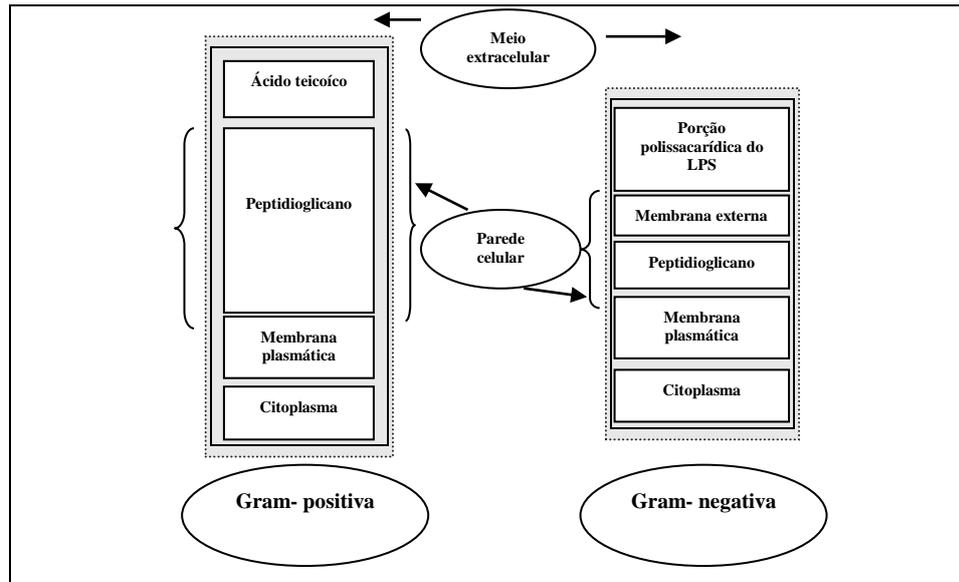
**Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.**

Estudos revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo (Goy, Morais & Assis, 2016).

O mecanismo de ação da quitosana e seus derivados frente aos microrganismos difere entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Na presença de quitosana e de seus derivados a membrana das Gram-positivas é fragmentada, enquanto nas Gram-negativas, o citoplasma se concentra, e o espaço intracelular é ampliado, e esta complexidade pode levar a uma possível redução do efeito inibitório frente a este grupo (Paiva, Souza-neto, & Batista 2014; Lifeng, et al.2004; Lacerda, et al.2015).

A melhor atividade antibacteriana dos materiais foi para a cepa *S.aureus* quando comparada com *E. coli* que pode estar relacionada com as diferenças na composição da parede celular de ambas as bactérias. Na figura abaixo se encontra expresso à diferença entre a parede celular de ambas as bactérias.

**Figura 11. Esquema da Parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.**



Fonte: autoria própria (2017)

Na figura 11, visualiza-se a complexidade química da parede celular das bactérias Gram-negativas, composta por múltiplas camadas, que são formadas externamente por lipopolissacarídeos e proteínas (lipoproteínas e as porinas), que tem por função criar uma barreira de permeabilidade contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, esta possui um espaço periplasmático entre a membrana externa e a membrana citoplasmática e a camada de peptidoglicano, mais delgada, situada entre essas membranas, sugerindo assim uma maior dificuldade de ação de materiais poliméricos neste grupo de bactérias (Raven, Evert & Eichhorn, 2001; Jung, et al. 2010).

Esta complexidade sugere uma maior barreira, favorecendo assim um possível aumento no efeito inibitório da quitosana e seus derivados frente às bactérias Gram-positivas, que possuem parede celular menos complexa conforme se demonstra na figura 11 (Raven, Evert & Eichhorn, 2001; Mendes, et al. 2016; Eaton, et al. 2008).

Por outro lado, destaca-se também que a parede celular das bactérias Gram-positivas possuem os ácidos teicoico e lipoteicoicos, ausente nas Gram-negativas, e que o derivado (QM) incorpora grupos hidrofóbicos a estrutura da quitosana (Q), e essa incorporação podem

reagir mais facilmente com esses componentes provocando assim um melhor efeito inibitório deste derivado com a bactéria *S. aureus* (Mendes, et al.2016).

Modificação das cadeias de quitosana (que é hidrofílica) com compostos hidrofóbicos pode resultar em produtos com um comportamento anfifílico (hidrofílica e lipofílica). Os derivados de quitosana anfifílicos são capazes de se auto montar e formar micelas sob condições adequadas (El-Fray, Niemczyk & Pabin-szafko, 2012; Muzzarellia, et al. 2012).

### **3.3. Estudo da Citotoxicidade da quitosana e derivados**

Para avaliação preliminar da citotoxicidade in vitro da quitosana(Q) e seus derivados modificado com anidrido malêico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) foi realizada pelo método de ensaio de viabilidade celular frente à redução do brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difenil tetrazolio (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 segunda coluna (C (-) = controle negativo).

O teste pela redução frente ao MTT é um método desenvolvido para avaliar a viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))], em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, da cor amarelada para a cor roxa, ocorre apenas em células viáveis, sendo sua densidade diretamente proporcional ao número de células presentes. (Mosmann, 1983).

Os ensaios de viabilidade são passos vitais nos estudos de toxicidade que determinam a resposta celular a um tóxico, fornecendo informações sobre a morte celular e as atividades

metabólicas. Neste sentido foi utilizado para avaliar a citotoxicidade *in vitro* da quitosana(Q) e derivados quitosana malêico (QM) e quitosana malêico etilenodiamina (QME) o ensaio redução ao brometo de [(3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)], método rápido e eficaz para testar a atividade mitocondrial, que se correlaciona muito bem com a viabilidade celular (Sabudin, et al. 2012).

Na tabela 6, estão expressos os resultados de viabilidade celular da quitosana(Q) e dos derivados QM e QME. A porcentagem de células viáveis deve apresentar-se acima de 50%, valor mínimo, para considerar um material biocompatível (Granato, et al. 2009; Medeiros, et al.2016; ISO, 2009).

**Tabela 6. % de viabilidade das amostras de quitosana(Q) e de seus derivados quitosana malêico (QM) e quitosana malêico etilenodiamina (QME) sobre Fibroblastos Humanos (GM07492A), após 52h pelo ensaio de redução ao [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT))]. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio-padrão para experimentos realizados em triplicata.**

AMOSTRAS	MÉDIA (%) / DESVIO- PADRÃO	AGRUPAMENTO
CONTROLE POSITIVO (+)	29,88 $\pm$ 4,04	c
CONTROLE NEGATIVO (-)	100,00 $\pm$ 0	a
QUITOSANA- Q	97,95 $\pm$ 6,35	a
QUITOSANA MALÊICO- QM	34,65 $\pm$ 4,86	c
QUITOSANA MALÊICO ETILENODIAMINA- QME	68,59 $\pm$ 3,31	b

Fonte: autoria própria (2017)

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade e 95% de confiabilidade.

Os resultados acima expressam que o controle positivo apresenta um decréscimo celular, caracterizando a morte celular. Observamos claramente que o material QM afeta o percentual de viabilidade celular, em comparação com o controle negativo. Estes resultados são complementares ao teste de redução ao brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), indicam assim toxicidade do QM, retratando que o material em estudo pode ser sugerido para atividade antitumoral.

Sugere-se que a modificação química realizadas no derivado quitosana malêico (QM) revelou toxicidade, uma vez que a viabilidade celular obtida para as amostra exibiu variações significativas em relação aos grupos controle positivo (+) e negativo (-), com isso, os resultados evidenciam que o mesmo apresenta toxicidade para a cultura de células de fibroblasto humano (GM07492A), expressando assim que, com exceção da quitosana pura e do derivado QME, o derivado QM, tem sua utilização sugerida na atividade anticâncer ou antitumoral, e com o avanço de novas tecnologias e melhor compreensão dos mecanismos no combate ao câncer, materiais poliméricos com elevada toxicidade, estão sendo investigadas devido as suas possibilidades de modificação químicas, na tentativa de obtenção de novos medicamentos, sugerindo a utilização destes como uma possível saída de novos tratamentos (Brandão, et al. 2010).

#### 4. CONCLUSÃO

A quitosana e derivados foram devidamente caracterizados, apresentando evidências de que a modificação química na cadeia polimérica da quitosana foi efetuada.

A análise elementar foi possível observar o aumento no número de carbono com a inserção do anidrido maléico ao derivado QM e o aumento no número de aminas com a incorporação da etilenodiamina ao derivado QME.

Variações nos picos no espectro de DRX da quitosana e derivados 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 pura.

Os resultados do infravermelho mostraram evidências na efetividade da modificação da quitosana(Q) com o derivado modificado com anidrido maléico (QM) e com posterior reação com etilenodiamina (QME) associadas pelo aparecimento e desaparecimento de bandas nos espectros obtidos.

A quitosana modificada com anidrido maléico (QM) e posterior reação com etilenodiamina (QME) mostraram-se termicamente mais estáveis do que a quitosana, por apresentarem mais etapas de degradação corroborando para a efetivação da reação química, conforme se visualizou na análise termogravimétrica.

Os resultados da atividade antibacteriana da quitosana e derivados são promissores e sugerem que formulações farmacêuticas compostas QM poderiam apresentar um melhor efeito terapêutico contra infecções bacterianas do que a quitosana pura, o que poderia ser melhor avaliado por meio de ensaios *in vivo*.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que a modificação da quitosana com anidrido maléico (QM) revelou que o material em estudo é tóxico, em células de fibroblastos humano

,sugerindo assim sua utilização para atividade antitumoral ou anticâncer, já a Quitosana e o derivado QME, por apresentarem resultados promissores de acordo com a literatura, para o teste de toxicidade, mostram-se favoráveis para serem testados em outros ensaios *in vivo*, sugerindo assim sua utilização com biomateriais.

Os resultados do presente estudo indicam que a modificações químicas realizadas na quitosana sugerem que esses materiais são promissores para futuras aplicações nas áreas- médico- farmacêuticas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, S., & Ikram, S. (2015). Chitosan & Its Derivatives: a review in recente innovations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6, 14-30.

Assis, O.B. G & Silva, V. L.S. (2003). Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 223-228.

Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Lia Fook, M. V., Costa, A. C. F. M. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2, 27-34.

Berger, R.R. L, Stamford, M.Ch. T & Stamford, P.N. (2011). Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura, *Revista Ibero-americana de Polímeros*, 12, 195-215.

Brandão, H.N., David,J.P., Couto, R.D., Nascimento, J.P.A., David,J.M.(2010).Química E Farmacologia De Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados De Plantas, *Química Nova*,33, 1359-1369.

Braz, E. M de A.(2015). Propriedades Biológicas de Derivados de Quitosana Acilada. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais. Universidade Federal do Piauí.

Campana-Filho, S.P, Britto. D, Curti. E, Abreu. R.F, Cardoso, B.M, Battisti. M.V, Sim. P.C, Goy. R.C, Signini. R, Lavall. R.L. (2007). Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. *Química Nova*, 30.3, 644-650.

Chetouani, A., Follain, N., Marais, S., Benachour, D., Le Cerf, D. (2017). Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 348-356.

Cruz, J.B., Catão, C.D., Barbosa, R. C., Fook, M.V.L. (2016). Síntese e caracterização de arcabouços de quitosana com agente antineoplásicos. *Revista Matéria*, 21,129-140.

Eaton, P., Fernandes, J.C, Pereira, E., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2008). Estudo de microscopia de força atômica dos efeitos antibacterianos de quitosana em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopia*, 108, 1128-1134.

EI- fray, M., Niemczyk, A., & Pabin-szafko, B.(2012) .Chemical modification of chitosan with fatty acids. *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, 17, 29-36.

Elshaarawy, R. F. M., Refaee, A.A., & El-Sawi,E.A.(2016) .Pharmacological performance of novel poly-(ionic liquid)-grafted chitosan-N-salicylidene Schiff bases and their complexes. *Carbohydrate polymers*, 146, 376-387.

Goy, C. R., Morais, T. B. S. & Odilio, B.G. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 122–127.

Granato, A.E.C. Soares, C.P., Devitto, A.L., Buzone, L.M., De Oliveira, L.C., Vercik, A. Rigo, E.C.S. (2009). Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 1-4. 16 e 17 de Outubro de 2009.

ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

Jung, J. E., Youn, D. K., Lee, H. S., No, K. H., Há, G. J., Prinyawiwatku, W. (2010). Antibacterial activity of chitosan with different degrees of deacetylation and viscosities. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 676– 682.

Lacerda, W. C., Vale, J. S., Lacerda, W. C., Cardoso, J. L. M.S. (2015). Infecção urinária em mulheres: revisão de literatura. *Saúde em foco*, 7,282-295.

Laranjeira, M.C.M., & Favere, V.T. (2009). Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, 32, 672-678.

Lifeng, Q., Zirong, X., Xia, J., Caihong, H., Xiangfei, Z. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.

Lima, E.C.N. L. (2010). Quitosana quimicamente modificada através de cloretos orgânicos e o uso como fonte para remoção catiônica. Tese de doutorado em Ciências. Universidade Estadual de Campinas.

Luo, D., Sang, L., Wang, X., Xu, S. Li, X. (2011). Low temperature, pH-triggered synthesis of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites as potential bone grafting substitutes. *Materials Letters*, 65, 2395-2397.

Medeiros, L.A.D.M., Barbosa, R.C., Rosendo, R.A., Oliveira, D.K.M., Fook, M.V.L. (2016). Esferas de quitosana/ *D. ambrosioides* (mastruz) para aplicação como biomaterial. *Revista Brasileira de Odontologia*, 73, 124-129.

Mendes, L.D., Bresolin, J.D., Assis, O.B.G., Britto, D. (2016). Avaliação in vitro da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. *Brazilian Journal of Biosystems Engineering*, 10, 116-128.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55 – 63.

Mukhopadhyaya, P., Mishra, R., Ranac, D., Kundua, P. P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37, 1457-1475.

Muzzarellia, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Mannod, N., De-Marchis, M., Paoletti, M.G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87, 995-1012.

Osório, L.R. (2013). Propriedades antibacterianas da quitosana e de derivados obtidos na ausência de solvente. Dissertação de mestrado em química. Universidade Federal do Piauí.

Paiva, W.S., Souza- Neto, F.E., & Batista, A.C.L. (2014). Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. *Revista Perspectivas on Line, biologia & saúde*, 14, 37-43.

Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. (2001). *Biologia Vegetal* (6ªEd), Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan (Capítulo 14).

Sabudin ,S., Derman ,M.A., Zainol,I., Noorsal, K. (2012). In Vitro Cytotoxicity and Cell Seeding Studies of a Chitosan-silver Composite for Potential Wound Management Applications *Journal of Engineering Science*, 8, 29-37.

Software Assistat. Versão 7.7. Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Brasil. Programa desenvolvido pelo Prof. Dr. Francisco de A. S. e Silva. Acesso em 23/06/2017. <http://www.assistat.com/indexp.html>.

Tu, Y., Zhou, M., Guo, Z., Li, Y., Hou, Y. Wang, D., & Zhang, L. (2015). Preparation and characterization of thermosensitive artificial skin with a sandwich structure. *Materials Letters*, 147, 4-7.

Velázquez-Del Valle, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N. M., Guerrasánchez, G., Mariaca-Gaspar, G. I.(2012) Chitosan as an alternative to control phytopathogenic fungi on fruits and vegetables in Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6-37, 6606-6611.

Vieira, A. P. Santana, S. A. A., Bezerra, C. W. B., Silva, H. A. S., Melo, J. C. P., Silva- Filho, E. C., Airoidi, C.(2010). Copper sorption from aqueous solutions and sugar cane spirits by chemically modified babaçu coconut (*Orbignya speciosa*) mesocarp. *Chemical Engineering Journal*, 161, 99-105.

Zheng, Y. L & Zhu, F. J.(2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate polymers*, 54, 527- 530.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O aumento no número de microrganismos patogênicos resistentes tem estimulado a busca por novos agentes antibacterianos. A modificação química da quitosana com anidridos orgânicos e com aminas tem se mostrado bastante promissora, sugerindo um leque de aplicações e possibilidades.

As modificações feitas na estrutura do polissacarídeo quitosana com o anidrido malêico e etilenodiamina mostraram resultados conflitantes em relação ao efeito inibitório bacteriano dos materiais e a quitosana pura. Os ensaios de citotoxicidade em células de fibroblasto humano indicaram não toxicidade na quitosana e o no derivado QME, em ambos os materiais, tornando-os promissores para futuras aplicações biomédicas, já o derivados QM apresentou um nível de toxicidade elevado, sugerindo assim sua utilização na terapia anticancer ou antitumoral.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Efetuar caracterizações químicas e morfológicas.
- Associar os derivados com fármaco de ação anti-inflamatória.
- Obter um novo derivado na forma de membrana ou filme para uso tópico.
- Efetuar ensaios de liberação.
- Realizar mais testes *in vitro* e *in vivo*.