



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LANA GLERIEIDE SILVA GARCIA ALVES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA ATIVIDADE
ANTIFÚNFICA QUITOSANA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS**

FORTALEZA

2017

LANA GLERIEIDE SILVA GARCIA ALVES

AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DA MASSA MOLAR NA ATIVIDADE ANTIFÚNFICA
DA QUITOSANA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE
DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof Dr. Rodrigo Silveira Vieira

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A48a Alves, Lana Glerieide Silva Garcia.
Avaliação da influência da massa molar na atividade antifúngica quitosana frente a células planctônicas e biofilmes de diferentes espécies fúngicas / Lana Glerieide Silva Garcia Alves. – 2017.
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.
1. Quitosana. 2. Peso Molecular. 3. Grau de desacetilação. 4. Planctônico. 5. Biofilm. I. Título.

CDD 660

LANA GLERIEIDE SILVA GARCIA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR NA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA
QUITOSANA FRENTE A CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE
DIFERENTES ESPÉCIES FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 21/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^a Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico

Aos meus queridos pais,

Pelo amor que me dedicaram durante
toda a vida

Ao meu amado marido,

Por todo incentivo, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por certificar todas as manhãs em meu coração que eu não estou sozinha, mas que Ele está sempre ao meu lado segurando firme em minha mão em todos os momentos.

Á minha mãezinha, que não mede esforços para me ver feliz. Obrigada, minha rainha, por fazer eu me sentir tão amada e querida. Você, com seus sábios conselhos me guiaram para um bom caminho. Meu coração é extremamente grato por que é você a pessoa a quem eu posso chamar de mãe.

Ao meu pai, por levantar todas as manhãs, sem nunca reclamar ou murmurar, para lutar pelo nosso pão de cada dia e para que tivéssemos sempre o melhor. A sua demonstração de preocupação só me mostra o quanto o senhor nos ama.

Ao meu querido marido, por seu amor, compreensão e carinho. Meu amor, obrigada por perceber minhas preocupações e ter sempre as melhores palavras, por ser otimista e acreditar tanto em mim, muitas vezes muito mais do que eu. Obrigada pela convivência, pelo colo, pelo abraço e por ser tão parceiro. Eu te amo.

Aos meus irmãos, pela preocupação e cuidado.

Ao Professor Rodrigo Silveira Vieira, por ter me aceitado como sua aluna, por seus esforços para nos formar como bons profissionais, assim como pela paciência na correção do trabalho.

Á professora Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por ter me recebido, por estar sempre disposta para esclarecer dúvidas e por me permitir trabalhar da mesma forma que os alunos do PPGMM. Obrigada por trabalhar para que seus alunos tenham as melhores condições de trabalho e aprendizado. A senhora é um exemplo para mim. Obrigada de coração.

Ao professor Marcos Fábio Gadelha Rocha por dedicar tanto tempo na correção e gerenciamento dos artigos, assim como pela preocupação de formar profissionais capacitados, e em especial por aceitar fazer parte da banca de defesa.

Á professora Luciana Barros por ter feito parte da banca de qualificação e por suas valiosas contribuições.

Á professora Valderéz Ponte Rocha por aceitar compor a banca de defesa.

Às amigas de graduação, Priscila Monteiro, Larissa Fiúza, Érika Patrícia que estão sempre á postos para me ajudar a resolver problemas sejam eles pessoais ou profissionais.

Á minha parceira de fluxo, Lucilene Queiroz, pelas horas dedicadas para me ajudar na execução deste trabalho e por cultivar essa amizade com tanto carinho. Eu sou feliz por ter te conhecido nesse processo e por ter sido merecedora da sua amizade. É, o nosso santo bateu! Rainhas dos *Sporothrix!*

Á Rosana Serpa pela paciência e habilidade de transmitir conhecimento. Rosana, você foi essencial nesse processo.

Á Glaucia Guedes, por sempre demonstrar preocupação e ajudar nas rotinas do laboratório da melhor forma.

Á Terezinha Rodrigues, pelos conselhos, por nos oferecer sempre um abraço e palavras de ânimo e pela habilidade de descomplicar as tarefas.

Às lindas mulheres do laboratório, Livia Maria, Jamille Alencar, Ana Luiza Aguiar, Gleiciane Rocha, Patrícia Mendes e Raquel Colares por trazerem beleza, sutileza e organização para o laboratório. Obrigada, meninas, por todo o auxílio diário, por sempre estarem dispostas a ajudar nas situações mais difíceis e inusitadas. Vocês são parceiras.

Ao Vandbergue por me ajudar com as análises e figuras, por ser tão dedicado às atividades do laboratório e por estar disposto sempre para esclarecer dúvidas e auxiliar da melhor forma.

Aos meninos: Ewerton Caracas, Jonathas Sales, Felipe Magalhães, Jaime Acosta, Kleybson Sousa, Lucas Alencar e Tony pelos momentos de descontração, pelo cavalheirismo, pelo respeito e gentileza dos seus gestos.

Á FUNCAP pelo apoio financeiro.

Ao NPL e CEMM pelo suporte técnico.

“Não é sobre chegar ao topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu”

(Ana Vilela)

RESUMO

Atualmente o número de casos de micoses sistêmicas e oportunistas tem sido frequentemente relatado e o uso de antifúngicos clássicos tem demonstrado possuírem espectros de ação reduzidos e efeitos tóxicos sobre as células humanas. Com intuito de investigar novos agentes antimicrobianos sem efeito tóxico o presente estudo avaliou e caracterizou a ação de quitosana com diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação contra células planctônicas de fungos leveduriformes (n=18), dimórficos (n=6) e filamentosos (n=6), dos gêneros *Candida*, *Sporothrix brasiliensis* e dermatófitos, respectivamente. Investigou-se ainda a sensibilidade dos biofilmes de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* na fase de adesão e sobre biofilmes maduros frente a quitosana de alto, médio e baixo peso molecular. Tanto a fase de adesão quanto a fase madura dos biofilmes formados foram avaliados quanto a biomassa e atividade metabólica. As massas moleculares médias das quitosanas de alto, médio e baixo peso molecular foram determinadas por viscosimetria e os valores obtidos foram de 75kDa, 140kDa e 247kDa, respectivamente. Os graus médios de desacetilação das amostras de alto, médio e baixo peso molecular foram determinados por titulação potenciométrica e os valores encontrados foram de 79,03%, 84,18% e 81,8%, respectivamente. O efeito de todas a quitosanas foram mais eficazes frente a *Candida parapsilosis*, seguida por *C. tropicalis* e *C. albicans* com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 4-256 µg/mL, 16-512 µg/mL 256-512 µg/mL, respectivamente. Os resultados apontaram que a quitosana de alto peso molecular (247kDa) foi mais eficaz para inibição do crescimento das espécies de *Candida*, enquanto que para *Sporothrix brasiliensis* quanto menor o peso molecular maior foi a atividade antifúngica. Não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima para as cepas dos fungos filamentosos no intervalo testado. No que se referem aos biofilmes, as amostras foram capazes de reduzir a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros de *Candida* spp. em 85,81% e 90%, e para o *Sporothrix brasiliensis* em até 81,88% e 79,56%, respectivamente. Através da microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura observou-se para a quitosana de baixo peso molecular uma redução visual no número de células viáveis e danos às células fúngicas de *Candida tropicalis*. Os resultados obtidos indicam que a quitosana em estudo, é um composto com propriedades em potencial para controle de biofilme de diferentes espécies fúngicas.

Palavras-chave: Quitosana. Peso Molecular. Grau de desacetilação. Planctônico. Biofilm.

ABSTRACT

Currently the number of cases of systemic and opportunistic mycoses has been frequently reported and the use of classical antifungals has been shown to have reduced action spectrum and toxic effects on human cells. The present study evaluated and characterized chitosan action with different molecular weights and deacetylation degrees against planktonic cells of yeast (n = 18), dimorphic (n = 6) and filamentous (n = 6) fungi, of the genera *Candida* spp., *Sporothrix brasiliensis* dermatophytes, respectively. The investigation followed the biofilms sensitivity of *Candida* spp. and *Sporothrix brasiliensis* in the adhesion and mature phases on biofilms against high, medium and low molecular weight chitosan. The adhesion and mature phases of biofilms formed were evaluated for biomass and metabolic activity. The average molecular weights of the high, medium and low molecular weight chitosan were determined by viscosimetry and the values obtained were 75kDa, 140kDa and 247kDa, respectively. The degrees of deacetylation of the high, medium and low molecular weight samples were determined by potentiometric titration and the values found were 79.03%, 84.18% and 81.8%, respectively. The effect of all chitosans were more effective against *Candida parapsilosis*, followed by *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with MIC (minimum inhibitory concentration) values of 4-256 µg / mL, 16-512 µg / mL 256-512 µg / mL, respectively. The results indicated that high molecular weight chitosan (247 kDa) was more effective in inhibiting the growth of *Candida* species, whereas for *Sporothrix brasiliensis* the lower the molecular weight the greater the antifungal activity. It was not possible to determine the Minimum Inhibitory Concentration for the filamentous fungal strains in the range tested. The biofilm samples were able to reduce the metabolic activity and biomass of the mature biofilms of *Candida* spp. in 85,81% and 90%, and for *Sporothrix brasiliensis* in up to 81,88% and 79,56%, respectively. The data from confocal microscopy and scanning electron microscopy for low molecular weight chitosan showed a visual reduction in the number of viable cells and damage to the fungal cells of *Candida tropicalis*. The results indicate that the chitosan under study is a compound with potential properties for different antifungal applications (topical or medical devices).

Keywords: Chitosan. Molecular Weight. Deacetylation Degree. Planktonic. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Comparação entre a estruturas química da celulose , quitina totalmente acetilada e quitosana totalmente desacetilada.	20
Figura 2 -	Representação esquemática dos mecanismos antimicrobianos da quitosana e de seus derivados (adaptado de HOSSEINNEJAD e JAFARI ., 2016).	29
Figura 3 –	<i>Sporothrix brasiliensis</i> em sua fase filamentosa. A. Macromorfologia das cepas e não-melanizadas (brancas). B. Macromorfologia das cepas e melanizadas (escuras) C. Hifas e conídios em forma de “flor de margarida” (destacados por setas). D. Conídios de <i>Sporothrix brasiliensis</i> em microscopia eletrônica de varredura – Magnitude 10999X.....	36
Figura 4 -	Espécies de levedura do gênero <i>Candida</i> em meio chromagar <i>Candida</i> . (A) <i>Candida albicans</i> ; (B) <i>Candida tropicalis</i> ; (C) <i>Candida parapsilosis</i>	38
Figura 6 –	Organograma de estruturação experimental deste estudo Ilustração das etapas dos ensaios de sensibilidade na fase de adesão dos biofilmes e sobre biofilmes maduros.	52 56
Figura 7 -	Curva de titulação potenciométrica para quitosana de baixo peso molecular (A); Derivada Primeira da curva de titulação potenciométrica para quitosana de baixo peso molecular (B). ...	56
Figura 8 -	Curva de titulação potenciométrica para quitosana de Médio peso molecular (A); Derivada Primeira da curvade titulação potenciométrica para quitosana de Médio peso molecular (B)..	57
Figura 9 -	Curva de titulação potenciométrica para quitosana de alto peso molecular (A); Derivada Primeira da curva de titulação potenciométrica para quitosana de Alto peso molecular (B).....	58
Figura 10 -	Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana comercial de Alto Peso Molecular	59
Figura 11 -	Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana comercial de Médio Peso Molecular	59
Figura 12 -	Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana	

	comercial de Baixo Peso Molecular.....	60
Figura 13 -	Espessura de biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> expostos a diferentes concentrações de quitosana de Baixo Peso	
Figura 14 -	Molecular. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.	76
Figura 15 -	Biomassa de biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> expostos a diferentes concentrações de quitosana de Baixo Peso Molecular. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio.	77
Figura 16 -	Biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> incubadas a diferentes concentrações de quitosana de baixo peso molecular (QBPM). Microscopia confocal de varredura a laser (figuras A-D). A cor verde corresponde a células viáveis. A cor vermelha corresponde á células inviáveis. Microscopia eletrônica de varredura (figuras E-H). As setas vermelhas indicam a destruição do biofilme. As setas amarelas indicam células colapsadas. Magnification: 400x (figuras A-D), 2000x (figura E), 1500x (figura F), 6122x (figura G) e 6000x (figura H). Escalas: 100 μm (figuras A-D), 50 μm (figuras E e F), 20 μm (figuras G e H).	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Potenciais aplicações da quitosana.....	23
Tabela 2 -	Principais componentes da parede celular de dermatófitos.....	40
Tabela 3 -	Identificação e origem de isolamento das cepas.....	44
Tabela 4 -	Determinação do grau de desacetilação da quitosana	56
Tabela 5 -	Valores das massas molares médias viscosimétricas de quitosana comerciais.....	58
Tabela 6 -	Concentração Inibitória Mínima de três tipos de quitosana contra cepas de <i>Candida spp</i> , dermatófitos e <i>Sporothrix brasiliensis</i>	66
Tabela 7-	Concentração Inibitória Mínima de três tipos de quitosana contra cepas de <i>Candida spp</i> , dermatófitos e <i>Sporothrix brasiliensis</i>	67
Tabela 8 -	Atividade metabólica dos biofilmes na fase de adesão de <i>Candida spp</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> após exposição às quitosana (492nm)($p < 0,05$).	71
Tabela 9 -	Atividade metabólica dos biofilmes formados de <i>Candida spp</i> e <i>Sporothrix brasiliensis</i> após exposição às quitosana (492nm)($p < 0,05$).	72
Tabela 10 -	Biomassa dos biofilmes na fase de adesão de <i>Candida spp</i> e <i>Sporothrix spp</i> . após exposição às quitosanas (590 nm) ($p < 0,05$).	73
Tabela 11 -	Biomassa dos biofilmes formados de <i>Candida spp</i> e <i>Sporothrix spp</i> . após exposição às quitosanas (590 nm) ($p < 0,05$)	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain heart infusion
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CV	Cristal Violeta
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
PBS	Phosphate Buffered Solution
Q.A.P	Quitosana de alto peso
Q.M.P	Quitosana de médio peso
Q.B.P	Quitosana de baixo peso
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
XTT	Sal de Tetrazólio – {2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5- [(fenilamino)carbonil]-2H hidróxido de tetrazólio}

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Quitosana	20
2.2	Atividade antimicrobiana da quitosana “in vitro” e “in vivo”	24
2.2.2	<i>Biofilmes</i>	27
2.2.3	<i>Mecanismos de ação e fatores comumente associados a atividade antimicrobiana da quitosana</i>	28
2.2.3.1	<i>Espécies microbianas</i>	30
2.2.3.2	<i>Densidade de carga positiva</i>	30
2.2.3.3	<i>Peso molecular</i>	31
2.2.3.4	<i>pH</i>	32
2.2.3.5	<i>Quantidade de quitosana</i>	33
2.3	Microrganismos	35
2.3.1	<i>Sporothrix schenckii</i>	35
2.3.1.1	<i>Biologia do fungo</i>	35
2.3.1.2	<i>Composição química da parede celular</i>	35
2.3.2	<i>Candida spp.</i>	37
2.3.2.1	<i>Biologia do fungo</i>	37
2.3.3	<i>Dermatófitos</i>	39
2.3.3.1	<i>Biologia dos fungos</i>	39
2.3.2.2	<i>Composição química da parede celular de dermatófitos</i>	40
2.4	Métodos para detecção de compostos com atividade antimicrobiana in vitro.....	41
3	OBJETIVOS	42
3.1	Geral.....	42
3.2	Específicos	42
4	MATERIAL E MÉTODOS:.....	43
4.1	Local de estudo.....	43
4.2	Microrganismos	43
4.3	Agentes antimicrobianos	43

4.4	Desenho experimental.....	45
4.5	Caracterização química da quitosana.....	47
4.5.1	<i>Determinação da Massa molecular por Viscosimetria</i>	47
4.5.2	<i>Análise do Grau de desacetilação.....</i>	47
4.6	Testes de sensibilidade.....	48
4.6.1	Forma planctônica	48
4.6.2	Biofilme.....	49
4.6.2.1	Adesão.....	49
4.6.2.2	Biofilme formado.....	50
4.6.2.3	Ensaio XTT	52
4.6.2.4	Quantificação da biomassa.....	52
4.7	Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).....	52
4.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.9	Análise estatística.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	Caracterização da quitosana	55
5.1.1	<i>Grau de desacetilação da quitosana.....</i>	55
5.1.2	<i>Determinação da massa molar por viscosimetria:</i>	58
5.2	Teste de sensibilidade.....	61
5.2.1	Forma planctônica.....	61
5.2.1.1	<i>Candida spp.....</i>	61
5.2.1.2	<i>Dermatófitos.....</i>	63
5.2.1.3	<i>Sporothrix brasiliensis.....</i>	65
5.2.2	Biofilme.....	67
5.3	Morfologia e estrutura dos biofilmes	75
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A procura por novos agentes com atividade antifúngica se faz necessário tendo em vista que efeitos colaterais podem ser observados durante o uso de antifúngicos clássicos, como por exemplo, a nefrotoxicidade causada pela anfotericina B, antifúngico amplamente utilizado no tratamento de micoses sistêmicas (WADE *et al.*, 2013). Além disso, o número de doenças causadas por fungos não sensíveis aos antifúngicos tem se tornado um problema global (MONTRAVERS; JABBOUR, 2006). Dessa forma, a pesquisa por compostos naturais não tóxicos que possuam atividade antimicrobiana contra patógenos humanos invasivos ou não invasivos torna-se necessária, pois podem reduzir a quantidade administrada dos antibióticos clássicos e, por conseguinte os seus efeitos colaterais.

A quitosana tem boas perspectivas quanto a sua utilização, por ser um composto não tóxico (AAM *et al.*, 2010), biodegradável, além de possuir diversas atividades biológicas já relatadas como antitumorais (QIN, 2002), antioxidativa (LIN *et al.*, 2004); imunoestimulatória (MEI *et al.*, 2013) e atividade antimicrobiana relatada contra diversas classes de microrganismos, como bactérias, fungos e algas (YOUNES *et al.*, 2014). Pode ainda atuar em sinergismo e melhorar a atividade antimicrobiana de produtos farmacêuticos (MU *et al.*, 2014). Alguns estudos sugerem que a forma de atuação da quitosana está relacionada ao seu grau de desacetilação, peso molecular, pH da solução e tipo de microrganismo envolvido (YOUNES *et al.*, 2014).

A quitosana é um polímero natural, composto por unidades de $\beta(1-4)$ D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina, obtida a partir da desacetilação parcial da quitina, segundo polímero mais abundante da natureza depois da celulose, encontrado naturalmente na carapaça de muitos crustáceos. Quando o grau médio de desacetilação torna-se maior que 50% o produto torna-se insolúvel em água devido a protonação dos grupos NH_2 , e torna-se solúvel em condições ácidas (RINAUDO, 2006). Quando em meio ácido os grupos NH_2 são protonados conferindo uma carga positiva a estrutura da quitosana. Acredita-se que a atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada a atração eletrostática entre os polications, grupos amino protonados, e as paredes celulares carregadas

negativamente, sendo este o mecanismo de ação mais aceito para a atuação da quitosana como antimicrobiano (KONG *et al.*, 2010).

Younes *et al.*, (2014), ao estudar a atividade de quitosanas com diferentes massas molares, contra quatro bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* — ATCC 25923, *Micrococcus luteus* — ATCC 4698, *Bacillus Cereus* ATCC 11778 e *Enterococcus faecalis* — ATCC 29212), e quatro bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* — ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* — ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* — ATCC 13883 e *Salmonella typhi*) verificaram que a atividade antimicrobiana da quitosana está diretamente relacionada com suas características, assim como ao microrganismo estudado. Foi também demonstrado recentemente que o peso molecular da quitosana influencia em sua atividade (KULIKOV *et al.*, 2012). Este fato deve-se as diferenças nos mecanismos de ação atribuídos a cada tipo de quitosana. Entre as hipóteses aceitas acredita-se que quitosanas de alto peso molecular interagem com a membrana, enfraquecendo-a, e causando perturbações na célula e fuga do material intracelular. Diferentemente, quitosanas de baixo peso molecular podem penetrar nas células vivas e causar a inibição de várias enzimas, interromper a síntese de proteínas, assim como interromper a síntese de RNA_m (KONG *et al.*, 2010; KIM; RAJAPAKSE, 2005).

Além disso, relacionar a atividade antimicrobiana da quitosana contra biofilmes também é necessária, pois os microrganismos em biofilmes crescem em comunidades multicelulares e produzem uma matriz extracelular que protege contra fatores externos, como mudança de pH, osmolaridade, desidratação, assim como agentes químicos (MITTELMAN, 1998), e estes conferem resistência em centenas ou milhares de vezes a agentes antifúngicos quando comparado às células planctônicas (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013). Atualmente, acredita-se que a maior parte das infecções microbianas no hospedeiro seja causada por patógenos organizados em biofilmes. No hospedeiro, o biofilme tem demonstrado um papel crítico no desenvolvimento de infecções, sendo considerado um importante fator de virulência (PHILLIPS *et al.*, 2012).

A literatura já descreve alguns estudos que demonstram a atividade antimicrobiana da quitosana contra a formação de biofilmes de diferentes espécies microbianas. Silva-Dias *et al.*, (2014) mostraram a ação *in vivo* e *in vitro* da quitosana de baixo peso molecular contra biofilmes de *Candida* spp, embora nesse estudo os autores não investigaram a influencia das propriedades peso molecular e

grau de desacetilação. Estudos também relatam que a quitosana em combinação com a amicacina podem inibir e perturbar biofilmes de *Listeria monocytogenes* (MU *et al.*, 2014). Adicionalmente, estudos de Martinez *et al.*, (2010) mostraram que a quitosana é capaz de remover a maior parte do polissacarídeo capsular de espécies de *Cryptococcus neoformans*.

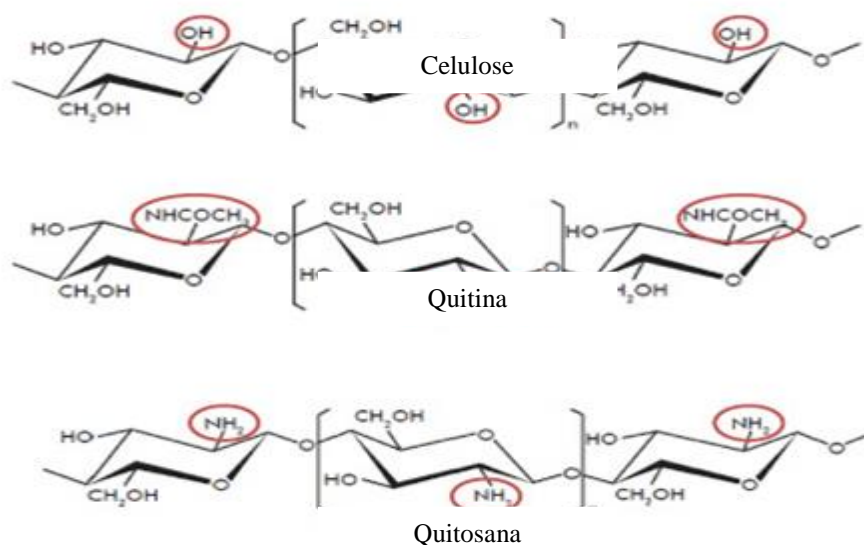
Embora a atividade antifúngica da quitosana já tenha sido demonstrada para uma série de microrganismos, estudos a respeito da atividade antimicrobiana da quitosana contra cepas do gênero *Sporothrix* são pouco relatadas. Além disso, não se sabe a influência do peso molecular da quitosana sobre os biofilmes de espécies fúngicas. Dessa forma, o presente estudo objetiva caracterizar três diferentes tipos de quitosanas e testá-las frente a células planctônicas de *Candida* spp, *Sporothrix brasiliensis* e dermatófitos e biofilmes de *Candida* spp, *Sporothrix brasiliensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Quitosana

A quitina (Figura 1) é um polissacarídeo linear, semelhante a celulose (Figura 1), composta por unidades N-acetil-D-glicosamina (STANLEY, 2013) comumente encontrado na natureza, descoberta pela primeira vez em cogumelos no ano de 1811 pelo professor francês Henri Braconnot que a denominou fungina. Em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel de insetos e o nomeou de quitina, nome derivado da palavra grega “chiton”, que significa carapaça ou caixa protetora. Em 1859, Roughet descobriu que a quitina poderia ser transformada em sua forma solúvel em água após manipulação química. Depois disso, em 1870, esta quitina modificada foi denominada quitosana. A quitina pode ser obtida de várias fontes, mas encontra-se principalmente no exoesqueleto de artrópodes e moluscos. No entanto, vários microrganismos também produzem quitina incluindo a parede celular de bolores e leveduras (SHARP, 2013; JOTHI; NACHIYAR, 2013). Sendo esta o polímero mais abundante na terra depois da celulose. (WANG *et al.*, 2013)

Figura 1- Comparação entre a estruturas química da celulose , quitina totalmente acetilada e quitosana totalmente desacetilada.



Os resíduos dos crustáceos como as cabeças, caudas e conchas são considerados não comestíveis (ISLAM; KHAN; TANAKA, 2004), e representam cerca de metade do peso total do marisco. Ou seja, uma grande quantidade de biomassa residual é desprezada e tem impacto negativo sobre o ambiente. Por esse motivo, os resíduos dos crustáceos são escolhidos como fonte para o isolamento da quitina (RAMÍREZ *et al.*, 2010), a partir da qual pode ser obtida a quitosana .

A quitosana (Figura 1) pode ser obtida por desacetilação da quitina através de método alcalino ou enzimático. Em ambos, o objetivo é remover os grupos acetil, no entanto, o processo de desacetilação nunca é completo (ABDULKARIM *et al.*, 2013). No processo alcalino as matérias-primas obtidas após desmineralização, desproteínização e descoloração da quitina são misturadas com NaOH a 40%. As quitosanas com diferentes graus de desacetilação são geradas dependendo da temperatura de reação, do tempo e da concentração da solução alcalina (TENG, 2011; YUAN *et al.*, 2011). Os tratamentos alcalinos hidrolisam os grupos acetil e transformam as unidades de N-acetil-D-glucosamina em unidades D-glucosamina com grupos de NH₂ livres (JUNG, ZHAO, 2011). O tratamento alcalino pode causar poluição ambiental, requer energia significativa e produz quitosana de baixa qualidade. Portanto, os métodos enzimáticos poderiam substituí-lo para superar essas limitações (TENG, 2011; RAVAL; RAVAL; MOERSCHBACHER, 2013).

No processo de desacetilação enzimática, os grupos acetil da quitina são hidrolisados pela quitina-desacetilase. Esta enzima foi encontrada pela primeira vez em *Mucor rouxii* em 1794 (TENG, 2011). No entanto, há também alguns problemas de produção da enzima durante o processo fermentativo.

Após o processo de desacetilação a quitosana terá um maior número de unidades N-acetil-D-glicosamina do que D-glicosamina (KUBOTA *et al.*, 2000). Portanto, quando a porcentagem de N-acetil-D-glicosamina for superior à porcentagem de D-glicosamina o biopolímero é chamado de quitina, quando o contrário ocorre, o biopolímero é denominado quitosana (RAMÍREZ *et al.*, 2010 ; KHOR; LIM, 2003).

De acordo com o grau médio de desacetilação, parâmetro utilizado para determinar o conteúdo médio de N-acetil-D-glicosamina, podem-se obter quitosana com diferentes características físico-químicas como: solubilidade, pKa e viscosidade (SINGLA *et al.*, 2011). A medida que o grau de desacetilação aumenta a

possibilidade de degradação da quitosana também aumenta (LE DUNG *et al.*, 1994). Quitosanas comerciais podem possuir valores de grau de desacetilação variando de 70-95% e massa molar variando de 10^4 - 10^6 g.mol⁻¹. Esses dois parâmetros estão intimamente relacionados com as propriedades deste polissacarídeo (DOMARD, 1987; MIMA *et al.*, 1983) por esse motivo, é indispensável a determinação destes.

A quitosana é considerada um polímero policatiônico, não tóxico, biodegradável e biocompatível. Em virtude disso, tem despertado o interesse dos cientistas e tecnólogos para o uso em diversas aplicações: alimentos (CUI; KONG; ZHANG, 2012; PARK; KIM, 2010), indústria farmacêutica (DASH *et al.*, 2011), no desenvolvimento de cosméticos, especialmente na área biomédica (DIBAN; STAMATIALIS, 2014; SUDHA *et al.*, 2013). A Tabela 1 reporta algumas aplicações da quitosana em diferentes segmentos. No entanto, uma das limitações do seu uso deve-se a sua insolubilidade em solução aquosa, sendo solúvel em ácidos diluídos como o ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico, sendo o pH ideal entre 6,0 e 6,5.

Tabela 1 - Potenciais aplicações da quitosana

Campos	Exemplo de aplicação	Referencias
Farmacêutico	Vectores não-virais para entrega de genes	Dash <i>et al.</i> , 2011
	Encapsulamento e proteção de constituintes genéticos e ativos	Riva <i>et al.</i> , 2011
	Liberação gradual de medicamentos	Sinha <i>et al.</i> , 2004
	Melhorar a chegada dos ácidos nucleicos às metas terapêuticas	Lee <i>et al.</i> , 2001
Biomateriais	Fabricação de andaimes para regeneração de tecidos	Yang, 2011
	Barreira de curativo à base de quitina para infecções microbianas	Jayakumar <i>et al.</i> , 2010
	Desenvolvimento de pontos cirúrgicos	Pillai <i>et al.</i> , 2009
	fabricação de lentes de contato	Wysokowski., 2015
Alimentos	Barreira protetora contra a deterioração dos alimentos	Khoushab & Yamabhai, 2010
	Aditivos conservantes para alimentos contra a formação de biofilmes	Aranaz <i>et al.</i> , 2009
	Compostos estabilizadores e espessantes	Harish Prashanth & Tharanathan, 2007
	Prebióticos (fibras dietéticas) ingredientes	Arvanitoyannis, 2008
Imobilização de enzimas	Suporte de imobilização enzimática em materiais à base de quitina e quitosana (vinho, açúcar e águas residuais)	Krajewska, 2004
	Fabricação de biossensores para medições de contaminantes ambientais e controle de órgãos artificiais	

2.2 Atividade antimicrobiana da quitosana “in vitro” e “in vivo”

Diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar a atividade antimicrobiana da quitosana contra o crescimento de diferentes classes de microrganismos como bactérias, bolores e leveduras. A atividade da quitosana contra bactérias tem se mostrado ser mais eficiente quando comparada com a ação antifúngica.. A atividade da quitosana pode ser influenciada por diversos fatores, como grau de desacetilação, Peso molecular, concentração do polissacarídeo, pH, e microrganismo envolvido.

Younes *et al.* (2014) estudaram a ação de 15 diferentes tipos de quitosana com diferentes graus de acetilação (DA) e pesos moleculares (MW) contra o crescimento de quatro espécies de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus*), quatro espécies de Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhi*) e três espécies fúngicas (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Alternaria solani*). Os autores mostraram que quanto maior o valor do grau de desacetilação e do pH maior será a atividade da quitosana, o que corrobora para a hipótese das interações eletrotásticas que existe entre a bactéria carregada negativamente e as cargas positivas da quitosana devido a protonação dos grupamentos $-NH_2$. Com relação aos estudos com fungos, as propriedades da quitosana não foi o fator que mais influenciou na atividade da quitosana, mas sim o tipo de fungo estudado.

Para avaliar a atividade “in vivo” da quitosana, Mei *et al.* (2015) inocularam em suínos suspensão de *Trichophyton rubrum* e trataram a pele dos animais com diferentes concentrações de quitosana. Quitosana a 5% (m/v) foi capaz de promover crescimento normal dos pelos e ausência de sinais de infecção foi observada, resultado que se comparou ao grupo tratado com fluconazol a 0,1%.

Diferentes espécies de *Candida* tiveram seu crescimento inibido por concentrações de oligoquitosanas, com diferentes pesos moleculares, que variaram de 16-2048 μ g/mL. As amostras com peso molecular de 0,73 e 2,09 KDa foram capazes de inibir as estruturas de hifas em 35-55% com apenas $\frac{1}{2}$ da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foi demonstrado, pela primeira vez, que as concentrações sub-inibitórias das oligoquitosanas foram suficientes para causar graves alterações da parede celular e da estrutura celular interna. Com base nos resultados

encontrados nesse estudo, o autor sugere a utilização da quitosana como uma possível alternativa em composições farmacêuticas (KULIKOV *et al.*, 2014).

Tomando como base a aplicação da quitosana para aumentar a vida de prateleira de frutas, De Oliveira *et al* (2014) avaliou a eficácia da quitosana contra o crescimento de *Botrytis cinérea* e *Penicillium expansum* em meios laboratoriais e quando aplicado como revestimento sobre uvas de mesa. A quitosana inibiu o crescimento micelial, a germinação de esporos e causou alterações morfológicas nos esporos das estirpes de fungos testados. Os revestimentos de quitosana retardou o crescimento de fungos em uvas que foram infectadas artificialmente, assim como uvas com revestimento de quitosana tiveram perda de peso entre 5% e 8% enquanto que uvas não revestidas apresentaram perdas de peso de 10 a 15%.

Ademais, a quitosana tem seu efeito comprovado contra espécies de fungos dermatófitos. Estes fungos são responsáveis pelas doenças chamadas de dermatofitoses, considerada um importante problema de saúde (GHANNOUM *et al.*, 2003). Os fungos que causam tais doenças são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epydermophyton*. O aumento das infecções causadas por fungos vêm sendo amplamente divulgada na literatura nos últimos anos, sendo as dermatomicoses as principais infecções responsáveis por esse aumento. Cerca de 10-15% da população humana tem possibilidade de ser infectada no decorrer de sua vida (SIDRIM *et al.*, 2004, pg.136).

Sajomsang *et al.*, (2012) estudaram a propriedade antifúngica dos derivados quaternizados de quitosana contra o crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*. Todos os derivados quaternizados de quitosana apresentaram menores valores de CIM contra *T. rubrum* do que *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*. Os valores de CIM encontrados foram na faixa de 125-1000 µg/ml para todos os fungos.

Apesar das vantagens da quitosana, a fraca solubilidade, baixa área superficial e porosidade da quitosana são os principais fatores limitantes da sua utilização. A sua solubilidade é limitada a um pH superior a 6,5, em que a quitosana começa a perder a sua natureza catiónica. Este problema é provavelmente o principal fator limitante da utilização da quitosana, uma vez que muitos ensaios enzimáticos são realizados a pH neutro. Portanto, várias estratégias têm sido empregadas para melhorar a sua atividade antifúngica como, por exemplo, modificações estruturais a fim de torná-las hidrossolúveis (BADAWY *et al.*, 2011; LI

et al., 2015; QIN *et al.*, 2006). Chatterjee, Chatterjee e Guha (2014) com o objetivo de obter quitosana solúvel em água, após a dissolução com ácido acético o produto foi hidrolisado e rotaevaporado. Em seguida, foi adicionada uma mistura acetona-água e após obtenção da quitosana solúvel em água, a ação fungistática antifúngica contra *M. phaseolina* foi testada. Seus resultados mostraram que quitosana solúvel em água é capaz de inibir o crescimento do fungo, assim como aumentar a atividade de enzimas relacionadas à defesa de mudas de plantas. Sendo assim, vemos que a modificação da quitosana para torná-la hidrosolúvel é uma alternativa interessante para ampliar o uso da quitosana.

Outra alternativa utilizada para melhorar a atividade antifúngica da quitosana é a utilização de nanopartículas de quitosana. O interesse da utilização de nanopartículas de quitosana é devido à sua biodegradabilidade, alta capacidade de permeabilidade, não tóxica para humanos, baixo custo e atividade antifúngica de largo espectro (SHUKLA *et al.*, 2013). Em comparação com outras formas físicas da quitosana, as nanopartículas de quitosana apresentam atividade biológica versátil devido as alterações em suas características físico químicas como o tamanho, a área superficial, natureza catiônica, os grupos funcionais ativos e eficiência de encapsulação sozinho ou através de misturas com outros componentes (SAHARAN *et al.*, 2013).

No estudo de Saharan *et al.* (2013), estes autores avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de nanopartículas de quitosana, quitosana-saponina e Cu-quitosana. As propriedades antifúngicas de nanopartículas foram testadas contra o crescimento de fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. As concentrações variaram de 0,001% a 0,1% m/v. Entre as várias formulações de nanopartículas a de Cu-quitosana apresentou o melhor resultado, na concentração de 0,1% e mostrou 89,5%; 63,0%; 60,1% de inibição de *Alternaria alternata*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, respectivamente. Com base nos resultados encontrados, o autor sugere a avaliação da eficácia de nanopartículas de quitosana e Cu-quitosana contra outros fungos fitopatogênicos em modelos “*in vitro*” e “*in vivo*”, além de sugerirem o desenvolvimento de um fungicida a base de nanopartículas de quitosana para a proteção de culturas no futuro.

Torabi *et al.* (2016) apresentaram um método de preparação filmes acrílico/quitosana com propriedades antibacterianas e não-tóxicas, através de um

processo “amigo do ambiente” contendo resina acrílica a base de água e quitosana. A atividade antibacteriana de filmes foi estudada da presença de *S.aureus* e *E.coli*. As películas que tinham 40% em peso de quitosana apresentaram a maior atividade antibacteriana contra as bactérias citadas acima. O estudo também demonstrou que os filmes não apresentam toxicidade. Películas formuladas com quitosana e nano partículas de resina apresentam uma nova geração de revestimento antibacteriano e não tóxicos com propriedades de formação de filme adequado (TORABI *et al.*, 2016).

2.2.2 Biofilmes

Biofilmes são comunidades densas de células bacterianas que crescem sobre uma superfície e ficam aderidas a ela devido a polímeros auto secretados (COSTERTON *et al.*, 1995). Corrosão e incrustações biológicas de equipamentos industriais assim como infecções crônicas em ambientes clínicos podem ser provocadas pela formação de biofilmes (PARSEK; SINGH, 2003).

Os antibióticos, detergentes ou biocidas parecem ser mais eficazes contra as células planctônicas do que contra biofilmes de bactérias (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013). Testes de susceptibilidade com modelos “*in vitro*” demonstraram que bactérias formadoras de biofilmes sobrevivem após o tratamento com antibióticos em centenas ou mil vezes a concentração inibitória mínima de células planctônicas (CERI *et al.*, 1999).

Segundo Ceri *et al.*, (1999) os biofilmes de bactérias podem funcionar como um nicho para o retorno de infecções durante paradas de quimioterapias com antibióticos. A formação de biofilme é importante na patogênese de infecções associadas aos polímeros (ANTOCI *et al.*, 2008) .

Vários estudos apresentam a atividade anti-biofilme da quitosana e sua capacidade de causar danos aos biofilmes formados por bactérias tais como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* e levedura como *Cryptococcus neoformans*. (MARTINEZ *et al.*, 2010; ORGAZ *et al.*, 2011).

Em seus estudos, Mu *et al.* (2015) avaliaram os efeitos sinérgicos e aditivos da quitosana com amicacina, clindamicina, vancomicina e eritromicina contra biofilmes de *L. monocytogenes*. Os dados de destaque mostraram que a

combinação de quitosana e amicacina pode ser útil para o tratamento de biofilmes de *L. monocytogenes* e ajuda a evitar a propagação da resistência aos antibióticos através da melhoria da eficácia do antibiótico.

Peng *et al.* (2011) demonstraram que derivados de quitosana inibem o gene de transcrição *icaA*, responsável pela formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* sobre uma superfície de titânio.

O efeito de um derivado de quitosana (carboximetilquitosana) sobre biofilmes de espécies mistas de fungos e bactérias foi avaliado por Tan *et al.*, (2016). Os resultados da sua pesquisa mostraram que na concentração de 2,5mg/mL houve redução de 72,87% nos biofilmes de espécies mistas. De igual modo, a atividade metabólica de biofilmes de espécies misturadas foi reduzida em 70% após o tratamento com 2,5mg/mL de carboximetilquitosana.

A fim de comparar o efeito da quitosana sobre células planctônicas e sobre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, Machul *et al.* (2015) utilizaram quitosana e micropartículas de quitosana em diferentes concentrações. As maiores concentrações de quitosana e das submicropartículas foram as mais eficazes contra a forma planctônica e contra os biofilmes. No entanto, foi visto que quitosana apresentou uma proeminência na ação bactericida quando comparado as submicropartículas de quitosana.

2.2.3 Mecanismos de ação e fatores comumente associados a atividade antimicrobiana da quitosana

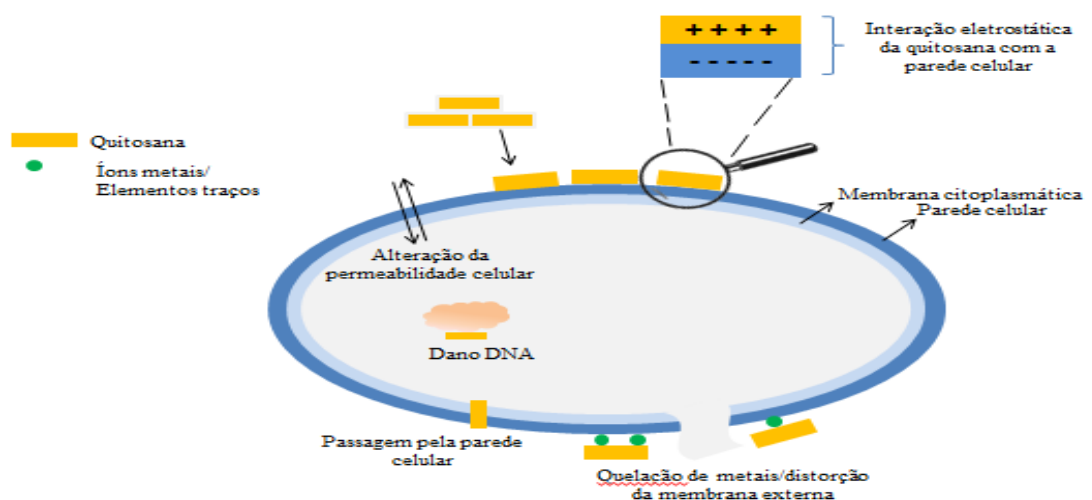
Ainda não se conhece, de forma clara, o mecanismo de ação da quitosana, no entanto, vários mecanismos têm sido propostos (Figura 2), sendo o mais aceito a interação entre as moléculas de quitosana positivamente carregadas e os resíduos na superfície da célula microbiana carregados negativamente (SEVERINO *et al.* , 2015; LI; YANG; YANG., 2015). Li *et al.* (2015) demonstraram que o mecanismo de ação do derivado de quitosana foi devido às interações de grupos NH_3^+ catiônicos com as membranas celulares carregadas negativamente, que conseqüentemente afetou a permeabilidade da membrana. A micrografia eletrônica de transmissão mostrou que na ausência do derivado de quitosana as células de *Escherichia coli* tinham superfície compacta, sem liberação de

componentes intracelulares e ausência de rupturas notáveis nas superfícies celulares.

Quitosana também inibe o crescimento microbiano pela quelação de nutrientes e metais essenciais (LI *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2016). Devido a sua capacidade quelante, a quitosana tem sido amplamente utilizada na indústria (KURITA, 1998) para a remoção ou recuperação de íons metálicos. Já foi investigada sua alta capacidade quelante para vários íons metálicos incluindo Ni_{2+} , Zn_{2+} , Co_{2+} , Fe_{2+} , Mg_{2+} e Cu_{2+} . Íons metálicos que se combinam com as moléculas da parede celular do microrganismo são fundamentais para a estabilidade da parede celular. Logo, a quelação desses íons, efetuada pela quitosana, têm sido proposto como um possível mecanismo de ação.

Ademais, quitosana pode formar uma membrana polimérica na superfície da célula e impedir que os nutrientes penetrem-na (HELANDER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2010). Ou, ainda, pode funcionar como uma barreira de oxigênio que pode interferir no crescimento de bactérias aeróbias (YUAN *et al.*, 2016). Além dos mecanismos já propostos na literatura, existem vários fatores que podem influenciar na atividade da quitosana como a espécie microbiana, densidade de carga positiva, peso molecular, pH e quantidade de quitosana.

Figura 2 - Representação esquemática dos mecanismos antimicrobianos da quitosana e de seus derivados



Fonte: adaptado de HOSSEINNEJAD e JAFARI ., 2016).

2.2.3.1 Espécies microbianas

Os diferentes gêneros de microrganismos respondem de forma diferente a ação da quitosana. A ação antifúngica da quitosana está relacionada com a supressão da esporulação e germinação de esporos (HERNANDEZ-LAUZARDO *et al.*, 2008). Mecanismos pouco mais complexos estão associados a ação antibacteriana do polímero, uma vez que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem diferentes características celulares.

Estudos demonstram que bactérias Gram-negativas são mais sensíveis do que bactérias Gram-positivas (CHUNG *et al.*, 2004; NO *et al.*, 2002). Em contrapartida, outros autores relatam a maior eficiência da quitosana em bactérias gram-positivas, sugerindo a membrana externa presente nas bactérias Gram-negativas como uma possível barreira a ação da quitosana (ZHONG *et al.*, 2008).

Wang *et al.* (2004) demonstra ainda não haver diferença significativa entre as atividades antibacterianas contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No geral, com base nas evidências disponíveis bactérias são mais sensíveis a ação da quitosana do que os fungos, sendo a atividade antifúngica mais elevada quanto menor o valor de pH (ROLLER; COVILL, 1999). Sugere-se ainda que a idade das células é fator determinante para a eficiência antimicrobiana, pois a negatividade eletrônica na superfície das células pode variar com as fases de crescimento.

2.2.3.2 Densidade de carga positiva

Pesquisas relatam que a ação antimicrobiana da quitosana se deve a sua natureza policatiónica. A maior densidade de carga positiva leva a uma forte interação eletrostática. A carga positiva está relacionada com o grau de substituição (DS) ou grau de desacetilação (DD). Microesferas de quitosana com elevado DD (97,5%) conferiram maior atividade antimicrobiana do que aquelas que apresentavam DD moderado (83,7%) contra *Staphylococcus aureus* (KONG *et al.*, 2010).

Takahashi *et al.* (2008) reportaram que amostras de quitosana com maior grau de desacetilação, ou seja, com maior número de cargas positivas inibiram o crescimento de *S. aureus* sugerindo que a ação antibacteriana do composto aumenta com o aumento do DD.

No que diz respeito aos derivados de quitosana, a atividade depende do grau de substituição dos grupos adicionados. Pesquisas revelaram que a atividade antibacteriana de derivados de quitosana solúveis em água contra *Escherichia coli* e *S. aureus* foi afetada pelos dissacarídeos (YANG *et al.*, 2005). Os autores deste mesmo estudo sugeriram que os grupos adicionados mudaram o pKa da molécula de quitosana, que produziram uma maior protonação das diferentes moléculas derivadas de quitosana, favorecendo maior quantidade de cátions.

A combinação de quitosana com metais também pode levar ao aumento na densidade de cargas positivas e melhorar a eficiência antimicrobiana. Chen *et al.* (2005) formularam em seu estudo um complexo de quitosana com prata. Como resultado foi observado que além de melhorar a estabilidade da Ag⁺, a adição do metal reforçou a atividade antibacteriana em 20 vezes quando comparado a quitosana sem adição da Ag⁺. De igual modo, Wang *et al.*, (2004) comprovaram que a ação da quitosana quando combinada com Zn apresentava amplo espectro de atividade antimicrobiana efetiva, aumentando de 2 a 8 vezes a capacidade da quitosana como agente antimicrobiano.

2.2.3.3 Peso molecular

Inúmeras investigações sugerem que a variação no peso molecular da quitosana leva a dois mecanismos de ação diferentes. O mecanismo de ação ligado a quitosana de alto peso molecular, o qual propõe a deposição de quitosana sobre a parede celular, uma vez que esta não pode passar pela membrana, levando ao enfraquecimento da membrana, ruptura da célula e vazamento celular. Por outro lado, quitosana de baixo peso molecular penetra na célula microbiana e causa a inibição de várias enzimas e interrupção da síntese de proteínas (KONG *et al.*, 2010; RABEA *et al.*, 2003).

Em seus estudos Ye *et al.* (2008); relataram que películas revestidas com quitosana de baixo peso molecular foram mais eficientes contra *Listeria monocytogenes* em bifes de presunto do que as películas revestidas com quitosana de médio peso molecular, pois após 72h de ação dos filmes incorporados com quitosana a diferença nas contagens entre as duas quitosana foi de 1,8 log₁₀ UFC/mL.

Li *et al.* (2010) estudaram a atividade de inibição da quitosana com PM de 3, 50, e 1000 kDa e grau de desacetilação de 95% contra *E.coli*. Em seus resultados foram visto que os valores de CIM para quitosana com 3, 50 e 1000 kDa foi de 0,05%, 0,1%, e 0,2% m/v, respectivamente.

A atividade antimicrobiana de seis quitosanas (PM=1671, 1106, 746, 470, 224, and 28 kDa) e seis oligômeros de quitosanas (PM=22, 10, 7, 4, 2 e 1 kDa) contra sete bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus megaterium* KCTC 3007, *B. cereus* ATCC 21366, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *L. brevis* IFO 13109 e *L. bulgaricus* IFO 3533) e quatro bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 21541, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802) foram examinadas por No *et al.* (2002). Os seus achados mostraram que as CIMs da quitosana com 470kDa foram menores para bactérias gram-negativas e maiores para a quitosana de 1106kDa. Com excessão de *Lactobacillus sp.*, as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis a quitosana com menor peso molecular. Em contraste com as bactérias Gram-negativas, quitosana com 1106kDa foi mais eficaz na inibição do crescimento de *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*.

2.2.3.4 pH

A atividade antimicrobiana da quitosana é dependente do pH, pois a quitosana é solúvel unicamente em meio ácido e a molécula se torna policatiônica quando o pH está abaixo de 6, favorecendo a interação com substâncias carregadas negativamente como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos graxos, ácidos biliares e fosfolípidos (KNORR, 1984; ROLLER; COVILL, 1999). Os grupos amino da quitosana se ionizam a pH abaixo de 6, por isso a atividade antimicrobiana é mais elevada a pH baixo (DEVLIEGHERE, VERMEULEN, DEBEVERE, 2004). Estudos mostram que a redução do pH da quitosana ocorre um aumento na adsorção da quitosana em células bacterianas. Ainda nesse estudo os autores sugerem que o aumento foi provavelmente devido ao aumento da carga positiva da quitosana (YOUNES *et al.*, 2014). No entanto, é importante ressaltar que a pH maior que 6 a quitosana em solução pode precipitar devido a desprotonação dos

grupos amino e conseqüentemente perder sua ação antimicrobiana (GUZEY; MCCLEMENTS 2006).

Um estudo realizado por Kulikov *et al.* (2014) demonstraram que a atividade antimicrobiana da quitosana está relacionada a sua natureza policatiónica e depende do grau de protonação dos grupos amino da quitosana, estando relacionado com o grau de polimerização e os valores de pH do meio. Adicionalmente, Roller e Covill (1999) relataram que as propriedades inibitórias da quitosana contra *Mucor racemosus* são maiores a pH 4,5 do que a pH 5,2 e atribuíram este fato á maior solubilidade da quitosana em pH reduzido. Em outro estudo realizado a respeito da influência do pH da quitosana no crescimento de *Candida lambica*, foi demonstrado que a atividade antimicrobiana da quitosana foi significativamente melhor nos menores valores de pH testados (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004). Fernandez-Saiz *et al.* (2009), investigaram em sua pesquisa a atividade antimicrobiana de filmes de acetato de quitosana contra o crescimento de *Staphylococcus aureus* em pH 6,2 e 7,4. No menor valor de pH as contagens bacterianas foram menores, o que indica um efeito biocida mais pronunciado. Esta descoberta está associada ao pKa do polímero estudado que é de 6,4, ou seja, bem próximo do pH em que se foi encontrada a melhor atividade da quitosana, o que significa dizer que neste pH a quantidade de grupos amino carregados positivamente encontra-se em torno de 75%, enquanto que a pH 7,4 esta quantidade decresce até aproximadamente 10%. Ainda neste estudo, através do teste de ninidrina, foi observado que quando película de acetato de quitosana era imersa em meio nutriente de pH 6,2 havia maiores quantidades de cadeia de quitosana que migravam para o meio, indicando a maior solubilidade da quitosana em menor pH.

2.2.3.5 Quantidade de quitosana

A diferença na quantidade de quitosana, á que a célula microbiana é exposta, também influencia na sua atividade antimicrobiana. Quando em menores quantidades, a quitosana irá se ligar á superfície da célula negativamente carregada, com posterior perturbação da membrana celular, favorecendo a fuga dos componentes intracelulares e, por fim, a morte celular. Ao passo que, em concentrações mais elevadas a quitosana pode se depositar sobre a superfície da

célula impedindo a fuga dos componentes do interior da célula e troca de componentes com o meio (LIM; HUDSON, 2004).

Um estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver um filme de polietileno incorporado com diferentes concentrações de quitosana, 1%, 3% e 5% e determinar a influência desses filmes sobre a vida útil de bifes frescos de tilápia. Como resultado, os autores encontraram redução 79,20% de *Escherichia coli* após 96 h de exposição em filmes de LPDE sem adição de quitosana. Redução de 84,83%, com relação a quantidade inicial de *E.coli*, foi encontrado para filme LPDE incorporado com quitosana 1%. Houve redução de 100% de *E.coli* em filmes de LPDE com 3 e 5% de quitosana (REESHA *et al.*, 2015).

Liu *et al.* (2006) trabalharam com quitosanas que possuíam diferentes pesos moleculares $5,5 \times 10^4$ - $15,5 \times 10^4$ Da e foram utilizadas em várias concentrações (20, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm). O objetivo foi avaliar os efeitos do peso molecular e da concentração de quitosana contra *E.coli*. Em seus resultados foram mostrados que todas as quitosanas tiveram melhores atividades em concentrações superiores a 200ppm. Enquanto que na concentração de 20 ppm o crescimento foi observado. Os autores sugeriram como mecanismo de ação a floculação das bactérias e, como consequência, a morte. Em menores concentrações este fenômeno não ocorre e as bactérias continuam se reproduzindo.

El-tahlawy *et al.* (2005) avaliaram, através do teste disco-difusão o efeito inibitório de tecidos de algodão tratados com diferentes concentrações de quitosana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. O resultado dos seus estudos mostraram que a zona de inibição aumentou à medida que a concentração de quitosana aumentou de 0,0 para 0,5%. No entanto, a eficácia do tratamento com 0,75% foi semelhante a atividade encontrada com 0,5%. Quando a concentração foi aumentada para 1% houve redução na atividade antimicrobiana, pois a zona de inibição diminuiu.

Diversos são os fatores que influenciam a atividade da quitosana como agente antimicrobiano sobre células planctônicas, incluindo grau de desacetilação, peso molecular, microrganismo envolvido, quantidade de quitosana. Dada a influência dos diversos fatores sobre as formas livres dos microrganismos, é de grande interesse analisar atividade antifúngica da quitosana comerciais contra biofilmes de espécies fúngicas cujos estudos na literatura são escassos e verificar

se as características da quitosana e do meio irá influenciar em tal atividade, de modo que biofilmes são alvos importantes de atuação para diminuição do estabelecimento, resistência antimicrobiana e recorrência destas infecções fúngicas.

2.3 Microrganismos

2.3.1 *Sporothrix schenckii*

2.3.1.1 *Biologia do fungo*

As espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* são dimórficas, ou seja, apresentam-se na forma filamentosa quando cultivados a temperatura de 25°C e, quando expostos a 37°C – 39-5°C apresentam-se na fase leveduriforme (BARROS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013a; SASAKI *et al.*, 2014). Microscopicamente, na fase filamentosa é possível observar hifas hialinas, septadas medindo de 1 a 2 µm de largura com pequenos conídios medindo entre 2,0 a 6,0 µm, piriformes de paredes finas, hialinos, dispostos em cachos que lembram “flores de margarida” (Figura 3C) nas pontas dos conidióforos. Macroscopicamente, as colônias filamentosas são lisas, enrugadas, brancas e cremosas (Figura 3A), mas após alguns dias podem se tornar castanhas ou negras (Figura 3B). No entanto, algumas colônias são capazes de formar colônias escuras logo no início do período de incubação. Para conseguir a reversão para a forma de levedura é necessário cultivar micélios ou conídios em meios de cultura ricos como ágar de infusão de coração cerebral e incubar a 35-37 °C. As colônias de leveduras apresentam coloração entre branca e creme, superfície irregular, úmida e aparência cremosa. Se observadas ao microscópio as células leveduriformes podem ser ovais ou esféricas, com 2,0 a 6,0 µm de diâmetro, ou em formato de charuto, geralmente com brotamentos ligados a uma célula central (MARQUES-EVANGELISTA *et al.*, 2010).

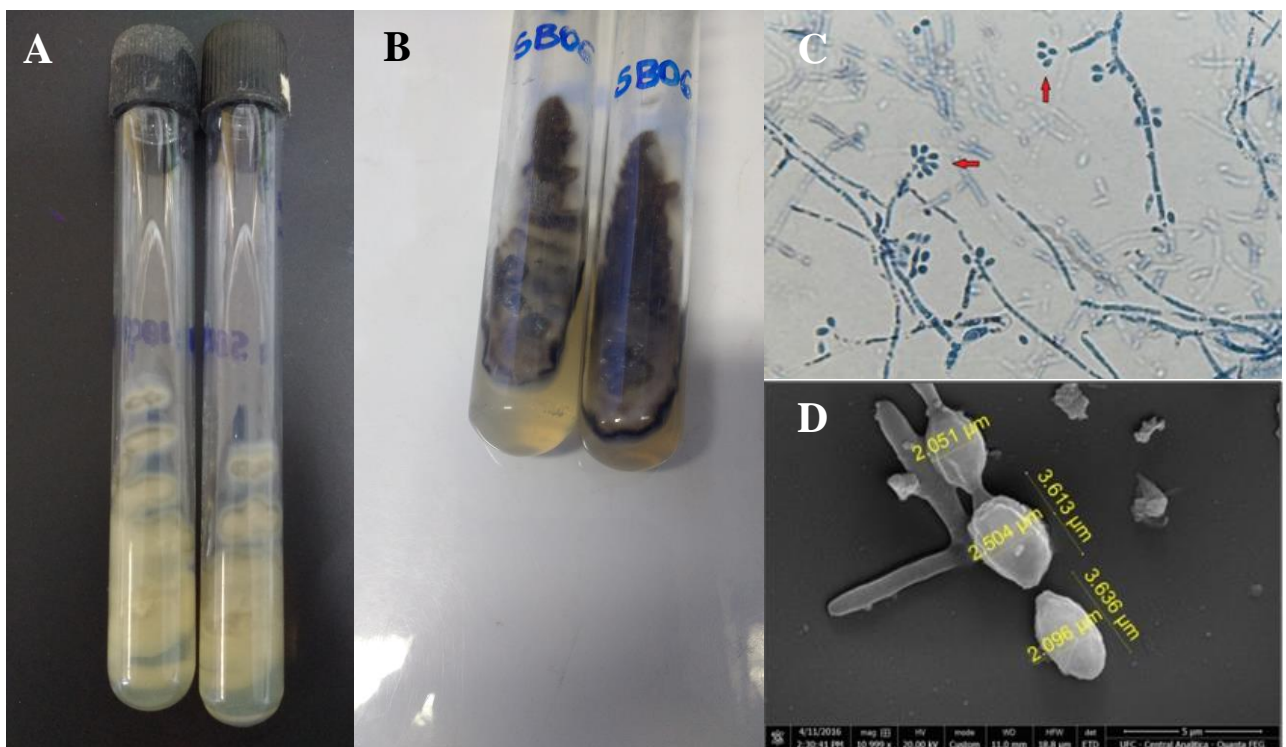
2.3.1.2 *Composição química da parede celular*

Tanto na forma de levedura como na forma micelial *S. schenckii* tem uma parede celular que cerca a membrana plasmática. No entanto, diferenças na espessura da parede celular, assim como variações nas invaginações da membrana

plasmática, podem ser observadas entre as formas morfológicas do fungo. Estudos demonstraram que na forma de levedura existem poucas invaginações e estão são alongadas, já a membrana plasmática das hifas apresentam-se lisas e sem invaginações (SVOBODA; TRUJILLO-GONZALEZ , 1990).

No que se refere a composição química da parede celular foi isolado a partir da levedura *S. schenckii* os polissacarídeos D-manose (50%) e L-ramnose (33%), pequenas quantidades de Galactose (1%) e cerca de 16% de péptidos (LLOYD, BITOON 1971). Estudos comparativos entre as paredes celulares de *S. schenckii* micelial e de levedura mostraram diferença nos componentes glicosídicos. A composição da parede celular da fase micelial incluiu grandes quantidades de lípidos e proteínas e uma menor concentração de manose (REISS, 1986). A Composição da parede celular em células conidiais de *S. schenckii* também são afetados pelo tempo de cultura, com uma diminuição na ramnose molar e um aumento na proporção molar de manose (FERNANDES *et al.*, 1999).

Figura 3 – *Sporothrix brasiliensis* em sua fase filamentosa. A. Macromorfologia das cepas e não-melanizadas (brancas). B. Macromorfologia das cepas e melanizadas (escuras) C. Hifas e conídios em forma de “flor de margarida” (destacados por setas). D. Conídios de *Sporothrix brasiliensis* em microscopia eletrônica de varredura – Magnitude 10999X.



2.3.2 *Candida spp.*

2.3.2.1 *Biologia do fungo*

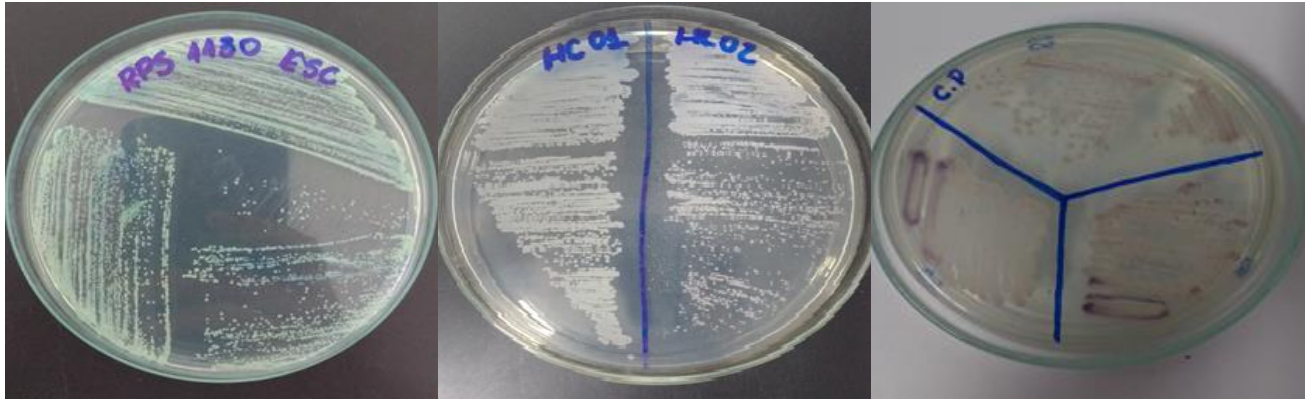
Os fungos mais frequentemente isolados de infecções fúngicas humanas são pertencentes ao gênero *Candida*. O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies, mas apenas uma minoria está associada a candidíase humana. Entre todas as espécies de *Candida* que são isoladas de seres humanos, as espécies de *Candida albicans* representam cerca de 80% dos isolados de todas as formas de candidíase humana (CALDERONE, 2002; SAMARANAYAKE *et al.*, 2002), embora, ultimamente, os casos de infecções causadas por espécies não *albicans* tenha aumentado de forma significativa, sendo *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, as mais frequentemente isoladas de candidíase após *C. albicans*.

Candida compreende um grupo diverso de organismos fúngicos que podem crescer em forma de levedura. Em meio Agar Dextrose Sabouraud (SDA), meio rotineiramente utilizado, as colônias são de cor creme a amarelo. A textura da colônia pode ser lisa, cintilante, seca ou enrugada a depender da espécie. Em condições ótimas de crescimento a levedura cresce na fase logarítmica com células em crescimento (blastoconídeos) que são esféricas a ovais e têm aproximadamente $2-5 \times 3-7 \mu\text{m}$ de tamanho (LARONE, 2002). Adicionalmente, algumas espécies de *Candida albicans* podem produzir hifas verdadeiras, ou mais frequentemente, pseudo-hifas e são consideradas verdadeiramente polimórficas. Em contraste, *Candida parapsilosis* não produz hifas verdadeiras, mas pode produzir pseudo-hifas que são grandes e curvas, chamadas de “células gigantes” (LARONE, 2002; TROFA *et al.* 2008). Com relação a *Candida tropicalis*, no agar milho mais tween 80 a 25 °C após 72h de incubação produz pseudo-hifas e hifas verdadeiras.

É importante destacar que células de *Candida parapsilosis* (2.5-4 μm) são menores que blastoconídeos de *C. albicans* (4-6 μm) e *C. tropicalis* (4-8 μm). Além disso, *C. parapsilosis*, quando cultivada em SDA, produz colônias brancas, cremosas, brilhantes e lisas / enrugadas. No mesmo meio, *C. tropicalis* forma colônias que são de cor creme com uma borda ligeiramente micelial (Calderone, 2002). Em meio CHROMagar®*Candida* (CHROMagar®, Paris, França), um meio de agar diferencial utilizado para a identificação de espécies de *Candida*, as colônias de

C. albicans, se apresentam azul-esverdeadas, enquanto as colônias de *C. parapsilosis* são brancas e *C. tropicalis* azul escuro como visto na Figura 4.

Figura 4 - Espécies de levedura do gênero *Candida* em meio chromagar *Candida*. (A) *Candida albicans*; (B) *Candida tropicalis*; (C) *Candida parapsilosis*.



2.3.1.2 Composição química da parede celular de leveduras

A composição química da parede celular de levedura foi estudada pela primeira vez por Salkowski (1894), que observou material polissacrídico. Alguns anos depois Zechmeister & Tóth, 1936) isolaram um componente glucano da parede celular pela ação de pepsina e amilase em uma suspensão de levedura autolisada. Estas investigações químicas e enzimáticas indicaram que vários polissacarídeos podem estar presentes na parede celular e foi sugerido que, além do glucano, um manano (HAWORTH; HIRST; ISHERWOOD, 1937) e possivelmente um "glicogênio" (LING; NANJI; PANTON, 1925) podem fazer parte da estrutura. De uma forma geral, a parede celular mostra uma composição química aproximada de glucano 29%, manana 31%, proteína 13%, lípido (principalmente gordura neutra) 8-5% e cinza 3%.

Estudos na literatura mostram que a parede celular de *Candida albicans* encontra-se externamente a membrana plasmática, sendo esta responsável por manter a forma (levedura ou hifa) de crescimento do fungo. Adicionalmente é responsável por mediar a interação do microrganismo com o meio ambiente e atuar como barreira de permeabilidade, protegendo a célula contra lesões físicas e osmóticas. Cerca de 80-90% da parede celular de *Candida albicans* é constituída de carboidratos (polímeros de manose associados a proteínas para formar

glicoproteínas, polímeros ramificados de glicose e quitina). Proteínas e lipídeos também fazem parte dos constituintes da parede celular de *C. Albicans*, embora em menor quantidade. Os componentes estruturais da parede são β -glucanos e proteínas, que formam uma rede rígida microfibrilar, onde as proteínas e glicoproteínas se ligam (CALDERONE, BRAUN 1991; CASSONE, 1989; SHEPHERD, POULTER, SULLIVAN 1985).

2.3.3 Dermatófitos

2.3.3.1 Biologia dos fungos

O verdadeiro fundador da dermatomicologia foi David Gruby, o que o fez ser consagrado dessa forma foram suas descobertas entre os anos 1841 a 1844, suas comunicações com a Academia Francesa de Ciência e suas publicações durante este período (GRUBY, 1841). Por volta de 1890 Raimond Sabouraud, um dos mais conhecidos e influentes dos primeiros micólogos médicos, iniciou suas pesquisas com dermatófitos (SABOURAUD, 1910). Sabouraud colaborou com estudos a respeito da taxonomia, morfologia, métodos de cultivar os dermatófitos e a terapia das dermatofitoses. Com base nos aspectos clínicos da doença, as observações culturais e microscópicas levaram-no a classificar os dermatófitos em quatro generos *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (ODDS 1991). Em 1934 o modelo taxonomico de Sabouraud foi modificado por Chester Emmons que estabeleceu a Classificação atual dos dermatófitos dividindo-os em tres generos baseado na morfologia de esporos e órgãos acessórios, sendo eles *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (EMMONS, 1934).

As espécies do gênero *Epidermophyton* possuem macroconídeos amplamente clavados com paredes tipicamente lisas, finas a moderadamente espessas e de um a nove septos, 20 a 60 por 4 a 13 μ m de tamanho. Eles são geralmente abundantes e suportados individualmente ou em cachos. Microconídios estão ausentes. Este gênero tem apenas duas espécies conhecidas até à data, e apenas *E. floccosum* é patogênico. Os macroconídios da espécie *Trichophyton tonsurans*, quando presente, tem paredes lisas, geralmente finas e um a 12 septos, são suportados individualmente ou em grupos, e pode ser alongado e em forma de lápis, clavados, fusiforme, ou cilíndrico. Eles variam em tamanho de 8 a 86 por 4 a

14 µm. Geralmente são observados mais microconídeos do que macroconídios, e estes podem ser globosos, piriformes ou clavados, e são produzidos individualmente ao longo dos lados das hifas ou em forma de cachos de uva. Macroconídios de *Microsporium gypseum* são caracterizados pela presença de paredes ásperas e rugosas. Originalmente, os macroconídios foram descritos em forma fusiforme, mas algumas espécies podem apresentar macroconídeos na forma de ovo como *Microsporium nanum* (FUENTES, 1956). Os macroconídios podem ter paredes finas, moderadamente grossas a espessas e de 1 a 15 septos e variam em tamanho de 6 a 160 por 6 a 25 µm. Os microconídios são sesséis ou clavados e geralmente encontram-se sozinhos ao longo das hifas. (AJELLO, 1968; AJELLO, 1977; MATSUMOTO; AJELLO, 1987).

2.3.2.2 Composição química da parede celular de dermatófitos

As paredes celulares de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e *Epidermophyton floccosum* são compostas principalmente de um polissacarídeo contendo glicose, além de possuir quitina e proteína em sua estrutura (SHAH, KNIGHT 1968). Outros açúcares que podem estar presentes na parede celular de espécies dermatofíticas são: glucomanana, manose e galactose (GUARRO et al., 1993). Os principais componentes da parede celular dos dermatófitos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais componentes da parede celular de dermatófitos

Constituintes	Expresso como % de parede celular seca			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Microsporium gypseum</i>	<i>Epidermophyton floccosum</i>
Glicose	45,9	37,5	36,6	45,8
Manose	7,8	11,4	10,3	6,7
N-acetil hexosamina	28,1	26,6	31,2	29,7
hexosamina	0,6	1	0,8	0,3
proteína	7,1	6,8	8,0	7,4
cinza	4,7	8,2	7,6	5,9
lipídio	3,1	4,0	3,6	3,3
nitrogenio	3,9	3,4	3,9	3,5

Acido nucleico total	0,35	0,38	0,32	0,31
Carboidratos totais	55,5	48,3	45,9	56,6

2.4 Métodos para detecção de compostos com atividade antimicrobiana in vitro.

O método de diluição é realizado pela técnica de diluição em caldo, para medir quantitativamente a atividade in vitro de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (ALVES *et al.*, 2008; OSTROSKY *et al.*, 2008).

No método de diluição em caldo, quantidade conhecida da amostra é dissolvida homogeneamente em meio líquido, onde se inocula o microorganismo. Esta técnica é também denominada de macrodiluição quando realizada em tubos de ensaio ou de microdiluição quando utilizam-se placas de 80 ou 96 cavidades utilizando pequenos volumes de caldo (ALVES *et al.*, 2008). Por meio desta técnica é possível determinar quantitativamente a menor concentração do agente antimicrobiano ou menor concentração inibitória (CIM), a qual é capaz de inibir o crescimento do microorganismo. É possível detectar a presença de crescimento bacteriano ou fúngico pela presença de turbidez ou utilizando-se alguns sais indicadores de crescimento microbiano, como o sal de tetrazólio e resarzurina ou, ainda, medindo-se a densidade óptica em espectrofotômetro, obtendo-se assim uma maior precisão (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; SCORZONI *et al.*, 2007). A CIM é um ensaio muito utilizado em laboratórios de análises clínicas para confirmar a resistência de um microorganismo e também monitorar a atividade de um novo agente antimicrobiano (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010). Considerando que neste método a turbidez é um indicador do crescimento microbiano, suas desvantagens são a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos (OSTROSKY *et al.*, 2008) e a coloração, por exemplo, do extrato vegetal que está sendo avaliado e que pode influenciar na detecção dos resultados. O subcultivo dos tubos em placas contendo meio de cultura com ágar é uma alternativa para esse problema, sendo possível a obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar quitosanas comerciais com baixo, médio e alto peso molecular , bem como avaliar o efeito inibidor de todas as amostras frente a células planctônicas e biofilmes de diferentes espécies de fúngicas.

3.2 Específicos

- a) Caracterizar as amostras de quitosana com relação ao peso molecular e grau de desacetilação;
- b) Determinar a Concentração Inibitória Mínima de todas as amostras frente as células planctônicas de *Candida* spp, *Sporothrix brasiliensis*, e dermatófitos, assim como verificar a influência desses parâmetros na atividade inibitória.
- c) Avaliar a função das quitosanas na atividade metabólica e biomassa durante o processo de adesão dos biofilmes de *Candida* spp e *Sporothrix brasiliensis*.
- d) Avaliar a função das quitosanas na atividade metabólica e biomassa das quitosanas sobre biofilmes maduros de *Candida* spp e *Sporothrix brasiliensis*.
- e) Avaliar os danos causados pelas quitosanas nos biofilmes fúngicos através de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo

Este estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEEM), pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). A análise do grau de desacetilação foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Lubrificantes (NPL) pertencente ao Departamento de Engenharia Química (UFC) e a análise do peso molecular foi feita no Laboratório de Biopolímeros pertencente ao Departamento de Química (UFC), sob a supervisão da Dra. Arcelina Pacheco Cunha. A análise topográfica dos biofilmes por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada na Central Analítica da UFC.

4.2 Microrganismos

O presente estudo incluiu um total de 30 cepas (Tabela 3), divididos em fungos leveduriformes (*Candida albicans* (n=6), *Candida tropicalis* (n=6) e *Candida parapsilosis* (n=6)), filamentosos (*Trichophyton rubrum* (n=2), *Trichophyton tonsurans* (n=2), *Microscopum gypseum* (n=2)) e dimórficos (*Sporothrix brasiliensis* (n=6)) todos pertencentes à coleção de cultura fúngica do Centro Especializado em Micologia Médica (CEEM, Universidade Federal do Ceará). Os procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica classe II em um Laboratório de Biossegurança classe II.

4.3 Agentes antimicrobianos

Para o preparo das soluções estoque utilizou-se - quitosana de alto peso molecular_(Q.A.P), Cod:448877, quitosana de médio peso molecular_(Q.M.P), Cod:448877 e quitosana baixo peso molecular (Q.B.P), Cod: 448869 (Sigma-Aldrich), dissolvidas em ácido acético 1% (v/v) e mantidas sob agitação constante em agitador de hélice mecânico AM-20 durante 24 h e depois transferidas para recipiente estéril. Subsequentemente todas as soluções foram diluídas em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis) tamponado com 0,165 M de tampão MOPS (ácido

morfolinopropanosulfônico - Sigma, St. Louis) e armazenado a 20°C até sua utilização. As concentrações testadas de todas as quitosanas variaram de 2 - 512 µg. mL⁻¹.

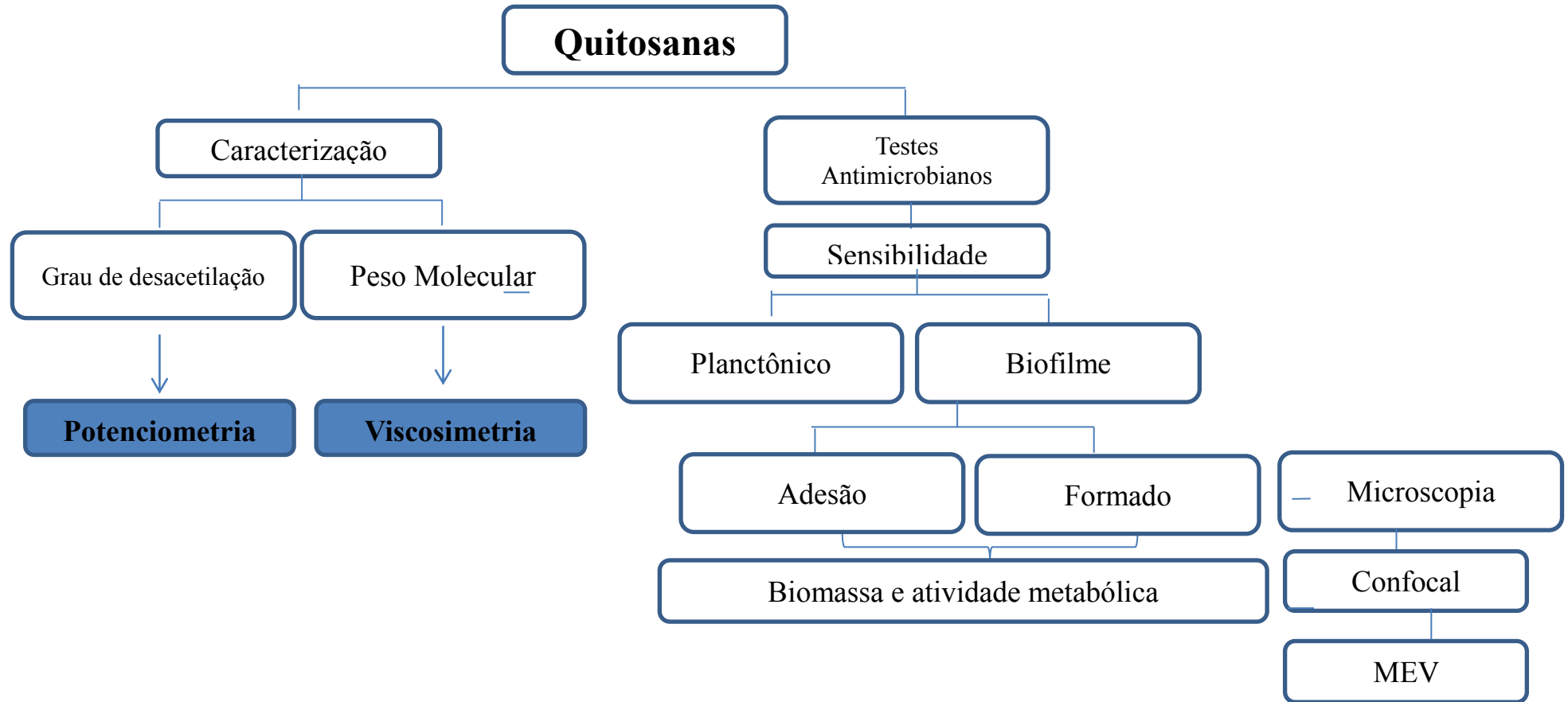
Tabela 3 – Identificação e origem de isolamento das cepas

Cepas	Espécie fúngica
Leveduras	
ATCC 10231	<i>Candida albicans</i>
CEMM-06-2-061	<i>Candida albicans</i>
CEMM 06-2-062	<i>Candida albicans</i>
CEMM 06-2- 063	<i>Candida albicans</i>
CEMM 06-2-064	<i>Candida albicans</i>
CEMM 06-2-065	<i>Candida albicans</i>
CEMM-01-1-165	<i>Candida parapsilosis</i>
CEMM 01-1-193	<i>Candida parapsilosis</i>
CEMM 05-1- 054	<i>Candida parapsilosis</i>
CEMM 01-1-168	<i>Candida parapsilosis</i>
CEMM 01-1-166	<i>Candida parapsilosis</i>
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>
CEMM-06-2-070	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 06-2-071	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 06-2- 072	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 06-2-073	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 06-2-075	<i>Candida tropicalis</i>
CEMM 06-2-077	<i>Candida tropicalis</i>
Dimórficos	
CEMM 05-3-050	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-053	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-054	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-055	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-056	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
CEMM 05-3-057	<i>Sporothrix brasiliensis</i>
Filamentosos	
CEMM 05-6-110	<i>Trichophyton rubrum</i>
CEMM 06-6-113	<i>Trichophyton rubrum</i>
CEMM05-6-120	<i>Trichophyton tonsurans</i>
CEMM05-6-122	<i>Trichophyton tonsurans</i>
CEMM05-6-133	<i>Microsporum gypseum</i>
CEMM02-6-062	<i>Microsporum gypseum</i>

4.4 Desenho experimental

Este trabalho foi organizado em duas etapas distintas. A primeira etapa consistiu na caracterização da quitosana com relação a sua massa molar e grau de desacetilação. a segunda etapa constituiu da análise do efeito das quitosana sobre a morfologia e fisiologia das células e biofilmes produzidos por fungos leveduriformes, dimórficos e filamentosos. As análises das duas etapas experimentais foram conduzidas conforme o desenho experimental apresentado na figura 6.

Figura 5 - Organograma de estruturação experimental deste estudo



4.5 Caracterização química da quitosana

4.5.1 Determinação da Massa molecular por Viscosimetria

A viscosidade intrínseca foi determinada por meio da utilização da equação de Marck-Houwink-Sakurada (Equação 1).

$$[\eta] = K_m M_v^a \quad (1)$$

A medida da viscosidade foi realizada utilizando-se viscosímetro Cannon fenske em banho de água a 25°C. Inicialmente foi medido o tempo de escoamento, da solução tampão de ácido acético e acetato de sódio (0,3 mol L⁻¹/0,2 mol.L⁻¹ e pH 4,5) e posteriormente mediu-se o tempo de escoamento das soluções de quitosana no mesmo tampão, em concentrações decrescentes.

Por meio da equação 2:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Onde, t é o tempo médio de escoamento da solução e t_0 é o tempo médio de escoamento do solvente puro, a viscosidade específica do polímero pode ser calculada. As viscosidades intrínsecas dos polímeros foram calculadas por meio da extrapolação para a concentração zero da curva do gráfico $\eta_{sp}/$ concentração versus concentração possibilitando a determinação da M_v . Os valores da M_v das amostras de quitosana foram obtidas através da equação 1, utilizando as constantes $K_m = 0,0074$ e $a = 0,76$, constantes para quitosanas com grau próximo de desacetilação de 80% (KIM e CHUN, 1999).

4.5.2 Análise do Grau de desacetilação

Adicionou-se, a uma determinada massa de quitosana, uma quantidade conhecida de solução de ácido clorídrico 0,15 mol L⁻¹, deixando-a por 24h para protonação dos grupamentos amino disponíveis. A solução resultante foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1M. A cada volume conhecido de NaOH adicionado o potencial em Milivolts foi medido, obtendo-se uma curva típica de titulação potenciométrica. A partir da derivada primeira da curva de titulação foi

possível observar os dois pontos de inflexão. Dessa forma, através das inflexões da curva foi possível determinar a porcentagem de grupamentos aminos da quitosana (BEPPU, 1999).

O número de grupamentos aminos foi determinado através da equação 3:

$$\%NH_2 = \frac{M_{NaOH} * (V_2 - V_1) * 161}{m_2} * 100 \quad (3)$$

onde M_{NaOH} é a molaridade da solução de NaOH (mols/L), V_1 e V_2 são respectivamente os volumes de NaOH empregados para neutralizar o excesso de HCl e a amostra de quitosana protonada, 161 é a massa molecular da unidade monomérica de quitosana e m_2 a massa da amostra no estado seco tomada para titulação (g).

4.6 Testes de sensibilidade

4.6.1 Forma planctônica

Para a preparação dos inóculos fúngicos, as cepas de *Sporothrix brasiliensis* foram cultivadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubou-se durante 5 a 6 dias á 28-30°C. As cepas de dermatófitos e *Candida spp.* foram cultivadas em ágar batata, com excessão do *Trichophyton rubrum*, o qual foi cultivado em ágar aveia. Subseqüentemente os cultivos de dermatófitos foram incubados durante 5 a 7 dias e de *Candida spp* durante 1 a 2 dias, ambos á temperatura de 28-30°C. Em seguida, aos cultivos de *Sporothrix brasiliensis* assim como aos de dermatófitos, foram adicionados 1mL de solução salina estéril 0,9%. As colônias foram suavemente raspadas com auxílio de swabs estéreis, e então o conteúdo foi tranferido para tubos estéreis nos quais foram ajustados a turbidez: *Sporothrix brasiliensis* (2McFarland) e Dermatófitos (0,5 McFarland). Após 5 minutos o volume foi tranferido para outro tubo e diluições 1:10 e 1:5 foram realizadas em RPMI 1640 (Sigma, St. Louis) tamponado com 0,165 M de tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico - Sigma, St. Louis) para *Sporothrix brasiliensis* e dermatófitos, nessa ordem, para obter uma concentração final de $1-5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e $1-5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Para o preparo do inóculo de *Candida spp*, uma colônia foi tranferida para um tubo estéril contendo 1 mL de salina e a turbidez foi ajustada segundo escala 0,5 de Mc Farland. Posteriormente foram realizadas

diluições 1:50 e 1:20 em meio RPMI tamponado com MOPS para obter uma concentração final de $1,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo como descrito no protocolo M-38A2 para as cepas de *Sporothrix brasiliensis* e dermatófitos e M-27A3 para as cepas de *Candida spp.* padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2008). Todos os testes foram realizados em duplicata para cada estirpe. Alíquotas de 100 µL RPMI foram adicionados á todos os poços das placas .Em seguida, foram adicionados 100 µL das quitosanas aos primeiros poços á partir dos quais foram feitas diluições até a coluna 10. Os 100µl restantes vão para a coluna 12(controla de esterilidade). A coluna 11 é o controle de crescimento e, portanto, não recebera compostos antifúngicos. Então 100 µl do inoculo serão adicionados em todos os poços, com exceção da coluna 12 (controle de esterilidade da solução de quitosana e do meio de cultura utilizados). Os resultados foram obtidos através de leitura visual depois de 2, 3 e 4 dias de incubação a 35°C para *Candida spp.*, *Sporothrix brasiliensis* e dermatófitos, nessa ordem. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir 100% do crescimento quando comparado com o poço do controle de crescimento sem quitosana (BRILHANTE *et al.*, 2015). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade.

4.6.2 Biofilme

4.6.2.1 Adesão

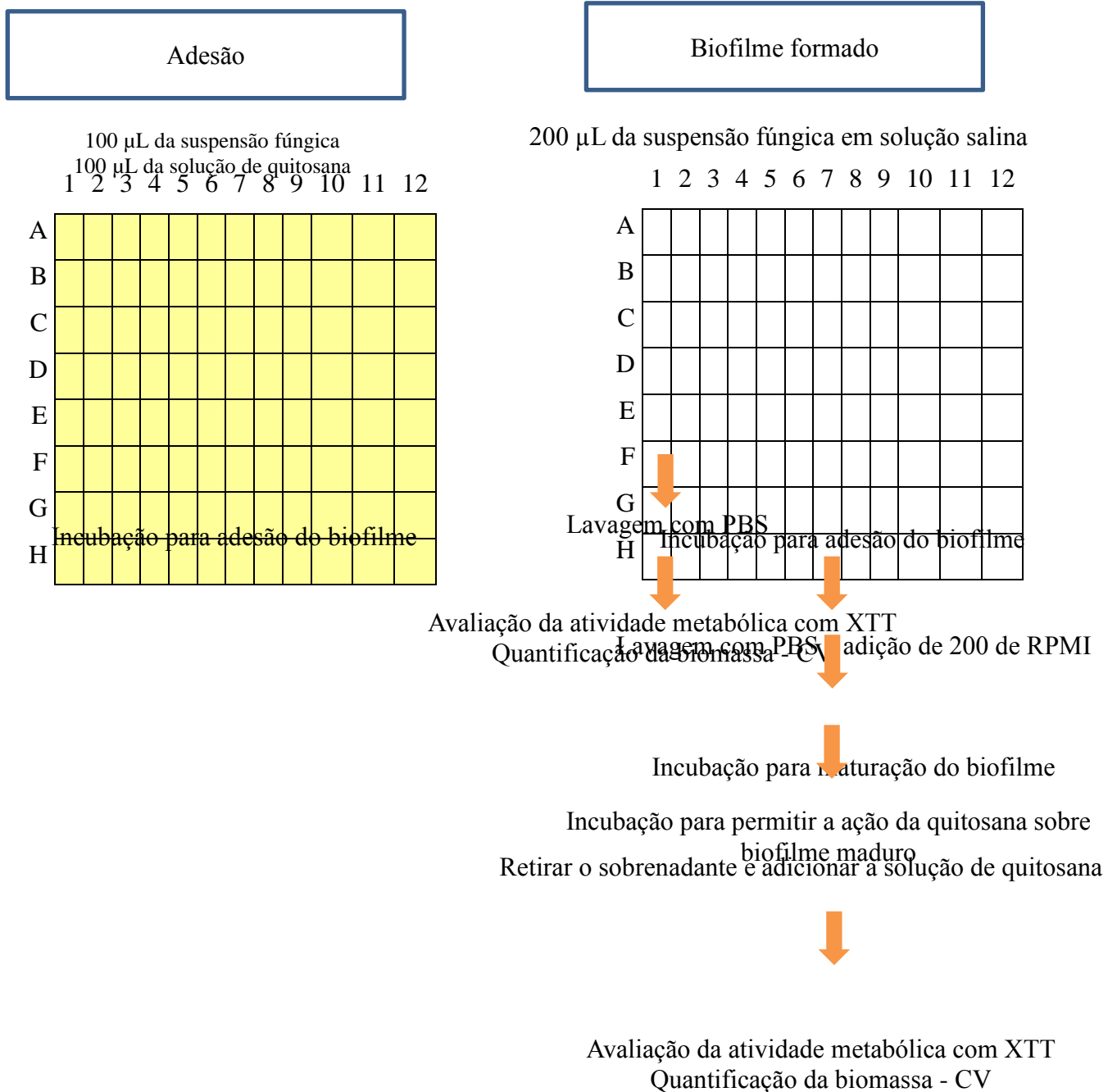
Para a avaliação da ação da quitosana nas diferentes fases da formação do biofilme foram utilizadas apenas cepas de *Candida spp.* e *Sporothrix brasiliensis*, pois não foi observado CIM para os dermatófitos nas concentrações testadas . Os testes foram realizados segundo protocolo descrito por Brilhante *et al.* (2015) com algumas modificações. Inicialmente, foram adicionados 100 µL da suspensão fúngica preparada em solução salina fisiológica na concentração de 1×10^6 células.mL⁻¹ para o teste com *Candida spp.* e para as cepas de *Sporothrix brasiliensis* na concentração de 2,4 a $5,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Em seguida, 100 µL da solução de quitosana preparada em RPMI tamponada com MOPS em diferentes concentrações (CIM, 4x CIM, 8x CIM) foram adicionados aos poços e as placas

foram incubadas por 90 min para as cepas de *Candida* spp. e 24h para as cepas de *Sporothrix brasiliensis* para adesão do biofilme. Após este período a atividade metabólica do biofilme foi avaliada através do ensaio metabólico (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidroxido de tetrazólio (XTT) conforme item 4.5.2.3 e a biomassa foi quantificada através do ensaio de cristal violeta conforme item 4.5.2.4.

4.6.2.2 Biofilme formado

A avaliação da atividade da quitosana sobre o biofilme formado foi conduzida de forma semelhante à metodologia descrita anteriormente (BRILHANTE *et al.*, 2015). A Figura 7 mostra as etapas para avaliação da atividade antifúngica na adesão e sobre biofilme formado. Em resumo, após o período inicial de adesão foram adicionados aos poços 200 µL de meio RPMI 1620 (Sigma) e as placas foram incubadas a 35°C por um período de 48h para *Candida spp* e 5 dias para *Sporothrix brasiliensis*, tempo suficiente para permitir a maturação do biofilme. Após a incubação o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, 200 µL das soluções de quitosana nas concentrações já citadas foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas novamente por igual período e temperatura para as cepas de *Candida spp* e por 72h para as cepas de *Sporothrix brasiliensis*. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e os ensaios de XTT conduzidos conforme item 4.5.2.3 e a biomassa foi quantificada através do ensaio de cristal violeta conforme item 4.5.2.4. Os controles positivos foram realizados através de adição do meio RPMI nos biofilmes maduros. Não existe cepa referência para testes com biofilme. No entanto, utilizamos como controle do teste uma cepa de *Candida tropicalis* cuja sensibilidade “in vitro” do biofilme contra vários antifúngicos já havia sido anteriormente testada (BRILHANTE *et al.*, 2016).

Figura 6 - Ilustração das etapas dos ensaios de sensibilidade na fase de adesão dos biofilmes e sobre biofilmes maduros.



4.6.2.3 Ensaio XTT

Os poços foram lavados duas vezes com *Phosphate Buffer Solution* (PBS). Em seguida, foram adicionados 50 μ L XTT preparado em solução salina tamponada PBS (1 mg/mL) e 4 μ L de solução de menadiona (1mM em acetona; Sigma) e as placas foram incubadas a 35°C durante 5h, no escuro. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi transferido para outra placa 96 poços, que foi imediatamente submetida a leitura em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda 492nm (STEPANOVIC *et al*, 2000). Todos os testes foram realizados em duplicata e os poços contendo apenas meio RPMI foram incluídos como controle negativo de todos os testes.

4.6.2.4 Quantificação da biomassa

A capacidade de formação de biofilmes foi avaliada pela técnica de coloração por cristal violeta. Após a lavagem das cavidades com PBS , 100 μ L de metanol foram inseridos aos poços para fixação. Após a remoção do metanol (Dinamica, Brasil) as placas permaneceram á temperatura ambiente para secar. Em seguida, aos poços foram adicionados 200 μ L de cristal violeta a 0,1% e incubou-se durante 20 min. Subseqüentemente, o cristal violeta foi retirado e os poços foram então lavados com água para retirar o corante que aderiu ao material orgânico. Ácido acético foi adicionado ás cavidades para retirar o corante aderido á biomassa e foi então transferido para outra placa para leitura em espectrofotômetro a 590nm (PEETERS *et al.*, 2008). Todos os testes foram realizados em duplicata e os poços contendo apenas meio de cultivo foram incluídos como controle negativo em todas as experiências.

4.7 Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

Para avaliar o efeito da quitosana em biofilmes maduros usando CLSM, os biofilmes foram preparados conforme descrito no item 4.5.2.2. Após a incubação os biofilmes foram lavados com PBS e o corante fluorescente Live / Dead (Invitrogen TM151) foi adicionado aos poços para cobrir a superfície das lâminas de ThermanoxTM com biofilmes. Em seguida, as lâminas foram avaliadas sob um microscópio

confocal Nikon (C2), a 488 nm para a detecção da SYTO 9 corante fluorescente, que identifica células vivas, e a 561 nm para a detecção do iodeto de propídio, o que identifica células mortas (DI BONAVENTURA *et al.*, 2006). Para as análises de imagem, cinco pontos equidistantes dos coverlips foram submetidos a captura empilhados-Z das imagens, por análise de imagem de três dimensões

4.8 microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da análise da morfologia celular do biofilme exposto á diferentes concentrações de quitosana foi selecionada uma cepa de *Candida tropicalis* exposta ás concentrações de CIM, 4x CIM e 8x CIM de Quitosana de baixo peso molecular. Para tal, foi utilizado microscopia eletrônica de varredura, de acordo com Di Bonaventura *et al.*, (2006). Os biofilmes foram formados conforme descrito no item 4.5.2.2, diretamente sobre lamínas ImmunoSlides® (EasyPath, Brasil) esterilizadas recobertas com Poli-L-Lisina. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e os biofilmes foram imersos em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15M (pH 7,4) a 4°C *overnight*. Para avaliar a presença de matriz associada aos biofilmes, a lamina de vidro recoberta com Poli-L-lisina foi fixada com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato com o corante catiônico azul de alcian (0,1%) e incubado *overnight* a 4°C. Os biofilmes foram lavados por duas vezes com tampão cacodilato 0,15M e desidratados com lavagens seriadas em etanol em concentrações ascendentes (50%, 70%, 80%, 95% e 100%, com incubação de 10 min, por duas vezes cada. Após as lavagens, as lamínas foram secas em estufa por 10 min e recobertas com hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 min, e após a retirada do hexametildisilazano, foram secas em dessecador por 24 h. As lâminas foram cobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscopio Eletrônico FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15kV. As imagens foram processadas em *software Photoscape*, v3.6.5 (MooiiTech, Korea).

4.9 Análise estatística

Para verificar a sensibilidade antifúngica de quitosanas com diferentes pesos moleculares, foi utilizado como variável de análise o número de diluições.

Para os dados de absorvância, nas comparações onde os valores de controle se mantiveram constantes frente às concentrações investigadas (CIM, CIM x4 e CIM x8), foram utilizados os valores absolutos de Densidade óptica -“DO”. Nas comparações onde os valores de controle apresentaram diferenças entre os cenários analisados, foi utilizada como variável de análise a taxa de redução da absorvância observada (controle *versus* concentração testada). Todos os dados foram inicialmente analisados quanto a sua simetria e dispersão. Nas comparações entre dados que apresentaram distribuição normal e variâncias semelhantes, foi utilizado como teste a ANOVA, seguido do pós teste de Tukey para a comparação entre pares. Nas comparações onde os dados apresentaram assimetria e/ou variâncias elevadas foram utilizados os testes não paramétricos de *Friedman* (comparação dos resultados em uma mesma espécie) e *Kruskal-Wallis* (comparação dos resultados entre espécies), em ambos os casos seguido do teste *post hoc* de *Dunn* para a comparação entre pares. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da quitosana

5.1.1 Grau de desacetilação da quitosana

A atividade antimicrobiana da quitosana já foi demonstrada para vários fungos. No entanto, a Concentração Inibitória Mínima depende principalmente da Concentração, Peso molecular, grau de desacetilação, modificação química, grau de substituição, tipos de fungos e pH (RABEA *et al.* , 2009 ; FEI LIU *et al.* , 2001). Por essa razão no presente estudo foram determinados o grau de desacetilação e o peso molecular das amostras.

Nas Figuras 8,9 e 10 é possível observar as curvas de titulações potenciométricas para as quitosanas de Baixo, Médio e Alto Peso molecular, nessa ordem, assim como suas derivadas primeiras, obtida para todas as amostras comerciais de quitosana (Quitosana de alto pesomolecular, Cod:448877 , Quitosana de médio pesomolecular, Cod:448877 e Quitosana Baixo Peso molecular, Cod: 448869 – Sigma-Aldrich). Através das inflexões dessas curvas, é possível determinar os volumes V_1 e V_2 , que correspondem ao volume necessário para neutralizar o excesso de HCl e a quantidade de grupos aminos protonados, respectivamente. Através da equação 3, pode-se determinar a quantidade de grupamentos amino presentes na amostras e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Pode-se observar que a Quitosana de alto pesomolecular apresentou um grau de desacetilação médio de 79,03%, sendo o menor valor entre as quitosana analisadas. Quitosanas de Médio e Baixo Peso Molecular apresentaram valores do grau de desacetilação médio de 84,18% e 81,8%, respectivamente. A quitosana de médio pesoMolecular foi a que apresentou maior grau de desacetilação entre as três amostras estudadas.

Alguns autores consideram que a partir de 60% de desacetilação o produto pode ser considerado quitosana (AIBA, 1992), mas outros autores só costumam aceitar como sendo quitosana, materiais obtidos a partir da quitina com grau de desacetilação superior a 75% (KUMAR, 2000). Os valores do grau de desacetilação obtidos neste estudo encontram-se dentro da faixa relatada na

literatura para quitosana, assim como dentro da faixa oferecida pela Sigma-Aldrich (75-85%).

Tabela 4 - Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Quitosanas	Massa de quitosana(g)	Concentração de HCl (mol/L)	Concentração de HCl (mol/L)	▲ V(V2-V1) (mL)	% Molar de desacetilação da quitosana	Média % Molar de Desacetilação da Quitosana
Quitosana de alto pesomolecular	0,2064	0,05	0,15	10	78,0%	79,0
	0,2002	0,05	0,15	10	80,0%	
Quitosana de médio peso molecular	0,2015	0,05	0,15	7	83,9%	84,2
	0,2001	0,05	0,15	7	84,5%	
Quitosana de baixo peso molecular	0,5025	0,05	0,15	17	81,7%	81,8
	0,5012	0,05	0,15	17	81,9%	

Figura 7 - Curva de titulação potenciométrica para quitosana de baixo peso molecular (A); Derivada Primeira da curva de titulação potenciométrica para quitosana de baixo peso molecular (B).

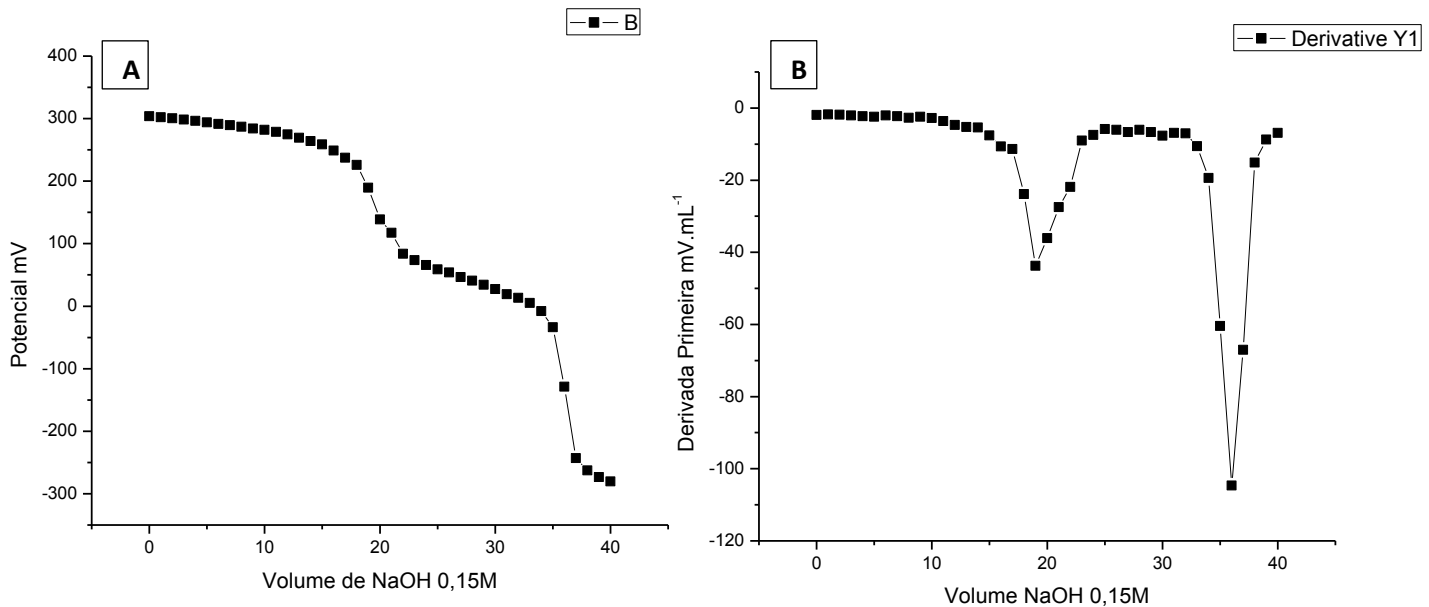


Figura 8 - Curva de titulação potenciométrica para quitosana de Médio peso molecular (A); Derivada Primeira da curvade titulação potenciométrica para quitosana de Médio peso molecular (B).

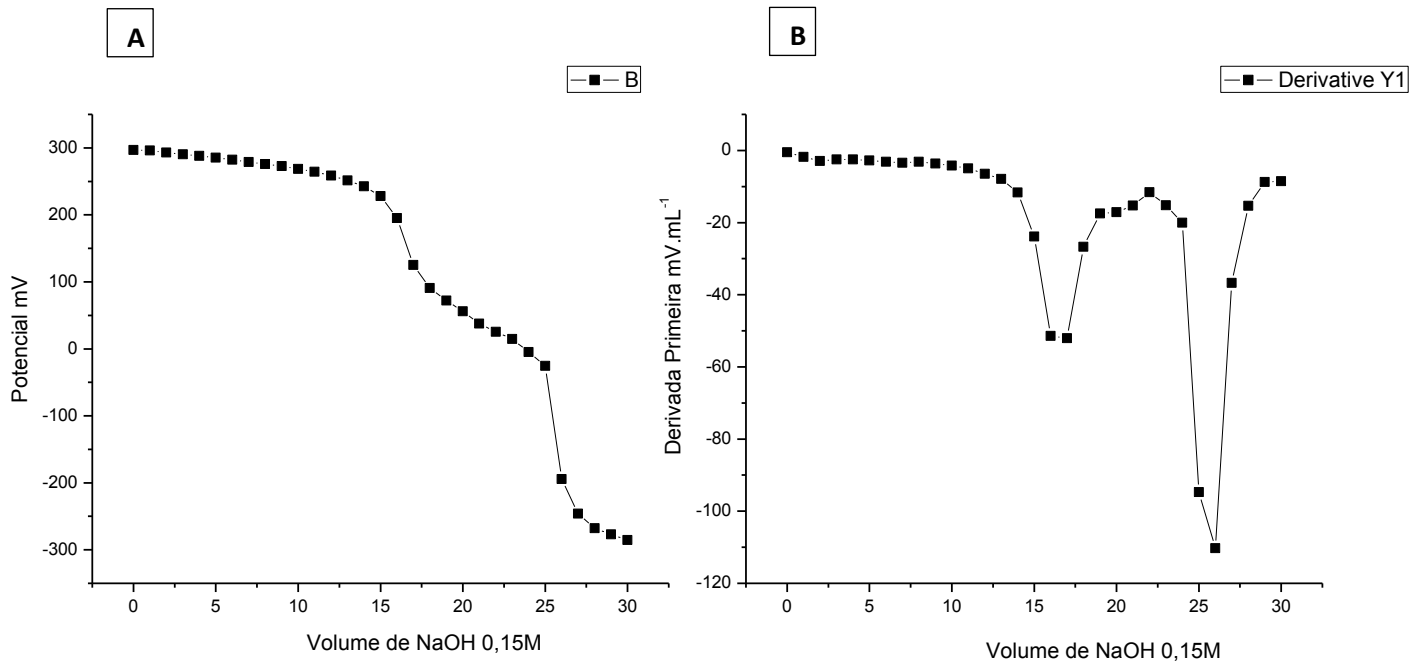
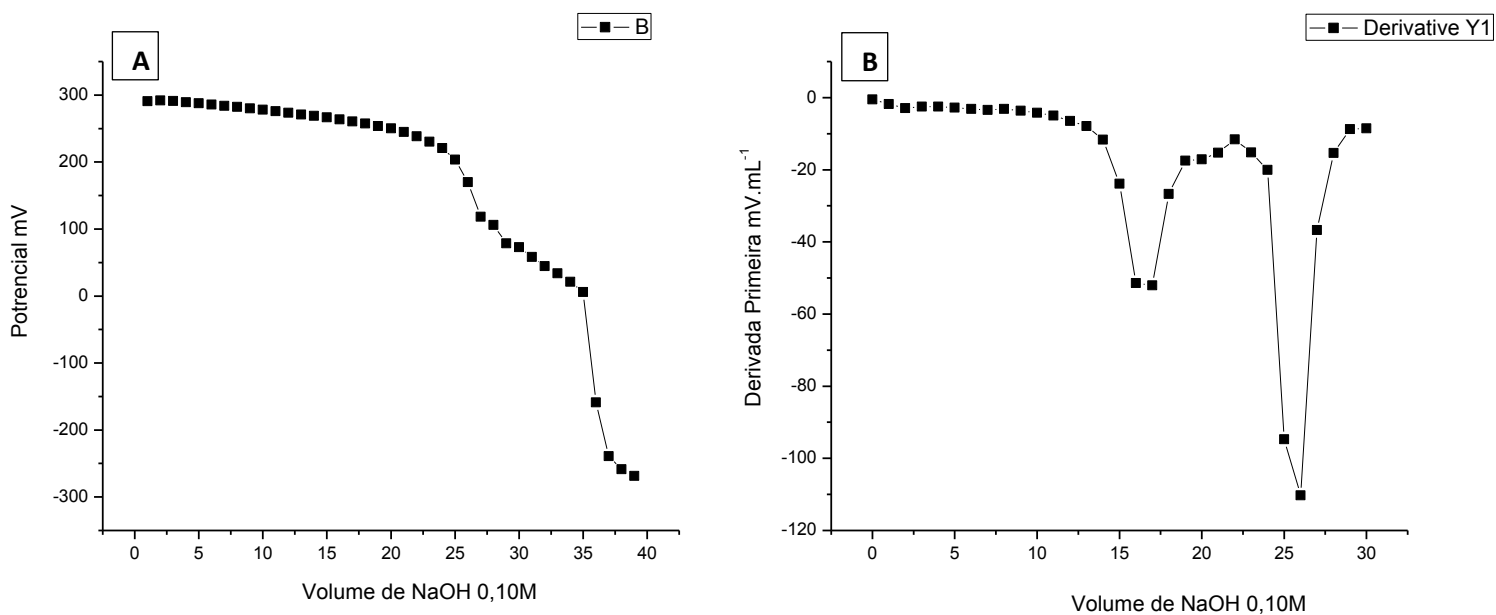


Figura 9 - Curva de titulação potenciométrica para quitosana de alto peso molecular (A); Derivada Primeira da curva de titulação potenciométrica para quitosana de Alto peso molecular (B).



5.1.2 Determinação da massa molar por viscosimetria:

Na tabela 5 são apresentados os valores da viscosidade intrínseca e os valores encontrados da massa molar média viscosimétrica (M_v) para as amostras de quitosana.

Tabela 5 - Valores das massas molares médias viscosimétricas de quitosana comerciais

Amostra	K	A	$M_v(\text{g/mol})$
Quitosana de baixo peso	0,074	0,76	75.554,8
Quitosana de Médio Peso	0,074	0,76	140.469,4
Quitosana de Alto Peso	0,074	0,76	247.795,2

Todas as amostras foram solúveis na solução tampão de ácido acético e acetato de sódio, sendo possível a determinação da viscosidade intrínseca e sua correspondente massa molar viscosimétrica. As figuras 11, 12 e 13 ilustram o perfil da viscosidade específica reduzida em função da concentração da solução para as amostras de Alto, Médio e Baixo Peso Molecular.

A técnica utilizada nesse estudo para determinação do peso molecular foi a viscosimetria, embora a literatura reporte outras técnicas para determinação do peso molecular da quitosana, a viscosimetria é uma das técnicas mais utilizadas para determinação deste parâmetro. Os resultados aqui encontrados, que são de 75774,77(g/mol), 140469,4(g/mol) e 247795,2 (g/mol) estão de acordo com Canela e Garcia (2001), que dizem que a massa molar da quitosana varia em uma faixa de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹.

Figura 10 - Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana comercial de Alto Peso Molecular

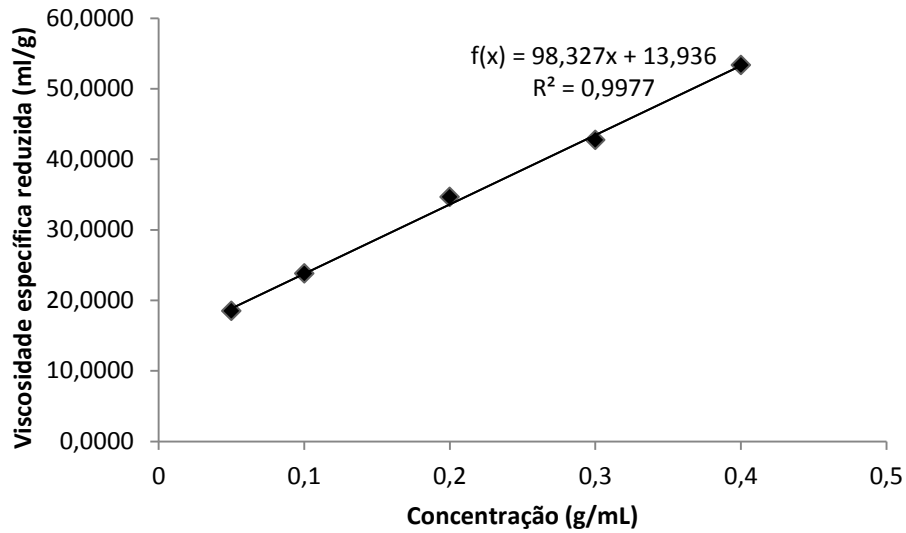


Figura 11 - Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana comercial de Médio Peso Molecular

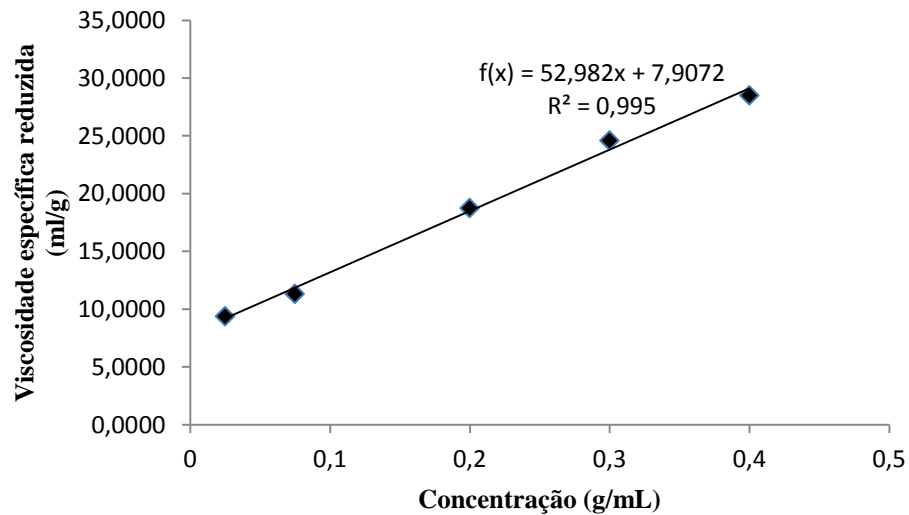
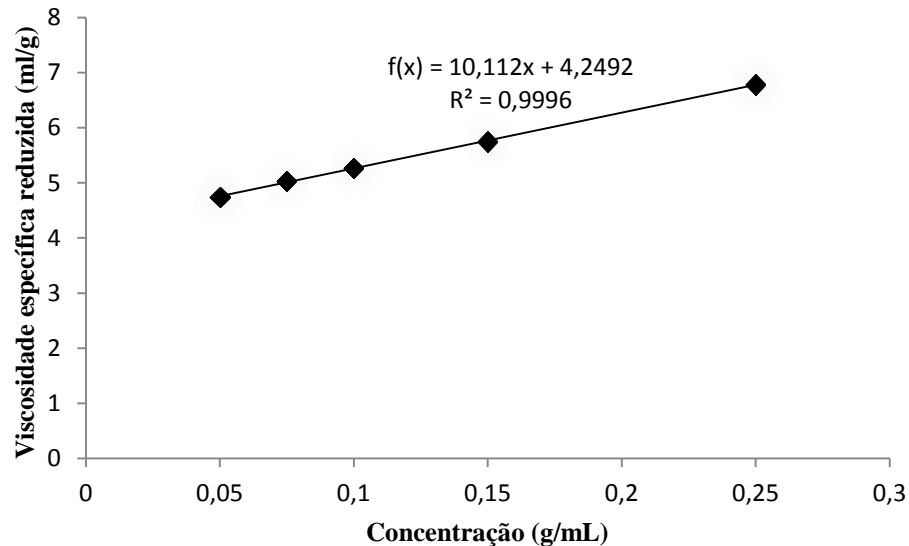


Figura 12 - Curva de viscosidade específica reduzida da quitosana comercial de Baixo Peso Molecular



5.2 Teste de sensibilidade

Nos testes de sensibilidade é necessário adicionar uma coluna para esterilidade do meio de cultura e das soluções de quitosana, que é chamado de controle negativo, uma vez que não deve haver crescimento nos poços dessa coluna. Adicionalmente uma coluna deve ser preenchida apenas com meio de cultura e inóculo, este é o controle positivo do teste, que é necessário para assegurar que a cepa está viável e descartar a possibilidade de uma falsa leitura de inibição. Ainda deve ser incluída no teste uma cepa controle preconizada pelo CLSI, a qual já existe uma padronização de sensibilidade a antifúngicos tradicionais, assegurando a eficácia do teste. Em todos os testes de sensibilidade, os controles negativos não apresentaram turvação, assegurando a esterilidade do meio de cultura e das soluções de quitosana utilizadas. No controle positivo, foi observada turvação, indicando o crescimento do microrganismo e atestando a viabilidade das amostras. Na cepa controle de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 o itraconazol apresentou uma CIM de 0,5 µg/mL e anfotericina B apresentou uma CIM de 0,03 µg/mL valores que encontram-se dentro da faixa preconizada pelo CLSI para a referida cepa controle.

5.2.1 Forma planctônica

5.2.1.1 *Candida spp.*

Como visto na tabela 6, todas as amostras de quitosana testadas inibiram o crescimento de todas as espécies de leveduras (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*) no intervalo testado. No entanto, os valores da Concentração Inibitória Mínima foram dependentes da espécie. As quitosanas de Alto, Médio e Baixo peso Molecular foram menos eficazes contra as espécies de *Candida albicans*, uma vez que maiores concentrações das amostras (256 - 512 µg/mL) foram necessárias para conseguir a completa inibição do fungo quando comparada com *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* que apresentaram valores de inibição entre 4-256 µg/mL e 16 – 512 µg/mL.

As diferenças nos valores de sensibilidade podem estar relacionadas à diferença de cargas positivas existente entre as espécies, pois como já sugerido por outros autores, o mecanismo antifúngico da quitosana está principalmente relacionado a interação entre as moléculas de quitosana carregadas positivamente e os resíduos na superfície da célula microbiana carregados negativamente (SEVERINO *et al.* , 2015; LI ; YANG; YANG., 2015). Palmeira-de-Oliveira *et al.*, (2011) demonstraram que *Candida albicans* possui menor número de cargas negativas na superfície celular do que *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*. Os níveis de cargas indicam que amostras de quitosana interagem menos com *Candida albicans* devido a quantidade reduzida de cargas negativas na superfície celular. Conseqüentemente, espera-se um efeito inibitório menor em *Candida albicans* do que em outras espécies de *Candida*. Resultados similares foram obtidos de Alburquerque *et al.*, (2010) que mostraram que o CIM de Q.B.P.M foi maior para as espécies de *Candida albicans* quando comparada com as outras espécies estudadas. Kulikov *et al.*, (2014) também verificaram a relação entre o peso molecular de quitosanas e oligoquitosanas com diferentes pesos moleculares (2,09kDa, 5,98kDa, 8,39kDa, 9,69kDa, 15,06kDa, 19,99kDa, 70kDa e 600kDa) e a atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*. Seus resultados também mostraram que os maiores valores de CIM foram referentes a *Candida albicans*.

Assim como reportado na literatura, diversos são os fatores que podem influenciar a atividade da quitosana contra o microrganismo, sendo o peso molecular um parâmetro importante. De acordo com os nossos dados em 100% das espécies de *Candida parapsilosis* e 67% de *Candida tropicalis* (fazendo uma relação para todas as amostras) testadas neste estudo, nota-se que á medida que o peso molecular aumenta, ocorre um aumento na atividade anti-Candida. Dessa forma, quanto maior o peso molecular da quitosana, menor é a quantidade de quitosana necessária para inibir o completo crescimento do fungo. *Candida parapsilosis* USP 15 foi a única cepa que apresentou valores de CIM semelhantes para as três amostras de quitosana testadas, ou seja, não apresentou dependência com o peso molecular.

Os resultados aqui encontrados podem estar baseados em mecanismos específicos. São principalmente aceitos dois mecanismos de ação, sendo o primeiro deles referente a interação da quitosana com os componentes fosfolipídicos negativamente carregados da membrana dos fungos, que causa permeabilidade da membrana, com conseqüente fuga de conteúdos celulares e está principalmente relacionado com quitosanas de alto peso molecular. O segundo mecanismo envolve a penetração da quitosana na parede celular, interação com o DNA e inibição de proteínas e enzimas essenciais e associa-se principalmente a Quitosana de baixo peso Molecular. Podemos inferir que os dois mecanismos aconteceram, uma vez que todas as amostras foram capazes de inibir visualmente o crescimento do fungo, embora algumas necessitando de maiores concentrações que outras. No entanto, estudos que comprovem danos na membrana como a quantificação de ergosterol na célula microbiana, o estresse osmótico, e liberação de ácidos nucleicos e proteínas tornam-se necessários para confirmar tais suposições.

A mesma relação entre o peso molecular e a atividade da quitosana foi encontrada por muitos autores. Seyfarth *et al.*, (2008) demonstraram que oligossacarídeo de quitosana e N-acetil-D-glicosamina nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05%, 0,025%; 0,01; 0,005; e 0,0025 não foram capazes de impedir a formação de colônias de *C. krusei* e *C. glabrata*, enquanto quitosana de alto peso molecular na concentração de 0,5% foi capaz de inibir completamente o crescimento de *C. krusei* e *C. glabrata*. Os resultados obtidos por QIN *et al.*, (2006) mostraram que quitosanas com médio peso molecular (78kDa e 48kDa) na concentração de 1000µg/mL apresentaram maior efeito inibitório do que oligômeros

de peso molecular de 1,4kDa, na mesma concentração, contra o crescimento de espécies *Candida* spp.

Chang *et al.*, (2015) mostraram que em valores de pH igual a 5 a relação do peso molecular com a atividade antimicrobiana foi a mesma encontrada neste estudo, ou seja, as quitosanas com maiores pesos moleculares (300, 156 e 72,1 kDa) reduziram o número de contagem de colônias em placa em comparação com as quitosana de menores pesos (29.2, 7.7, e 3.3 kDa). Fatores como pH e temperatura de reação devem ser considerados em estudos posteriores a fim de elucidar questões que não estão esclarecidas na literatura.

5.2.1.2 Dermatófitos

Para a execução do presente trabalho foram escolhidos fungos de diferentes gêneros, uma vez que se sabe que a atividade antifúngica pode ser dependente do microrganismo. Para representar a classe dos fungos filamentosos, foram escolhidos os dermatófitos, fungos que causam micoses cutâneas, uma das infecções fúngicas mais comuns. Apesar dos fungos não serem as principais fontes de surtos em seres humanos, nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas sistêmicas aumentou significativamente, principalmente devido ao rápido crescimento no número de pacientes com sistemas imunológicos comprometidos (MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008). Os principais agentes etiológicos em infecções fúngicas são dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, e *Epidermophyton* (FLORES *et al.*, 2013). Para avaliar ação *in vitro* anti-dermatofítica das quitosanas, os gêneros escolhidos foram *Trichophyton* e *Microsporum*. De acordo com os resultados vistos na tabela 6 não foi possível encontrar valores de CIM no intervalo de concentrações testadas que foi de 2-512 µg/mL. Dessa forma, os prováveis valores de CIM de quitosana de Alto, Médio e Baixo Peso Molecular encontram-se acima desta concentração. Como não foi possível determinar a Concentração Inibitória Mínima, não foi possível estabelecer uma relação entre as características da quitosana e sua atividade anti-dermatofítica. As diferenças nas estruturas dos fungos, a quantidade de cargas negativas presentes na superfície celular, ou ainda mecanismos de adaptação e defesa do fungo, ou a indução de compostos de defesa (COTA-ARRIOLA *et al.*, 2011) podem ter sido a causa das diferenças entre os valores de CIM encontrados para *Candida* e dermatófitos.

Em um estudo realizado por Sajomsang *et al.*, (2012) utilizando quitosana quaternizada para *T.rubrum* observou-se valores de CIM entre 125-500 µg/mL. Esses valores estão dentro da faixa utilizado em nosso estudo e que não apresentaram atividade antifúngica. Estes resultados podem ser devido às modificações realizadas na estrutura da quitosana, pois, o mecanismo mais aceitável é baseado na interação eletrostática. Logo, como derivados quaternizados de quitosana possuem maior carga positiva, serão agentes antimicrobianos mais eficazes (MOHAMED *et al.*, 2013). Modificações na estrutura da quitosana como quaternários de quitosana, podem reduzir a Concentração Inibitória Mínima encontrada nesse estudo para as cepas de dermatófitos, sendo um parâmetro a ser investigado em estudos futuros.

Estudos correlacionando a atividade antifungica da quitosana e o peso molecular contra outras espécies de fungos filamentosos são amplamente divulgados na literatura. A dependência da atividade antimicrobiana da quitosana com o peso molecular foi descrita para diversos fungos incluindo *Aspergillus fumigatus* (ATCC 6145), *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum* (ATCC16909), *Fusarium solani* (KCTC 6326), *Penicillium verrucosum var. verrucosum* (KCTC 6265), *Botrytis cinerea* (KACC 40573) e nesse estudo observou-se que a atividade da quitosana foi maior quanto maior o seu peso molecular (PARK *et al.* , 2008). Younes *et al.* (2014) investigaram o efeito de 15 amostras de quitosana com pesos moleculares que variaram de 42kDa e 135kDa e não encontraram correlação entre a atividade antifúngica e o peso molecular da quitosana para *Aspergillus niger*. Já para o *Fusarium oxysporum* foi observado que quanto menor o peso molecular da amostra, maior a atividade antimicrobiana

A dificuldade em determinar uma relação direta entre a atividade antifúngica e o peso molecular para quitosana pode estar associada a outros parâmetros que devem ser considerados, tais como seu grau de desacetilação, concentração, polidispersidade (PI) e métodos de preparação (ZHENG; ZHU, 2003; HERNANDEZ-LAUZARDO, 2008). Além disso, deve-se considerar também a presença de subprodutos e variação na estrutura química de grupos terminais de cadeias de polissacarídeos e distribuição de grupos acetil ao longo das cadeias de da quitosana, devido às diferenças nos métodos utilizados para hidrólise da quitosana.

Desse modo, pode-se inferir que uma das principais razões para acreditar que a heterogeneidade molecular é a principal razão para uma ambiguidade nos dados experimentais sobre a correlação entre as atividades biocidas e as características físico-químicas dos diferentes tipos de quitosana, devendo-se sempre caracterizar e correlacionar a atividade biológica com o peso molecular, grau de desacetilação e polidispersidade (KULIKOV *et al.*, 2012).

5.2.1.3 *Sporothrix brasiliensis*

Para complementar o estudo, cepas de fungos dimórficos foram também utilizadas para avaliar a atividade da quitosana contra fungos, foram utilizadas seis cepas de *Sporothrix brasiliensis*, um dos fungos capazes de causar infecção oportunista chamada de Esporotricose, cuja imunocompetência é determinante na patogênese (GUTIÉRREZ-GALLARDO *et al.*, 2015). Até agora não foram encontrados estudos a respeito da atividade antifúngica da quitosana contra *Sporothrix brasiliensis*. Todas as cepas testadas foram inibidas por todas as amostras de quitosana, no intervalo testado, com CIM dependentes do peso molecular das quitosanas. Diferentemente do que foi observado para as espécies de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, a atividade antifúngica aumentou com o decréscimo do peso molecular. Para quitosana de alto peso molecular as concentrações encontradas estavam entre a faixa de 32-128 µg/mL. O intervalo de concentração encontrado para quitosana de médio peso foi de 16-64 µg/mL. Como descrito anteriormente, valores de concentrações menores foram encontrados para quitosana de baixo peso molecular, sendo, entre todas as cepas testadas, a maior concentração encontrada no valor de 32 µg/mL. O itraconazol foi classificado como fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutâneas e linfocutâneas da esporotricose em pacientes imunocomprometidos, que apresentam formas clínicas mais extensa e com acometimento sistêmico (LOPES BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006, KAUFFMAN, 2007^a; SILVA *et al.*, 2012), mas a resistência do *Sporothrix brasiliensis* ao itraconazol já é relatada e valores de MICs para outros antibióticos como 5FC e CAS são semelhantes aos encontrados para quitosana de médio e baixo peso molecular aqui testadas (RODRIGUES *et al.*, 2014). Sugere-se, portanto, que os polímeros aqui estudados podem ser utilizados para estudos adicionais contra *Sporothrix brasiliensis*.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima de três tipos de quitosana contra cepas de *Candida* spp, dermatófitos e *Sporothrix brasiliensis*.

Sensibilidade antifúngica de quitosanas com diferentes pesos moleculares				
Cepas	N° de cepas	Quitosanas		
		Alto Peso Molecular	Médio Peso Molecular	Baixo Peso molecular
		MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MIC (µg/mL)
Leveduras				
<i>Candida albicans</i>				
ATCC 10231		512	512	512
1		256	512	512
2	6	512	512	512
3		512	512	512
4		512	512	512
7		512	512	512
<i>Candida parapsilosis</i>				
CEMM-01-1-165		4	4	4
CEMM 01-1-193		128	32	16
CEMM 05-1-054	6	256	256	512
CEMM 01-1-168		256	256	512
CEMM 01-1-166		64	64	128
ATCC 22019		8	16	16
<i>Candida tropicalis</i>				
HU03		32	64	256
HT02		16	64	256
HL02	6	512	512	512
HC01		256	256	512
HU04		256	256	512
HU09		512	512	512
Filamentoso				
<i>Trichophyton rubrum</i>				
CEMM 05-6-110	2	>512	>512	>512
CEMM 06-6-113		>512	>512	>512
<i>Trichophyton tonsurans</i>				
CEMM05-6-120	2	>512	>512	>512
CEMM05-6-122		>512	>512	>512
<i>Microsporum gypseum</i>				
CEMM05-6-133	2	>512	>512	>512
CEMM02-6-062		>512	>512	>512
Dimórficos				
<i>Sporothrix brasiliensis</i>				
CEMM 05-3-050		32	16	16
CEMM 05-3-053		32	16	16
CEMM 05-3-054	6	128	64	32
CEMM 05-3-055		128	64	32
CEMM 05-3-056		128	64	32
CEMM 05-3-057		128	64	32

5.2.2 Biofilme

Relacionar a atividade antimicrobiana da quitosana contra biofilmes torna-se necessária, uma vez que infecções crônicas podem ser provocadas por essas comunidades de microrganismos (PARSEK; SINGH, 2003), conferindo resistência em centenas ou milhares de vezes a agentes antifúngicos quando comparado as células planctônicas (TARASZKIEWICZ *et al.*, 2013). O processo de formação do biofilme tem início quando as células planctônicas aderem a uma superfície biótica ou abiótica e em seguida começam a produzir conexões intercelulares e matriz polimérica e multiplicam-se dentro da matriz de exopolissacarídeos (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). Desse modo, ao reduzir o processo de adesão a quitosana irá minimizar a formação de biofilme. A literatura não descreve de forma específica a relação entre as características dos diferentes tipos de quitosana com a sua atividade contra a formação de biofilme, sendo esse um ponto bastante inovador desse estudo.

No presente estudo foram avaliados o efeito da quitosana tanto na atividade metabólica quanto da biomassa dos biofilmes na fase de adesão e formados de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*. Nas tabelas 6 e 7 encontram-se os valores da densidade ótica, que se relaciona com a atividade metabólica, de biofilmes de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* que não foram expostos às quitosanas (controle) e biofilmes que foram expostos a diferentes concentrações (CIM, 4x CIM, 8x CIM) para as quitosanas de diferentes pesos moleculares para a fase de adesão e biofilme formado, respectivamente. As Tabelas 8 e 9 relacionam a biomassa dos biofilmes de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*, nas mesmas condições citadas anteriormente, para a fase de adesão e biofilme formado, respectivamente.

A partir da Tabela 8 observa-se a redução da atividade metabólica para a fase de adesão dos biofilmes de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*. Pode-se observar que a quitosana teve atividade significativa contra a adesão dos biofilmes comparada ao controle e que não houve diferença estatística entre as quitosanas de diferentes pesos moleculares. Pode-se observar que as quitosanas de alto, médio e baixo peso molecular reduziram em até 80,33%, 76,08% e 75,12%, a atividade metabólica na fase de adesão dos biofilmes do gênero *Candida* e 61,20%, 53,87% e 52,15%, para o *Sporothrix brasiliensis*, respectivamente. Esses valores percentuais

foram obtidos através de uma relação entre a densidade ótica do controle (considerado 100%) e a densidade ótica dos biofilmes expostos as maiores concentrações de quitosana (8x CIM).

A Tabela 9 mostra a atividade da quitosana sobre a atividade metabólica dos biofilmes formados (fase madura) podendo-se observar que a quitosana além de ter ação contra a adesão também teve ação sobre o biofilme formado, para todos os tipos de quitosana e todos os microorganismos testados e sem diferença significativa entre os tipos de quitosana. Os biofilmes formados de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* tiveram sua atividade metabólica reduzida por ação das amostras testadas em 83,90%, 85,81% e 82,15% e 77,82%, 90% e 58,64%, para as quitosanas de alto, médio e baixo, respectivamente para *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*.

Um outro parâmetro importante a ser mensurado para determinar a ação antifúngica contra biofilmes é a biomassa formada (mensurado através da interação do corante cristal violeta com a matéria orgânica). A Tabela 10 apresenta os resultados da biomassa formada na fase de adesão para *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*. Esses resultados demonstram que a quitosana além de reduzir a atividade metabólica são capazes de destruir a matriz exopolimérica, independente do tipo de quitosana. Para alguns microorganismos obsevou-se que na CIM não houve diferença significativa com o controle. O mesmo pode ser observado na Tabela 11 para os biofilmes maduros (estágio final de maturação do biofilme) para os diferentes microorganismos e tipos de quitosana.

Pela Tabela 10 observa-se que todas as amostras testadas foram capazes de promover a desagregação extensiva da biomassa nos biofilmes na fase de adesão de *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* em 85,36%, 84,10% e 83,01 e 62,23%, 66,66% e 59,67% para as quitosanas de alto, médio e baixo pelo molecular, respectivamente *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis*. A Tabela 11 indica os resultados do biofilme maduro mostrando uma redução de 77,03%, 81,88% e 75,21% e 72,16%, 74,45% e 79,56% para *Candida* spp. e *Sporothrix brasiliensis* com a quitosanas de alto, médio a baixo peso molecular.

A parede celular é uma importante estrutura no processo de adesão dos fungos a superfícies sólidas, como dispositivos médicos, por isso estudos tem utilizado a parede celular como alvo para o desenvolvimento de estratégias para o combate de infecções associadas a biofilme (BACHMANN *et al.*, 2002). A quitosana

pode ser um forte candidato para o tratamento de dispositivos médicos com agentes antifúngicos antes de serem implantados em pacientes devido as propriedades anti-aderentes e antifúngicas contra os biofilmes fúngicos (BACHMANN *et al.*, 2002; TRAMPUZ; ZIMMERLI, 2005). O mecanismo relacionado ao tratamento de superfícies sólidas com quitosana como uma medida profilática a formação de biofilme deve-se ao fato desta ser capaz de romper membranas carregadas negativamente como a dos fungos e estes ficam impedidos de se estabelecerem na superfície, ou ainda ao fato da quitosana ser capaz de interferir na liberação local de polissacarídeo capsular por células ligadas a superfície de sólidas impedindo a produção da matriz de polissacarídeo (MARTINEZ *et al.*, 2010).

É importante notar que os biofilmes de todas as espécies aqui estudadas foram significativamente menos sensíveis que as células planctônicas à quitosana, sendo necessária uma concentração maior de quitosana para alcançar reduções antifúngicas significativas, comprovando uma maior resistência dos biofilmes a terapias antifúngicas já relatadas em outros estudos (CHANDRA *et al.*, 2001; DIBONAVENTURA *et al.*, 2006; SUN *et al.*, 2012; ITURRIETAGONZALEZ *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2014; BAILLIE; DOUGLAS, 2000; MURKHERJEE; CHANDRA, 2004; RAMAGE *et al.*, 2012). Esse fato pode ser explicado devido a ausência da matriz exopolimérica protetora, facilitando o acesso da quitosana à parede celular fúngica, tornando as células planctônicas mais susceptíveis a penetração e ruptura das células internas do que quando estas encontram-se em associações envoltas pela matriz polissacarídica (biofilmes).

A eficácia da quitosana contra biofilmes de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, e *Candida tropicalis* foi previamente relatada por Silva-dias *et al.*, (2014). Seu trabalho mostrou que quitosana de baixo peso molecular (50kDa) na concentração de 1×10^4 mg/L, foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme e a atividade metabólica de todas as espécies de *Candida* testadas em até 90%. A redução encontrada na atividade metabólica dos biofilmes foi dose-dependente. Esta mesma relação entre a atividade metabólica e a dose de quitosana foi encontrada neste estudo, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6. Reduções de biofilme de *Candida albicans* em 90,06% foram descritos por Cobrado *et al.*, (2012). A literatura reporta ainda que a quitosana com peso molecular de 3kDa, 13kDa e 180kDa na concentração de 200µg/mL quando combinados com amicacina nas concentrações de 1, 5, 10, e 25 µg/mL matam mais células vivas dos

biofilmes de *Listeria monocytogenes* já estabelecidos do que amicacina isolada (MU *et al.*, 2014), demonstrando que quitosana pode ser utilizada em combinação com outros antibióticos.

Diante do exposto, percebemos que todas as quitosanas estudadas nesse trabalho se apresentam como um composto promissor para o gerenciamento de infecções fúngicas e um forte candidato para aplicação como Biomateriais, tais como dispositivos médicos comocateter

Tabela 8 - Atividade metabólica dos biofilmes na fase de adesão de *Candida* spp e *Sporothrix brasiliensis* após exposição às quitosana (492nm)(p<0,05).

Espécies	Nº de cepas	Controle**	Q.A.P.M			Q.M.P.M			Q.B.P		
			MIC	4xCIM	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC
<i>Candida albicans</i>	6	0,56	0,244	0,182*	0,112*	0,266	0,157*	0,13*	0,372	0,234*	0,156*
<i>Candida parapsilosis</i>	6	0,436	0,188	0,103*	0,085*	0,173	0,099*	0,099*	0,246	0,085*	0,110*
<i>Candida tropicalis</i>	6	0,367	0,153	0,084*	0,071*	0,12	0,109	0,097*	0,112	0,087	0,073*
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	6	0,232	0,166*	0,116*	0,09*	0,141	0,127*	0,107*	0,218	0,17	0,111*

* Redução significativa em relação ao controle

** Crescimento do biofilme sem antifúngico

Tabela 9 - Atividade metabólica dos biofilmes formados de *Candida* spp e *Sporothrix brasiliensis* após exposição às quitosana (492nm)($p < 0,05$).

Espécies	Nº de cepas	Controle**	Q.A.P.M			Q.M.P.M			Q.B.P		
			MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC
<i>Candida albicans</i>	6	1,757	1,394	0,599*	0,31*	1,069*	0,316*	0,251*	1,255*	0,755*	0,379*
<i>Candida parapsilosis</i>	6	1,519	0,666	0,346	0,183*	0,805	0,254*	0,147*	0,844	0,418*	0,197*
<i>Candida tropicalis</i>	6	1,707	0,727*	0,529*	0,309*	0,567*	0,393*	0,309*	0,921*	0,512*	0,313*
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	6	0,981	0,822*	0,481*	0,408*	0,589	0,457	0,172*	1,624	1,072*	0,761*

* Redução significativa em relação ao controle

** Crescimento do biofilme sem antifúngico

Tabela 10- Biomassa dos biofilmes na fase de adesão de *Candida* spp e *Sporothrix* spp. após exposição às quitosanas (590 nm) ($p < 0,05$)

Espécies	Nº de cepas	Controle**	Q.A.P.M			Q.M.P.M			Q.B.P		
			MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC
<i>Candida albicans</i>	6	0,709	0,451*	0,269*	0,198*	0,557	0,417*	0,206*	0,518*	0,364*	0,168*
<i>Candida parapsilosis</i>	6	1,95	0,57	0,277*	0,184*	0,608	0,356*	0,204*	0,56	0,272*	0,174*
<i>Candida tropicalis</i>	6	0,915	0,671	0,23*	0,141*	0,851	0,437*	0,158*	0,821*	0,433*	0,265*
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	6	0,429	0,239	0,187*	0,162*	0,262	0,205*	0,143*	0,325	0,231	0,173*

* Redução significativa em relação ao controle

** Crescimento do biofilme sem antifúngico

**Tabela 11 - Biomassa dos biofilmes formados de *Candida* spp e *Sporothrix* spp. após exposição às quitosanas (590 nm)
($p < 0,05$)**

Espécies	N° de cepas	Controle**	Q.A.P.M			Q.M.P.M			Q.B.P		
			MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC	MIC	4xMIC	8xMIC
<i>Candida albicans</i>	6	2,458	1,607*	1,068*	0,568*	1,659*	0,799*	0,6*	1,645	1,178*	0,826*
<i>Candida parapsilosis</i>	6	2,985	1,64*	0,802*	0,733*	1,743	0,704*	0,538*	1,81*	0,82*	0,738*
<i>Candida tropicalis</i>	6	3,831	1,71	1,105*	0,829*	0,836	0,631	0,542*	2,08	0,997*	0,735*
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	6	1,703	1,022*	0,835*	0,474*	1,168*	0,861*	0,435*	1,408	0,746*	0,348*

* Redução significativa em relação ao controle

** Crescimento do biofilme sem antifúngico

5.3 Morfologia e estrutura dos biofilmes

Os ensaios de Microscopia confocal e MEV foram realizados com uma espécie de *Candida tropicalis*. Através da análise de microscopia confocal foi realizado a quantificação da biomassa e a medição da espessura dos biofilmes, representados pela Figura 14 e 15, respectivamente. Na figura 14 podemos observar que biofilmes maduros de *Candida tropicalis* tratados com CIM, 4x CIM e 8x CIM apresentaram redução na biomassa de 5%, 38% e 62% respectivamente. Teve diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,05$) apenas os tratamentos com 4x MIC e 8x MIC. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados no ensaio realizado com cristal violeta, onde também foi observado que a quitosana é capaz de destruir a matriz exopolimérica. Observa-se na Figura 15 a espessura dos biofilmes (μm) de *Candida tropicalis* do controle e dos tratamentos com CIM, 4x CIM, 8x CIM. A espessura dos biofilmes aumentaram em até 69%. Foi feita uma relação entre a espessura do biofilme controle, considerado 100%, e a espessura do biofilme tratado com 8x CIM.

As imagens mostraram (Figura 16) que os biofilmes sem adição da quitosana (controle Figura 16A) são compostos de densas massas de células viáveis, representadas pela cor verde e que à medida que a concentração de quitosana aumenta, é possível observar um maior número de células mortas, representadas pela cor vermelha.

Ao estudar o efeito inibitório da quitosana em combinação com antibióticos contra biofilmes de *Listeria monocytogenes* MU *et al.*, 2014 mostrou, através de microscopia de fluorescência que a arquitetura dos biofilmes quando expostos à combinação de quitosana com amicacina apresentou menos agregados de células quando comparado com o biofilme exposto apenas ao antibiótico.

A microscopia eletrônica de varredura (Figura 16 – E-H) mostra que biofilmes tratados com quitosana exibem células de levedura enrugadas e colapsadas, distinguindo da superfície regular e lisa observada nas leveduras do biofilme controle. As observações de MEV forneceram evidência morfológica da potente atividade permeabilizante da quitosana de baixo peso molecular.

Quitosana de baixo peso molecular têm uma afinidade para os lipídios da membrana plasmática e as suas especificidades para as membranas microbianas têm sido, em muitos casos, relacionadas com as cargas positivas da quitosana, o

que favorece a interação com o componente aniônico exposto da membrana plasmática microbiana.

Park *et al.*, (2008) mostrou através Microscopia eletrônica que quitosana de baixo peso molecular é capaz de causar mudanças morfológicas na estrutura de células de *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*. SILVA-DIAS *et al.*, 2014 observou através do MEV que biofilmes pré formados de *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* quando expostos a concentração de 1×10^4 mg/L de quitosana de baixo peso molecular levou a uma redução da biomassa, bem como alterações morfológicas e células colapsadas. Singha *et al.*, (2008) descobriram que as concentrações crescentes de quitosana induzem ramificações excessivas, vacuolação e uma redução no diâmetro das hifas de *Sphaeropsis sapinea* e *Trichoderma harzianum*, sugerindo que a membrana plasmática pode ser o alvo primário da ação.

Figura 13 - Espessura de biofilmes de *Candida tropicalis* expostos a diferentes concentrações de quitosana de Baixo Peso Molecular. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio padrão.

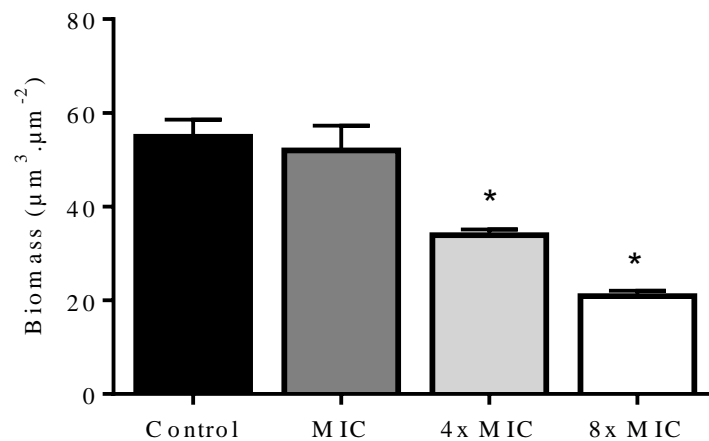


Figura 14 - Biomassa de biofilmes de *Candida tropicalis* expostos a diferentes concentrações de quitosana de Baixo Peso Molecular. Os asteriscos representam diferenças estatísticas em comparação ao controle de cada cepa ($p < 0,05$). Resultados expressos por média \pm desvio.

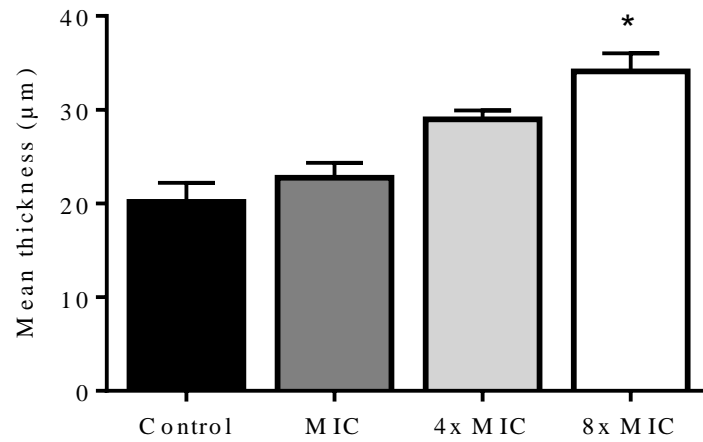
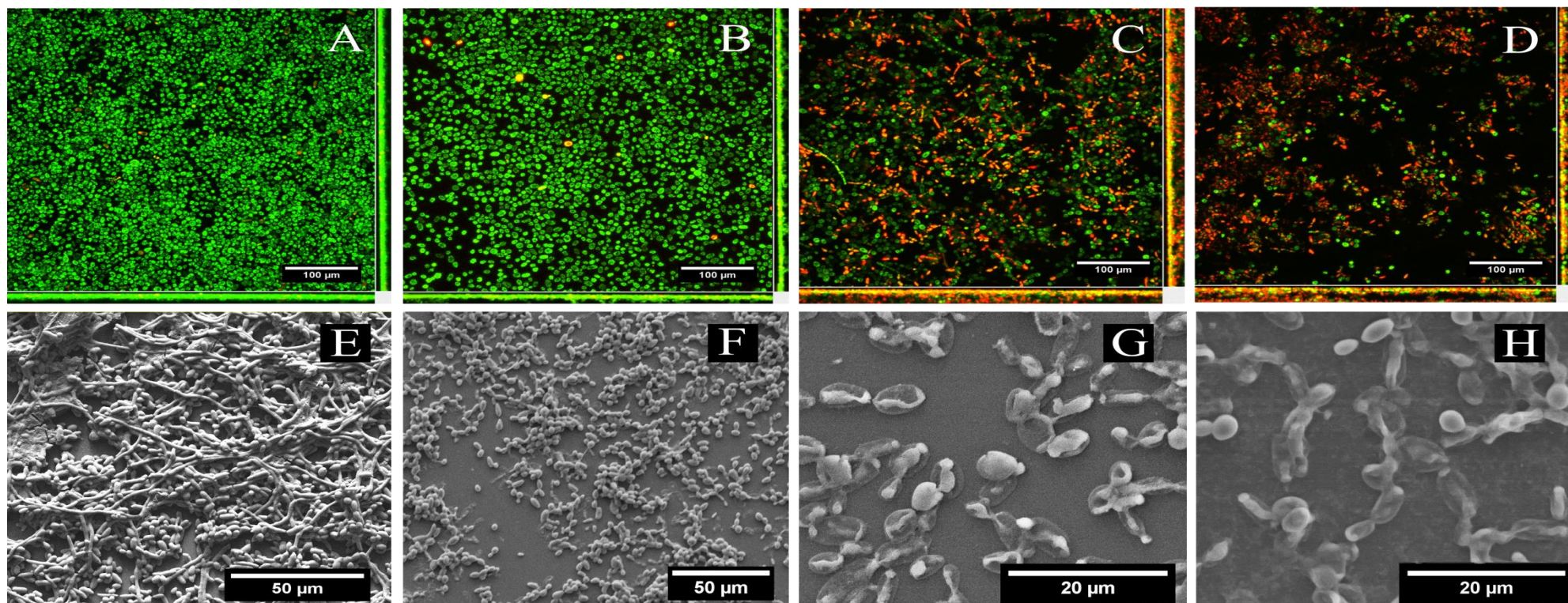


Figura 15 - Biofilmes de *Candida tropicalis* incubadas a diferentes concentrações de quitosana de baixo peso molecular (QBPM). Microscopia confocal de varredura a laser (figuras A-D). A cor verde corresponde a células viáveis. A cor vermelha corresponde a células inviáveis. Microscopia eletrônica de varredura (figuras E-H). As setas vermelhas indicam a destruição do biofilme. As setas amarelas indicam células colapsadas. Magnification: 400x (figuras A-D), 2000x (figura E), 1500x (figura



F), 6122x (figura G) e 6000x (figura H). Escalas: 100 μm (figuras A-D), 50 μm (figuras E e F), 20 μm (figuras G e H).

Vale ressaltar que estudos “*in vivo*” encontrados na literatura mostram que as concentrações aqui utilizadas não são tóxicas. Em um estudo realizado durante 65 dias não foi observado efeito adverso sobre o peso corporal quando se injetaram oligossacarídeos de quitosana na concentração de 7,1-8,6 mg/kg ao longo de 5 dias. Nenhum sintoma fisiológico anormal foi observado nos coelhos durante a administração intravenosa de quitosana de baixo peso molecular e oligossacarídeos de quitosana (HIRANO *et al.* , 1991). Em testes de toxicidade aguda não foram observados efeitos tóxicos significativos em ratos, irritação ocular em coelhos, ou irritação cutânea em cobaias (RAO; SHARMA., 1997). Gades e Stern (2003) em um estudo sobre quelação de gordura observaram que 4,5 g/ dia de quitosana em humanos não foram tóxicos. A exposição da mucosa nasal de ratos a soluções de quitosana a 0,5% durante 1h não causaram alterações significativas na morfologia das células mucosas comparado ao controle (ILLUM; FARRAJ; DAVIS, 1994). A maioria dos estudos a respeito dos efeitos tóxicos da quitosana relata pouca ou nenhuma toxicidade e isso justifica a sua escolha como material seguro na administração de drogas.

6 CONCLUSÃO

Independente do peso molecular ou grau de desacetilação as quitosanas mostraram um efeito antifúngico mais forte contra as espécies de *Candida parapsilosis* do que *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. A atividade antifúngica da quitosana contra as espécies de *Candida* aumentam com o aumento do peso molecular já para *Sporothrix brasiliensis* a atividade antifúngica da quitosana aumenta com a diminuição do peso molecular. Em relação aos biofilmes, a massa molar das quitosanas não influenciou a atividade antifúngica. Nossos dados sugerem que quitosana se apresenta como um composto promissor para uso em dispositivos médicos como cateter. Os resultados “*in vitro*” realizados, também sugerem que estudos a respeito da atividade antifúngica contra *Sporothrix brasiliensis* são promissores.

REFERÊNCIAS

- AAM, B. B.; HEGGSET, E. B.; NORBERG, A. L.; SØRLIE, M.; VÅRUM, K. M.; EIJSINK, V. G. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. **Marine drugs**, v. 8, n. 5, p. 1482-1517, 2010.
- ABDULKARIM, A.; ISA, M. T.; ABDULSALAM, S.; MUHAMMAD, A. J.; AMEH, A. O. Extraction and characterisation of chitin and chitosan from mussel shell. **Extraction**, v. 3, n. 2, 2013.
- AIBA, S. I. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 4, p. 225–228, 1992.
- AJELLO, L. A. taxonomic review of the dermatophytes and related species. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 6, n. 2, p. 147-159, 1968.
- AJELLO, L. Taxonomy of the dermatophytes: a review of their imperfect and perfect states [Fungi]. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 6., 1975. Tokyo (Japan). **Anais...** Tokyo (Japan). 1975.
- ALBURQUENQUE, C.; BUCAREY, S. A.; NEIRA-CARRILLO, A.; URZÚA, B.; HERMOSILLA, G.; TAPIA, C. V. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. **Medical Mycology**, v. 48, n. 8, p. 1018-1023, 2010.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; HERAS, Á. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, 2009.
- ARVANITOYANNIS, I. S. The use of chitin and chitosan for food packaging applications. **Environmentally compatible food packaging**, v. 2, p. 137, 2008.
- BACHMANN, S. P.; VANDEWALLE, K.; RAMAGE, G.; PATTERSON, T. F.; WICKES, B. L.; GRAYBILL, J. R.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3591-3596, 2002.
- BADAWY, M. E.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, 2011.

- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.
- BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.
- BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; RIELLO, G. B.; GUEDES, G. N. M. M.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; FECHINE, M. A. B.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; MESQUITA, J. R. L.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Antiretroviral drugs saquinavir and ritonavir reduce inhibitory concentration values of itraconazole against *Histoplasma capsulatum* strains *in vitro*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 20, n. 2, p. 155-159, 2016.
- BONAVENTURA, G.; POMPILIO, A.; PICCIANI, C.; IEZZI, M.; D'ANTONIO, D.; PICCOLOMINI, R. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, 2006.
- BRILHANTE, R. S. N.; DE LIMA, R. A. C.; DE FARIAS MARQUES, F. J.; SILVA, N. F.; CAETANO, É. P.; CASTELO, D. D. S. C. M.; DE CAMARGO, Z. P. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. **Journal of medical microbiology**, v. 64, n. 4, p. 394-399, 2015.
- BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P. **Advances in chitin and chitosan**. [S.l.]: Elsevier Applied Science, 1992.
- CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.
- CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 1991.
- CARVALHO CANELLA, K. M. N.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel–influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.
- CASSONE, A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. **Current topics in medical mycology**. [S.l.]: Springer New York, 1989. p. 248-314.
- CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.
- CHANG, S. H.; LIN, H. T. V.; WU, G. J.; TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 74–81, 2015.

CHANG, S. H.; LIN, H. T. V.; WU, G. J.; TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. **Carbohydrate polymers**, v. 134, p. 74-81, 2015.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; GUHA, A. K. A study on antifungal activity of water-soluble chitosan against *Macrophomina phaseolina*. **International journal of biological macromolecules**, v. 67, p. 452-457, 2014.

CHEN, S.; WU, G.; ZENG, H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 33–38, 2005.

CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. G.; LIN, J. G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p. 932-936, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. 3rd ed. Pennsylvania, USA: CLSI, 2008.

COBRADO, L.; AZEVEDO, M. M.; RAMOS, J. P.; RODRIGUES, A. G. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 2, p. 07, 2012.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. William et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

COTA-ARRIOLA, O.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; ROSAS-BURGOS, E. C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-FRANCO, Y. L.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 937-944, 2011.

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. **Journal of medicinal plants research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 5, p. 580-589, 2013.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703-714, 2004.

DOMARD, A. pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cull-polymer interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, n. 2, p. 98–104, 1987.

EL-TAHLAWY, K. F.; EL-BENDARY, M. A.; ELHENDAWY, A. G.; HUDSON, S. M. The antimicrobial activity of cotton fabrics treated with different crosslinking agents and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 4, p. 421–430, 2005.

EMMONS, C. W. Dermatophytes: natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 3, p. 337-362, 1934.

FEI LIU, X.; LIN GUAN, Y.; ZHI YANG, D.; LI, Z.; DE YAO, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324-1335, 2001.

FERNANDES, K. SS.; MATHEWS, H. L.; BEZERRA, L. M. L. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 195-203, 1999.

FERNANDEZ-SAIZ, P.; LAGARON, J. M.; OCIO, M. J. Food Hydrocolloids Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 913–921, 2009.

FLORES, F. C.; DE LIMA, J. A.; RIBEIRO, R. F.; ALVES, S. H.; ROLIM, C. M. B.; BECK, R. C. R.; DA SILVA, C. B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 281-286, 2013.

FUENTES, C. A. A. New species of *Microsporum*. **Mycologia**, v. 48, n. 4, 1956.

GADES, M. D.; STERN, J. S.; MATTHEW, D.; STERN, J. S. Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men. **Obesity research**, v. 11, n. 5, p. 683-688, 2003.

GHANNOUM, M. A.; ISHAM, N.; HAJJEH, R.; CANO, M.; AL-HASAWI, F.; YEARICK, D.; WARNER, J.; LONG, L.; JESSUP, C.; ELEWSKI, B. Tinea capitis in Cleveland: Survey of elementary school students. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 2 SUPPL., p. 189–193, 2003.

GUARRO, J.; CANO, J.; LEAL, J. A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; BERNABÉ, M. Composition of the cell wall polysaccharides in some geophilic dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 122, n. 2, p. 69-77, 1993.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; DO VALLE, A. C. F. Clinical Forms of Human Sporotrichosis and Host Immunocompetence. In: **Sporotrichosis**. [S.]: Springer International Publishing, 2015. p. 73-82.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. J. Characterization of β -lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 124-131, 2006.

GRUBY, D. Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. **CR Acad Sci**, v. 13, p. 309-312, 1841.

HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2–3, p. 235–244, 2001.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; MÉNDEZ-MONTEALVO, M. G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M. M.; BELLO-PÉREZ, L. A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 541–547, 2008.

HIRANO, S.; SEINO, H.; AKIYAMA, Y.; NONAKA, I. Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations. **Progress in biomedical polymers**. [S.I.]: Springer US, p. 283-290, 1990.

HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 467–475, 2016.

ILLUM, L.; FARRAJ, N. F.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 8, p. 1186-1189, 1994.

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: Potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 1–2, p. 103–110, 2004.

ITURRIETA-GONZALEZ, I. A.; PADOVAN A.C. B.; BIZERRA, F.C.; HAHN, R.C.; COLOMBO, A. L. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PloS One**, v. 9, n. 10, p.1-10, 2014.

JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227-232, 2010.

JOTHI, N.; NACHIYAR, R. Kunthavai. Identification and Isolation of Chitin and Chitosan from Cuttle Bone of *Sepia prashadi* Winckworth, 1936. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 01-07, 2013.

JUNG, J.; ZHAO, Y. Characteristics of deacetylation and depolymerization of β -chitin from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) pens. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 13, p. 1876-1884, 2011.

- KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255-1265, 2007.
- KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2339–2349, 2003.
- KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin research revisited. **Marine drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988-2012, 2010.
- KIM, C. H.; CHUN, H. J. A synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 1, p. 25-32, 1999.
- KIM, S. K.; RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 4, p. 357–368, 2005.
- KNORR, D. **Use of chitinous polymers in food**: A challenge for food research and development. USA: Food Technology, 1984.
- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 35, n. 2, p. 126-139, 2004.
- KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 4, p. 268–274, 2000.
- KULIKOV, S.; TIKHONOV, V.; BLAGODATSKIKH, I.; BEZRODNYKH, E.; LOPATIN, S.; KHAIRULLIN, R.; PHILIPPOVA, Y.; ABRAMCHUK, S. Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 545–550, 2012.
- KUMAR, M. N. R. A. Review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functional polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and stability**, v. 59, n. 1, p. 117-120, 1998.
- LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.

LEE, M.; NAH, J. W.; KWON, Y.; KOH, J. J.; KO, K. S.; KIM, S. W. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 4, p. 427-431, 2001.

LLOYD, K. O.; BITOON, M. A. Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*. Structural and immunochemical studies. **The Journal of Immunology**, v. 107, n. 3, p. 663-671, 1971.

LI, X. FANG.; FENG, X. QIANG.; YANG, S.; FU, G. QING.; WANG, T. PU.; SU, Z. XING. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 493–499, 2010.

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

LIAO, Y.; HARTMANN, T.; ZHENG, T.; YANG, R. Y.; AO, J. H.; WANG, W. L. Breakthrough *Trichosporonosis* in patients receiving echinocandins: case report and literature review. **Chin. Med. J.**, v. 125, n. 14, p. 2632-2635, 2012.

LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 313–319, 2004.

LIN, H.; CHOU, C. Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 883-889, 2004.

LIN, J.; QIU, S.; LEWIS, K.; KLIBANOV, A. M. **Mechanism of Bactericidal and Fungicidal Activities of Textiles Covalently Modified With Alkylated Polyethylenimine**. [S.l.:s.n.], 2004.

LIU, N.; CHEN, X. G.; PARK, H. J.; LIU, C. G.; LIU, C. S.; MENG, X. H.; YU, L. J. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 1, p. 60–65, 2006

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

MACHUL, A.; MIKOŁAJCZYK, D.; REGIEL-FUTYRA, A.; HECZKO, P. B.; STRUS, M.; ARRUEBO, M. Study on inhibitory activity of chitosan-based materials against biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of biomaterials applications**, v. 30, n. 3, p. 269-278, 2015.

MARQUES-EVANGELISTA, O. M.; ALMEIDA-PAES, R.; DE MEDEIROS-MUNIZ, M.; DE LIMA-BARROS, B. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, C. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**, v.169, n.5, p.359-363, 2010.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 369-383, 2008.

MATSUMOTO, T.; AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **International journal of dermatology**, v. 26, n. 8, p. 491-499, 1987.

MEI, Y. XIA.; DAI, X. YI.; YANG, W.; XU, X. WEI.; LIANG, Y. xiang. Antifungal activity of chitooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 330–335, 2015.

MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 28, n. 6, p. 1909-1917, 1983.

MITTELMAN, M. W. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2760–2764, 1998

MOHAMED, C.; AMENAN, K.; DIDIER, M.; GÉRARD, L.; NOËLLE, D. M. Food Hydrocolloids Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 576–580, 2013.

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

MURKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist. Updat.** v.7, p. 301–309. 2004.

NO, H. K.; YOUNG PARK, N.; HO LEE, S.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 65–72, 2002.

ODDS, F. C. Sabouraud('s) agar. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 355–359, 1991.

ORGAZ, B.; LOBETE, M. M.; PUGA, C. H.; JOSE, C. S. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 817-828, 2011.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A.; PASSARINHA, L. A.; GASPAR, C.; PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, R.; SARMENTO, B. The relationship between *Candida* species charge density and chitosan activity evaluated by ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 31, p. 3749–3751, 2011.

- PARK, Y.; KIM, M. H.; PARK, S. C.; CHEONG, H.; JANG, M. K.; NAH, J. W.; HAHM, K. S. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-chitosan. **J Microbiol Biotechnol**, v. 18, n. 10, p. 1729-1734, 2008.
- PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J. Microbiol. Methods.**, v. 72, n. 2, p. 157– 165, 2008.
- PENG, Z.; TU, B.; SHEN, Y.; DU, L.; WANG, L.; GUO, S.; TANG, T. Quaternized chitosan inhibits icaA transcription and biofilm formation by Staphylococcus on a titanium surface. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 860-866, 2011.
- PHILLIPS, P. L.; WOLCOTT, R. D.; Fletcher, J.; Schultz, G. S. Biofilms Made Easy. **Wounds International**, v. 1, n. 3, 2010.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in polymer science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.
- PRASHANTH, K. H.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 3, p. 117-131, 2007.
- QIN, C.; DU, Y.; XIAO, L.; LI, Z.; GAO, X. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 1–3, p. 111–117, 2002.
- QIN, C.; LI, H.; XIAO, Q.; LIU, Y.; ZHU, J.; DU, Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 3, p. 367–374, 2006.
- RABEA, E. I.; BADAWEY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.
- RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **Inter. J. Microbiol.**, v. 2012, 2012.
- RAMÍREZ, M. Á.; RODRÍGUEZ, A. T.; ALFONSO, L.; PENICHE, C.; EXPERIMENTAL, E.; NACIONAL, I.; AGRÍCOLAS, D. C.; RAMÍREZ, M. Á. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Bioteconología Aplicada**, v. 27, n. 4, p. 270-276, 2010.
- RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of biomedical materials research**, v. 34, n. 1, p. 21-28, 1997.

RAVAL, R.; RAVAL, K.; MOERSCHBACHER, B. M. Enzymatic modification of chitosan using chitin deacetylase isolated from *Bacillus cereus*. **open access scientific reports**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2013.

REESHA, K. V.; SATYEN KUMAR, P.; BINDU, J.; VARGHESE, T. O. Development and characterization of an LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 934–942, 2015.

REISS, E. **Molecular immunology of mycotic and actinomycotic infections**. [S.l.]: Elsevier Science Ltd, 1986.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

RIVA, R.; RAGELLE, H.; DES RIEUX, A.; DUHEM, N.; JÉRÔME, C.; PRÉAT, V. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. In: **Chitosan for biomaterials II**. Springer Berlin Heidelberg, p. 19-44, 2011.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S. De; PIRES, D. D. C.; SÂMIA, R.; BRIHANTE, N.; JÚLIO, J.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; CAMARGO, Z. P. De. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M.; FELIPE, M. S.; DE CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

ROLLER, S.; COVILL, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1–2, p. 67–77, 1999.

SAHARAN, V.; MEHROTRA, A.; KHATIK, R.; RAWAL, P.; SHARMA, S. S.; PAL, A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 677–683, 2013.

SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; SAESOO, S.; OVATLARNPORN, C. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 263–269, 2012.

SASAKI, A. A.; FERNANDES, G. F.; RODRIGUES, A. M.; LIMA, F. M.; MARINI, M. M.; DOS S FEITOSA, L.; DE MELO TEIXEIRA, M.; FELIPE, M. S.; DA SILVEIRA, J.

F.; DE CAMARGO, Z. P. Chromosomal polymorphism in the *Sporothrix schenckii* complex. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86819, 2014.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida* spp and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 2, p. 25-34, 2007.

SEVERINO, R.; FERRARI, G.; DANG, K.; DONSI, F. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 1-10, 2014.

SEYFARTH, F.; SCHLIEMANN, S.; ELSNER, P.; HIPLER, U. C. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1, p. 139-148, 2008.

SHAH, V. K.; KNIGHT, S. G. Chemical composition of hyphal walls of dermatophytes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 127, p. 229-234, 1968.

SHARP, R. G. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. **Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 757-793, 2013.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SHEPHERD, M. G.; POULTER, R. T. M.; SULLIVAN, P. A. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 579-614, 1985.

SILVA-DIAS, A.; Palmeira-de-Oliveira, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J.; COBRADO, L.; MONTEIRO-SOARES, M.; RODRIGUES, A. G. (2014). Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. **Medical microbiology and immunology**, v. 203, n. 1, p. 25-33, 2014.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects—an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 8, p. 1047-1067, 2001.

SINHA, S.; CHAND, S.; TRIPATHI, P. Microbial degradation of chitin waste for production of chitosanase and food related bioactive compounds. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 50, n. 2, p. 125-133, 2014.

STANLEY, S. A. Studies on the extraction of chitin and chitosan from different aquatic organisms. **Studies on the Extraction of Chitin and Chitosan from Different Aquatic Organisms**, v. 12, n. 12, p. 12-15, 2013.

STEPANOVIC, S.; DJUKIC, N.; OPAVSKI, N.; DJUKIC, S. Significance of inoculum size in biofilm formation by staphylococci. **New Microbiol.** v.26, p.129–132. 2003.

SUN, W.; SU, J.; XU, S.; YAN, D. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and antifungal susceptibility testing. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, n. 12, p. 1750-1757, 2012.

SVOBODA, A.; TRUJILLO-GONZALEZ, A. *Sporothrix schenckii*—a freeze-fracture study. **Journal of basic microbiology**, v. 30, n. 5, p. 371-378, 1990.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I.; SAWAI, J. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 485-491, 2008.

TAN, H.; PENG, Z.; LI, Q.; XU, X.; GUO, S.; TANG, T. The use of quaternised chitosan-loaded PMMA to inhibit biofilm formation and downregulate the virulence-associated gene expression of antibiotic-resistant staphylococcus. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 365–377, 2012.

TAN, Y.; LEONHARD, M.; MOSER, D.; MA, S.; SCHNEIDER-STICKLER, B. Inhibition of mixed fungal and bacterial biofilms on silicone by carboxymethyl chitosan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 193-199, 2016.

TARASZKIEWICZ, A.; FILA, G.; GRINHOLC, M.; NAKONIECZNA, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **BioMed research international**, v. 2013, 2012.

TENG, D. From chitin to chitosan. **Chitosan-based hydrogels: Functions and application**. Florida: CRC Press Boca Raton, 2011. p. 2-33.

TORABI, S.; MAHDAVIAN, A. R.; SANEI, M.; ABDOLLAHI, A. Chitosan and functionalized acrylic nanoparticles as the precursor of new generation of bio-based antibacterial films. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, p. 1–9, 2016.

TRAMPUZ, A.; ZIMMERLI, W. New strategies for the treatment of infections associated with prosthetic joints. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 6, n. 2, p. 185-190, 2005.

WADE, R. L.; CHAUDHARI, P.; NATOLI, J. L.; TAYLOR, R. J.; NATHANSON, B. H.; HORN, D. L. Nephrotoxicity and other adverse events among inpatients receiving liposomal amphotericin B or amphotericin B lipid complex **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 3, p. 361–367, 2013.

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 21–26, 2004.

- WANG, Y.; CHANG, Y.; YU, L.; ZHANG, C.; XU, X.; XUE, Y.; LI, Z.; XUE, C. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 90–97, 2013.
- WYSOKOWSKI, M.; PETRENKO, I.; STELLING, A. L.; STAWSKI, D.; JESIONOWSKI, T.; EHRLICH, H. Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics. **Polymers**, v. 7, n. 2, p. 235-265, 2015.
- YANG, T. C.; CHOU, C. C.; LI, C. F. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 237–245, 2005.
- YANG, T. L. Chitin-based materials in tissue engineering: applications in soft tissue and epithelial organ. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 3, p. 1936-1963, 2011.
- YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 260-268, 2008.
- YOMOTA, C.; MIYAZAKI, T.; OKADA, S. Determination of the viscometric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography. **Colloid and Polymer Science**, v. 271, n. 1, p. 76-82, 1993.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.
- YUAN, G.; LV, H.; TANG, W.; ZHANG, X.; SUN, H. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. **Food Control**, v. 59, p. 818–823, 2016.
- YUAN, Y.; CHESNUTT, B. M.; HAGGARD, W. O.; BUMGARDNER, J. D. Deacetylation of chitosan: Material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. **Materials**, v. 4, n. 8, p. 1399-1416, 2011.
- ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527–530, 2003.
- ZHONG, Z.; XING, R.; LIU, S.; WANG, L.; CAI, S.; LI, P. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 3, p. 566–570, 2008.