



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA
O-CARBOXIMETILQUITOSANA: AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida* sp.**

Charles Lima Ribeiro*

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves.

*Bolsista CAPES

ANÁPOLIS – GO

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

Charles Lima Ribeiro*

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA
O-CARBOXIMETILQUITOSANA: AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves.

Co-Orientadora: Prof^a.Dra. Roberta Signini.

*Bolsista CAPES

ANÁPOLIS – GO

2013

Ribeiro, Charles Lima.

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida* sp. – 2013.

80 folhas. 10 figuras.

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2013.

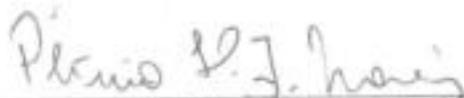
1. O-Carboximetilquitosana. 2. *Candida albicans*. 3. Biofilme.

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA:
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE
BIOFILME DE *Candida sp.***

CHARLES LIMA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves (UEG)



Prof. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde (UEG)



Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro (UFG)

ANÁPOLIS, GO – BRASIL

AGOSTO, 2013

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **2007-2010:** Licenciatura em Ciências Biológicas - Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica (ISE - Instituto Superior de Educação).
- **2010 – 2011:** Especialização em Tecnologias Aplicadas ao Ensino da Biologia - UFG – Universidade Federal de Goiás.
- **2011- 2013:** Mestrado em Ciências Moleculares - UEG- Universidade Estadual de Goiás (em andamento).

ATUAÇÃO EM PESQUISA

- **2009 – 2009: Iniciação Científica-** Aluno Voluntário.
Título: A visão dos graduandos de Ciências Biológicas sobre o papel do zoológico no ensino de biologia.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª.: Josana de Castro Peixoto.
- **2011- 2013:** Mestrado em Ciências Moleculares – Bolsista CAPES.
Título: Síntese e caracterização da *O*- Carboximetilquitosana: Avaliação da citotoxicidade e da formação de biofilme de *Candida* sp.
Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

- **2010:** TCC –Trabalho de Conclusão de Curso - Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica (ISE - Instituto Superior de Educação).
Título: Estudo de Caso: Nível Socioeconômico e conhecimento sobre coleta seletiva dos catadores de resíduos sólidos do bairro Jardim América, em Goiânia-GO.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª.: Sandra Ribeiro de Mbucais.
- **2011:** TCC –Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal de Goiás- UFG.
Título: Análise Textual: Arte é ciência, a tradução científica de letras escritas e interpretadas por Chico Buarque de Holanda.
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª.: Simone Maria Teixeira de Sabóia-Mbucais.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **2013:** V- Porto Saúde- Porto Seguro-BA.
- **2012:** VII Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação da UEG. Anápolis-GO.
- **2012:** I Workshop em Ciências Moleculares. UEG. Anápolis-GO.
- **2011:** VI Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação da UEG. Anápolis-GO.
- **2009:** Encontro das Escolas Estaduais de Tempo Integral. Goiânia-GO.
- **2009:** II Encontro Regional de Saúde e Prevenção nas Escolas. Brasília-GO.
- **2009:** Projeto: Biodiversidade e Conservação do Cerrado..Biodiversidade e Conservação do Cerrado. Anápolis-GO.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- **2007-2008:** Professor- Escola Municipal Raio de Luar-, Ouro Verde de Goiás-GO.
- **2008-2010:** Professor – Colégio Estadual Roque Romeu Ramos-, Ouro Verde de Goiás-GO.
- **2010-2010:** Professor - Colégio Estadual Rui Barbosa-, Campo Limpo de Goiás-GO.
- **2012 – 2013:** Professor- Faculdade Metropolitana de Anápolis- FAMA-, Anápolis-GO.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- RIBEIRO, C. L.; SABÓIA-MORAIS; SANTOS. Análise Textual: Arte é ciência, a tradução científica de letras escritas e interpretadas por Chico Buarque de Holanda. **Enciclopédia Biosfera**, vol. 7, p. 22-23, 2011.
- RIBEIRO,C.L.; SANTANA,D.P.; NAVES, P.L.F. **Modificações do Teste de Letalidade de *Artemia salina* LEACH. de Meyer (1982) ao longo do tempo.** In: VII Jornada Científica da UEG, 2012, Anápolis-GO.
- RIBEIRO, C.L.; SIGNINI, R.; NAVES, P.L.F. **Obtenção e Aplicações da Quitina, Quitosana e Carboximetilquitosana.** In: Solemar Oliveira (org.) Ciências Moleculares. 1º Ed. Anápolis: Pró-Reitoria de Pesquisa, vol.2, 2013.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por ter sempre renovado minhas esperanças e por ter me fortalecido em sua palavra e promessa quando o tempo era de luta, que em meio à tristeza e a desilusão demonstrou a mim Seu amor infinito que me renovou e me guiou até esse momento.

Aos meus pais Antonio Martins Ribeiro e Calma dos Reis de Lima Ribeiro que jamais permitiram que eu desistisse dos meus objetivos, que me amparam, me conduzem e me instruem com respeito e paciência. Ao meu irmão Henrique Lima Ribeiro por fazer parte dessa conquista! A minha quase irmã Kelly Regina Rodrigues por tudo!

Ao meu orientador Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves pela sua conduta extremamente ética e humana, pelos conselhos e incentivos que muito acrescentaram em minha carreira profissional e em minha vida.

À minha Co-orientadora Prof. Dr. Roberta Signini pela paciência e confiança em meu trabalho e em minha capacidade.

À Andrea Bukzem e ao Danilo Martins pelo apoio, pela atenção e pela disponibilidade, que Deus possa estar sempre os abençoando; muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Osvaldo Gomes Pinto, a Samara Salomão, Jéssica Cristina, Ecilme Félix e aos demais integrantes da equipe, muito obrigado pela amizade, pela colaboração e pela companhia de todos vocês.

Aos amigos do mestrado, a Luciene Mendes, o Wanderson, o Fernando, a Andressa Figueredo, a Jeane e aos demais que em muitos momentos me ajudaram e me apoiaram.

E a tantos outros que em meio a tantos momentos estiveram ao meu lado, me apoiaram, me incentivaram e fizeram parte desta conquista tão importante em minha vida. No mais, combati o bom combate!

[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito [...]
não somos o que deveríamos ser ,
mas somos o que iremos ser.
Mas graças a Deus, não somos o que éramos.

(Martin Luther King)

RESUMO

A *O*-Carboximetilquitosana é um derivado da quitosana, solúvel em um largo espectro de pH, e que possui um crescente interesse devido a sua utilização como veículo para fármacos insolúveis e a modulação celular em decorrência de sua biocompatibilidade, dentre outras propriedades. Estas propriedades possibilitam perspectivas futuras na utilização deste composto, principalmente nas áreas médicas, biomédicas e farmacêuticas. Por outro lado, o aumento da incidência de infecções por *Candida albicans* e por outras espécies de *Candida*, em parte devido a características inerentes as próprias leveduras tais como a resistência aos antifúngicos e a formação de biofilme, reforçam a necessidade de investigação de compostos que promovam a diminuição ou mesmo a inibição da capacidade de formação de biofilme. Identificou-se que durante a síntese de *O*-Carboximetilquitosana ocorreu um aumento da massa do composto e que durante a purificação ocorreu uma diminuição significativa da massa total purificada. O grau de substituição foi de $1,73 \pm 0,07$; o grau de solubilidade de $86,54 \pm 3,99$, como também uma solubilidade em ampla faixa de pH – sendo insolúvel apenas em uma faixa de 2,40 – 3,90. A *O*-Carboximetilquitosana não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas no presente estudo – $[]_{Máx.} = 50 \text{ mg/mL}^{-1}$. Identificou-se que no meio de cultura RPMI 1640 ocorreu a maior capacidade de formação de biofilme tanto de *Candida albicans* quanto de outras espécies de *Candida*, que todas as amostras testadas formaram biofilme em níveis variáveis e que as maiores formadoras foram as leveduras *Candida albicans* 34, *Candida albicans* 05 e *Candida parapsilosis* 38. A *O*-Carboximetilquitosana não inibiu a formação de biofilme das leveduras estudadas e aumentou a formação de biofilme em *Candida albicans* 12031 e *Candida albicans* 05 nas placas tratadas por um tempo de 24h.

Palavras- chave:

O-Carboximetilquitosana, *Candida albicans*, leveduras, biofilme.

ABSTRACT

O-Carboxymethyl chitosan is a derivative of chitosan, soluble in a wide range of pH and which has an increasing interest due to its use as a vehicle for insoluble drugs and modulating cell due to their biocompatibility, among other properties. These properties enable future perspectives on the use of this compound, especially in the medical, biomedical and pharmaceutical industries. On the other hand, increased the incidence of infections by *Candida albicans* and other *Candida* species, due in part to inherent characteristics of the yeasts themselves such as resistance to fungal and biofilm formation, underscore the need for investigation of compounds that promote decrease or inhibition of biofilm formation capacity. It was found that during the synthesis of *O*-Carboxymethyl chitosan there was an increase in mass of the compound, and that during the purification there was a significant decrease in the total weight purified. The degree of substitution was 1.73 ± 0.07 , the solubility of 86.54 ± 3.99 , but also a solubility in a wide pH range – only being insoluble in a range from 2.40 to 3.90. The *O*-Carboxymethyl chitosan showed no cytotoxicity at concentrations evaluated in this study – $[]_{\text{Máx}} = 50 \text{ mg} / \text{mL}^{-1}$. It was found that the RPMI 1640 culture is the greatest ability to form biofilm of *Candida albicans* and in other *Candida* species, which all samples tested biofilms formed in varying degrees and that higher forming the yeast *Candida albicans* 34, *Candida albicans* 05 and *Candida parapsilosis* 38. *O*-Carboxymethyl chitosan not inhibit biofilm formation of yeasts studied and increased biofilm formation in *Candida albicans*12031 and *Candida albicans* 05 plates treated for 24 hours.

Key-word:

O-Carboxymethyl chitosan, *Candida albicans*, yeast, biofilm.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LLSTA DE TABELAS.....	XI
LISTADE FIGURAS.....	XII
LISTA DE GRÁFICOS	XIII
1. INTRODUÇÃO	166
2. OBJETIVOS.....	188
2.1 OBJETIVO GERAL.....	188
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	188
3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	199
3.1 QUITINA E QUITOSANA	199
3.2 CARBOXIMETILQUITOSANA	221
3.3 O-CARBOXIMETILQUITOSANA.....	233
3.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE COM <i>Artemia salina</i> LEACH.	244
3.5 <i>Candida</i> sp.....	255
3.5.1 <i>Candida albicans</i>	266
3.5.2 Outras espécies de <i>Candida</i>	277
3.6 BIOFILMES.....	299
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 PREPARAÇÃO DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA	31
4.2 PURIFICAÇÃO DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA.....	31
4.3 CARACTERIZAÇÃO DE O-CARBOXIMETILQUITOSANA.....	322
4.3.1 GRAU DE SUBSTITUIÇÃO.....	322
4.3.2- GRAU DE SOLUBILIDADE.....	332
4.3.3- SOLUBILIDADE DA O-CMQT EM DIFERENTES FAIXAS DE pH.....	333
4.3.4- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	344
4.4 ENSAIO DE LETALIDADE COM <i>Artemia salina</i> LEACH.....	344
4.5 ENSAIO PARA A FORMAÇÃO DE BIOFILME	366
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>Candida albicans</i> E OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	37

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	388
5.1	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA <i>O</i> -CMQT	388
5.2	GRAU DE SUBSTITUIÇÃO	388
5.3	GRAU DE SOLUBILIDADE	40
5.4	SOLUBILIDADE DA <i>O</i> -CMQT EM DIFERENTES FAIXAS DE PH	40
5.5	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	41
5.6	ESTUDO DA TOXICIDADE DE <i>O</i> -CMQT PELO TESTE DE LETALIDADE DE <i>Artemia salina</i> LEACH.	422
5.7	FORMAÇÃO DE BIOFILME	444
5.7.1	DENSIDADES ÓPTICAS – CRISTAL VIOLETA	444
5.8	CATEGORIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME	455
5.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA <i>O</i> -CARBOXIMETILQUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>Candida albicans</i> E OUTRAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> .	49
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8	ANEXOS	65

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>O-CMQT</i>	<i>O</i> -Carboximetilquitosana
$\overline{\text{GS}}$	Grau de Substituição
OH	Hidroxila
CH₂COO⁻	Carboximetil
DL₅₀	Dose letal para 50% de indivíduos de uma determinada população
CSD	Caldo Sabouraud dextrose
SA	Saliva Artificial
DO	Densidade Óptica

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Médias e desvios padrão das densidades ópticas ($DO_{630\text{ nm}}$) de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) e dos Poços Controle (PC) não inoculados. * Cepas *Candida albicans* ATCC 12031 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.....**44**
- Tabela 2:** Médias e desvios padrão das densidades ópticas ($DO_{492\text{ nm}}$) de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) e dos Poços Controle (PC) não inoculados. * Cepas *Candida albicans* ATCC 12031 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.....**44**
- Tabela 3:** Classificação semi-quantitativa capacidade de formação de biofilme em quatro categorias utilizando três fórmulas. FB_1 e FB_2 : Formação de Biofilme. FEB: Formação Específica de Biofilme. DO_{1a} : $DO_{492\text{ nm}}$ das leveduras aderidas. DO_c : $DO_{492\text{ nm}}$ dos poços com o meio de cultura não inoculado. DO_{CT} : $DO_{630\text{ nm}}$ do crescimento das leveduras no meio de cultura.....**45**
- Tabela 4:** Comparação da capacidade de formação de biofilme calculada com três fórmulas distintas – tabela 3 -, nos meios RPMI 1640, saliva artificial (SA) e caldo Sabouraud dextrose (CSD).* Cepas ATCC. FB_1 e FB_2 : Formação de Biofilme. FEB: Formação Específica de Biofilme. DO_{1a} : $DO_{492\text{ nm}}$ das leveduras aderidas. DO_c : $DO_{492\text{ nm}}$ dos poços com o meio de cultura não inoculado. DO_{CT} : $DO_{630\text{ nm}}$ do crescimento das leveduras no meio de cultura.....**46**
- Tabela 5:** Índice de Formação de Biofilme por *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) em poços pré-tratados com O-CMQT em 1h e 24h. * Cepas ATCC 12031e 22019. Pcn: Poços controle negativo. PC_{1h} : Poços controle tratamentos de 1h e 24h com O-CMQT, respectivamente.
[£] = Diferença significativa entre os tratamentos e os controles não tratados ($p \leq 0,05$).
[§] = Diferença significativa entre os tratamentos de 1h e 24h ($p \leq 0,05$).....**49**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura primária da quitina, onde n é o grau de polimerização.....	19
Figura 2:	Estrutura química da quitosana, onde n é o grau de polimerização.....	20
Figura 3:	Carboxilação e carboxilação da quitosana em meios e reagentes diferentes, com seus respectivos produtos (Adaptado: MOURYA <i>et al.</i> , 2010).....	22
Figura 4:	Estrutura química monomérica da <i>O</i> -CMQT.....	23
Figura 5:	Etapas de formação de biofilme microbiano (Adaptado: CAPELLETTI, 2006).....	29
Figura 6:	Preparação de <i>O</i> -CMQT.....	32
Figura 7:	Esquema do ensaio de letalidade de <i>Artemia salina</i> LEACH.....	35
Figura 8:	Esquema dos ensaios para a formação de biofilmes nos meios de cultura: saliva artificial, caldo Sabouraud dextrose (CSD) e RPMI 1640.....	36
Figura 9:	Faixas de solubilidade (■) e insolubilidade (□) da <i>O</i> -CMQT em diferentes faixas de pH.....	41
Figura 10:	A- Placa microtiter em que se realizou o teste de letalidade de <i>Artemia salina</i> LEACH. em microdiluição. B- Espécime de <i>Artemia salina</i> LEACH., metanáuplio, visualizada em microscópio estereoscópio binocular óptico – Bel Photonics; 10x \approx 160x.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Curva de titulação potenciométrica de <i>O</i> -CMQT.....	39
Gráfico 2:	Solubilidade de <i>O</i> -CMQT em diferentes faixas de pH.....	41
Gráfico 3:	Espectro de infravermelho da quitosana e <i>O</i> carboximetilquitosana.....	42
Gráfico 4:	Formação específica de biofilme de <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Candida tropicalis</i> (Ct) e <i>Candida parapsilosis</i> (Cp), no meio RPMI 1640.....	47
Gráfico 5:	Gráfico de formação específica de biofilme de leveduras de <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Candida tropicalis</i> (Ct) e <i>Candida parapsilosis</i> (Cp), no meio caldo Sabouraud dextrose.....	48
Gráfico 6:	Formação Específica de Biofilme de <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Candida tropicalis</i> (Ct) e <i>Candida parapsilosis</i> (Cp), no meio Saliva Artificial.....	48
Gráfico 7:	Formação de Biofilme de <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>Candida tropicalis</i> (Ct) e <i>Candida parapsilosis</i> (Cp), em placas pré-tratadas com <i>O</i> -CMQT em um intervalo de tempo de 1h e 24h.....	50

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de inovadoras ferramentas terapêuticas com atividades farmacológicas complementares ao arsenal disponível de antimicrobianos convencionais está se tornando cada vez mais relevante. Dentre as novas abordagens encontra-se a investigação da ação antimicrobiana e inibitória da expressão de fatores de virulência, como a evolução dos fenótipos e a resistência a substâncias clássicas (BROWN; PALMER; WHITELEY, 2008; CEGELSKI *et al.*, 2008; SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009).

Na década de 40 do século XX descobriu-se os primeiros agentes antimicrobianos eficazes, nessa época os índices de mortalidade por doenças infecciosas apresentavam níveis críticos (CAIERÃO *et al.*, 2004). Já no início da década de 80 do século XX identificou-se uma emergência das infecções fúngicas hospitalares e as leveduras do gênero *Candida* eram os principais agentes desse cenário que provocou sérios problemas de saúde e epidemiologia (VARO *et al.*, 2007; VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009). Em estudo realizado na América Latina no ano de 2006, identificou uma substancial morbi-mortalidade de candidemia no Brasil e tais dados apresentam diferenças geográficas nas taxas de incidência, ressaltando assim a necessidade de um monitoramento das tendências (COLOMBO *et al.*, 2006).

As infecções provocadas por micro-organismos associados a biofilmes possuem maior resistência antimicrobiana e remoção de superfícies bióticas e abióticas, pressupondo a busca por terapias para tal finalidade que sejam mais eficazes e duradouras (KATRAGKOU *et al.*, 2008). A colonização por leveduras do gênero *Candida* e a subsequente capacidade de atuar como agente infeccioso é proporcionada por uma combinação de interações inespecíficas e específicas, permitindo assim que as células leveduriformes consigam uma adesão mais eficiente a diversas superfícies (HENNING; PERRONE, 2001; GALLARDO-MORENO *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2011). *Candida* sp. é considerada como a terceira causa mais comumente identificada em sepse tardias em centro de terapias intensivas e esse gênero faz parte da microbiota autóctone da boca de cerca de 30 a 70% do total de indivíduos hígidos (TEIXEIRA; MEZZARI, 2005; GONDIM *et al.*, 2009).

As infecções provocadas por *Candida* envolvem um amplo espectro de doenças superficiais e invasivas acometendo principalmente indivíduos que estão expostos a uma diversidade considerável de fatores de risco, como a imunodepressão (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). E há alguns anos atrás *Candida albicans* caracterizava como a espécie de maior interesse clínico, no entanto, vêm se evidenciando em caráter emergencial um

aumento acentuado de candidemias provocadas por outras espécies de *Candida* e nestas os biofilmes, caracterizam-se como o principal fator de virulência (TAMURA *et al.*, 2007). No entanto, ainda se conhece pouco sobre os biofilmes fúngicos, principalmente na gênese de infecções e resistência a antimicrobianos (KUHNS *et al.*, 2002; COSTA; CANDIDO, 2009).

Os estudos do controle da expressão de fatores de resistência dos micro-organismos, como a formação de biofilmes, objetivam desenvolver substâncias com capacidade de inibição da formação de biofilme atuando em estágios primários inespecíficos que ocorrem entre os micro-organismos e a superfície de contato, ou mesmo uma ação no biofilme já formado, agindo nas diferentes fases de desenvolvimento do biofilme e na diferenciação das células microbianas imobilizadas.

Assim a procura por novas substâncias com tais características constitui-se numa área de interesse para diversos campos do conhecimento, principalmente para a farmácia, a medicina e a biomedicina.

A *O*-carboximetilquitosana é um biopolímero obtido através da reação de carboximetilação da quitosana. Suas propriedades como biocompatibilidade, mucoadesividade, capacidade de perturbação da membrana celular, modulação celular e solubilidade em uma ampla faixa de pH, reforçam o crescente interesse nesta substância (ZHU *et al.*, 2005; LAMAS, 2006; ZHU; ZHAO; FANG, 2006; GUO *et al.*, 2006; YIN *et al.*; 2007). Essa amplitude de solubilidade impulsiona a utilização desse biopolímero, principalmente na área farmacêutica, dando a oportunidade de possíveis e interessantes utilizações na microbiologia, como as avaliadas no presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade da *O*-carboximetilquitosana contra a formação de biofilme de *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar a *O*-carboximetilquitosana.
- Avaliar a toxicidade da *O*-carboximetilquitosana pelo método de letalidade de *Artemia salina*.
- Verificar a capacidade de formação de biofilme de *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*.
- Descrever a atividade da *O*-carboximetilquitosana na formação de biofilmes de *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

3.1 QUITINA E QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, sua prevalência é superada apenas pela celulose (SANTOS; CIRILO; NUNES, 2011), este carboidrato foi isolado pela primeira vez no ano de 1811 através de estudos realizados com fungos; logo em 1823 identificou a presença de tal polímero nas carapaças de insetos e deduziu-se sua presença nos demais animais invertebrados (VELÁSQUEZ; 2003). A quitina está associada a proteínas, materiais inorgânicos, pigmentos e lipídios, por isso para isolá-la utilizam-se alguns métodos que compreendem a desproteinização, a desmineralização e a despigmentação (ANTONINO, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*; 2007). Tal biopolímero é constituído por uma sequência de monômeros de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, estando unidos por ligações glicosídicas β no sentido $1 \rightarrow 4$ – ocorrendo o predomínio da porção 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose-; sendo insolúvel em água, ácido diluído e álcalis e apresentando características de sólido cristalino (MOURA *et al.*, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*; 2007; RAMIREZ *et al.*, 2011) (**Figura 1**). A quitina possui cadeia linear e três estruturas polimórficas diferentes: α , β e γ que se diferenciam basicamente devido suas disposições nas lamelas que formam o polímero (ANTONINO, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

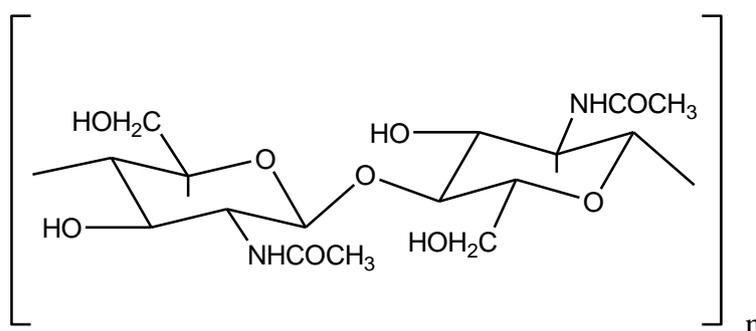


Figura 1: Estrutura primária da quitina, onde n é o grau de polimerização.

E através do processo de desacetilação parcial em meio alcalino a quitina transforma-se em quitosana; um polímero constituído basicamente por uma sequência de copolímeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, em uma quantidade variando de 50-60% do

total da biomassa do polímero (VELASQUÉZ, 2003; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2010) (**Figura 2**).

A quitosana também pode ser encontrada na natureza, em espécies de fungos do gênero *Mucor* como também em demais *Zygomycetes* (ROBERTS, 1992; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2007). Esta substância foi descoberta a cerca de 150 anos (MUZZARELLI, 1998; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). No entanto, suas propriedades só vêm sendo empregadas e utilizadas pela indústria e em aplicações tecnológicas e biotecnológicas a cerca de 70 anos (AZEVEDO *et al.*, 2007). Cada vez mais a quitosana está se destacando em diversas áreas como medicina e biomedicina devido ao fato de ser preparada a partir de matérias-primas renováveis e relativamente baratas, como rejeitos da indústria pesqueira; e também por suas propriedades tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e interação com diferentes tipos de substâncias (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005), fato que permite sua aplicação em biotecnologia, farmácia, indústria de alimentos, cosméticos, medicina, biomedicina, odontologia, agricultura e no tratamento de água (HERNÁNDEZ, 2004; CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007; GOMES *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2010).

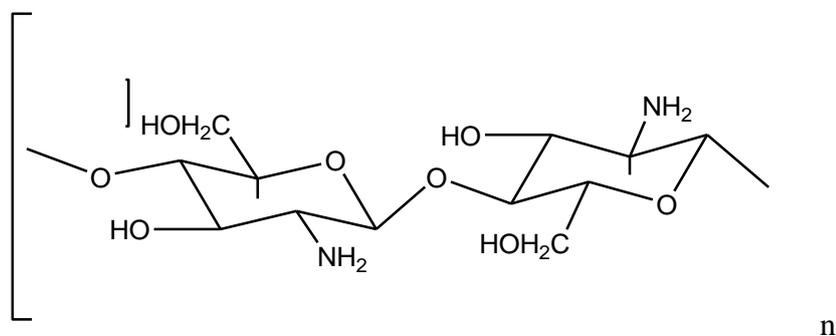


Figura 2: Estrutura química da quitosana, onde n é o grau de polimerização.

A quitosana possui bioatividade e dentre elas inclui-se a ação antimicrobiana, efeitos coagulante, analgésico, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, quelante, atuando efetivamente na aceleração da cicatrização e no funcionamento celular, com atividades antioxidantes e inibitórias da apoptose e redução da massa corporal (MOURYA; INAMDAR; TIWARI, 2010; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SEVERINO; VASCONCELLOS; FIGUEIREDO, 2007); porventura tais propriedades assim como sua solubilidade está relacionada ao grau médio de cargas do polímero e sua consequente distribuição ao longo das cadeias poliméricas (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

Sua capacidade de ação antimicrobiana em micro-organismos como, por exemplo, *Listeria ivanovii* (SEVERINO *et al.*, 2007; HÉQUET *et al.*, 2011), *Cryptococcus neoformans* (MARTINEZ *et al.*, 2010), *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* (TANG *et al.*, 2010), torna a quitosana mais evidente principalmente pela medicina e farmácia (SEVERINO *et al.*, 2007). Tal ação antimicrobiana pode ser explicada devido à presença de grupos amínicos que por sua vez quando em contato com os fluídos fisiológicos, são protonados, ligando-se a grupos aniônicos presentes nos micro-organismos e desencadeando a aglutinação das células microbianas e conseqüentemente inibindo o crescimento e formação de colônias. No entanto, tal propriedade pode estar relacionada às características físico-químicas do polímero e características específicas da membrana de certos micro-organismos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Não obstante, a quitosana possui alguns fatores que limitam sua utilização em algumas aplicações como, por exemplo, o fato de possuir solubilidade em meio ácido e insolubilidade em meio neutro ou alcalino, devido aos grupos amino se apresentarem como ácidos fracos ($pK_a \approx 6,5-7,0$); portanto faz-se necessário realizar modificações químicas na estrutura química da quitosana, através de processos de carboxilação, por exemplo, a fim de produzir derivados que possuam um espectro mais amplo de utilizações e com propriedades ampliadas. Tais processos podem introduzir novos grupos funcionais nas sequências monoméricas, basicamente nas repetidas unidades dos grupos hidroxila e amino (CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007). E dentre os derivados de quitosana solúveis em ampla faixa de pH, encontra-se a N-succinilquitosana, a N-carboximetilquitosana, a N-carboxibutilquitosana e a O-carboximetilquitosana, por exemplo (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

3.2 CARBOXIMETILQUITOSANA

A carboximetilquitosana é um derivado de quitosana que é considerado o mais interessante, devido a sua capacidade de dissolução em água e em uma ampla faixa de pH, tais propriedades são exemplos da introdução de novas e importantes propriedades aos polímeros através da reação de carboximetilação da quitosana (CHEN *et al.*, 2002; CHEN; DU; ZENG, 2003; CHEN; PARK, 2003; ZHAO *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2006); conferindo por exemplo, capacidade de adsorção e /ou seletividade a Cd (II) (LEITE *et al.*, 2005) e otimização da ação antifúngica (GUO *et al.*, 2006). Não obstante, amplia-se também sua utilização em diferentes ramos como nas áreas médicas e farmacêuticas, devido suas

propriedades de ação em meios neutros. Tais características são encontradas em derivados carboxilados, mas também em sais de amônio quartenário e em derivados N-alkilados e N-acilados (ROBERTS, 1992).

A carboximetilação de quitosana leva à produção de derivados O-, N- ou N,O-substituídos, sendo que a dissustituição nos grupos amino também podem ocorrer, gerando derivados N,N-substituídos (RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993; DUNG; MILAS; DESBRIÈRES, 1994; MUZZARELLI, 1998; ZHAO.; WANG, Z.; WANG,N.S., 2002), sendo estes os únicos derivados da quitosana que apresentam tanto grupos – COOH quanto grupos –NH₂ (CHEN; PARK, 2003) (**Figura 3**).

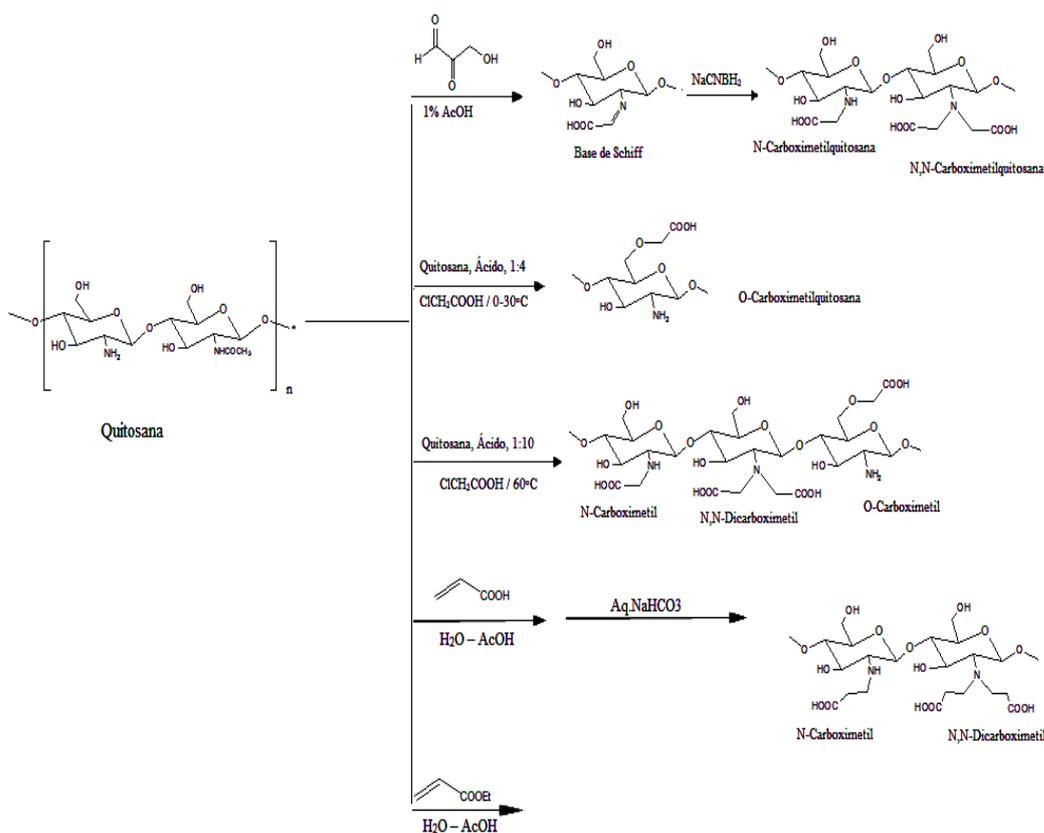


Figura 3: Carboxilação e carboxilação da quitosana em meios e reagentes diferentes, com seus respectivos produtos (Adaptado: MOURYA *et al.*, 2010).

A carboximetilquitosana apresenta estabilidade térmica, a cerca de 250°C aproximadamente, fato que permite sua termoesterelização sem alterar suas propriedades físico-químicas (DAROZ *et al.*, 2008); além de um ponto isoelétrico igual a 4 (RAMOS *et al.*, 2005). Também é um polímero polieletrólito que possui uma equivalência de cerca de 3% e

4% para grupos amínicos e carboxílicos, além de um pK_a igual a 3,2 e uma rotação óptica específica igual a 0,735 (MONAGAS, 2000; RAMOS *et al.*, 2005).

A escolha adequada das condições e dos reagentes a serem empregados nas derivatizações permite a obtenção de derivados N-, O-, ou N-O-substituídos (CAMPANA-FILHO; DESBRIÈRES, 2000; KURITA, 2000; CHEN *et al.*, 2002), pois a carboximetilação da quitosana pode ocorrer em dois sítios reativos: quando o sítio reativo for o agrupamento amínico obtém-se a *N*-carboximetilquitosana e quando o sítio reativo for o agrupamento hidroxila obter-se-á a *O*-carboximetilquitosana (CERRUTTI, 2010) (**Figura 4**).

As características mais frequentemente avaliadas nos produtos resultantes das diferentes reações de carboximetilação são o grau médio de acetilação, o grau médio de substituição, a massa molar, a cristalinidade, a solubilidade, o teor de cinzas, o grau de umidade, cujas importâncias relativas serão dependentes de qual uso terá a amostra considerada (NETO *et al.*, 2008), como a observância da massa molar assim como da variação da viscosidade, por serem fatores que interferem na atividade biológica dos polímeros e nas características inerentes aos polieletrólitos (MONAGAS, 2000).

3.3 O-CARBOXIMETILQUITOSANA

A *O*-carboximetilação da quitosana, é geralmente obtida por reação do polímero com ácido monocloroacético em suspensão de isopropanol / solução aquosa de hidróxido de sódio à temperatura ambiente (ABREU, 2002; ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005), proporcionando principalmente uma substituição dos agrupamentos *O*-hidroxil por grupos carboximetil, através da formação de ligação de éter nas cadeias monoméricas (CAI *et al.*, 2001), sendo o meio reacional fortemente alcalino, para a ativação das hidroxilas (CERRUTI, 2010) (**Figura 4**).

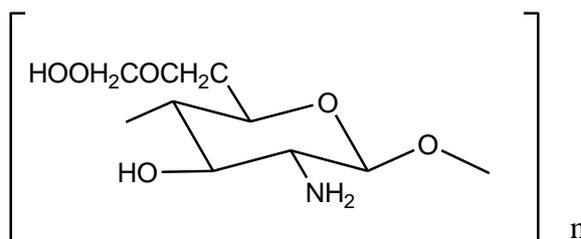


Figura 4: Estrutura química monomérica da *O*-Carboximetilquitosana.

Tal reação produz principalmente a *O*-Carboximetilquitosana, um biopolímero anfifílico utilizado na perturbação da membrana plasmática (ZHU; FANG *et al.*, 2005), como sistema de entrega de drogas, principalmente drogas antibióticas (ZHU; CHAN-PARK *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2007) e como um biomaterial que medeia os processos morfológicos das células (ZHU; ZHAO; FANG, 2006). Dentre suas propriedades a que mais chama a atenção das áreas biomédicas é a biocompatibilidade (ZHU; CHAN-PARK *et al.*, 2005; ZHU; ZHAO; FANG, 2006); não apresenta toxicidade e ação antimicrobiana sobre a membrana bacteriana ou inibição da parede fúngica (MARTINS, 2010).

3.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE COM *Artemia salina* LEACH.

Artemia salina é um microcrustáceo do Filo *Artrópoda*, da Classe *Crustacea*, da Subclasse *Braquiopoda*, da Ordem *Anostraca* e da Família *Artemiidae*, que vive em água salgada e serve como alimento vivo para peixes (SORGELLOOS *et al.*, 1986; NASCIMENTO *et al.*, 2008). Seu ciclo de vida compreende os estágios de cisto, náuplios, metanáuplios, pré-adultos e adultos, onde os náuplios são fotossensíveis - estes possuem cerca de 450 µm de comprimento quando são recém-eclodidos (IGARASHI, 2008). Tal microcrustáceo é extensamente utilizado em experimentos em várias pesquisas em biologia celular, ecologia, toxicologia, fisiologia e genética (CORRÊA; PENAFORT, 2011).

O ensaio de letalidade com *Artemia salina* L. é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar da toxicidade de compostos naturais; e quando se busca uma validação farmacológica tanto de compostos naturais quanto de moléculas modificadas, os bioensaios preliminares, assim como o citado, são os primeiros testes a serem realizados diante da procura por novos fármacos (PARRA *et al.*, 2001; CARBALLO *et al.*, 2002; RAHMAM *et al.*, 2005). Sua ampla utilização deve-se primariamente ao fato de ser um teste simples, rápido e de baixo custo (PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005; LUNA *et al.*, 2005), por isso está se tornando um ensaio rotineiramente utilizado nos laboratórios de bioensaios, há cerca de 25 anos (LUNA *et al.*, 2005; MOLINA-SALINA; SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

O teste de letalidade com *Artemia salina* L. foi primeiramente proposto em 1956, por Michael, Thompson e Abramovitz e aprimorado em 1981 por Vanhaeche e colaboradores (LHULLIER *et al.*, 2006). No entanto, seu reconhecimento como teste preliminar para

validação toxicológica veio com Meyer em 1982, quando avaliou a toxicidade de extratos brutos de plantas da família *Euphorbiaceae* (PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

A partir dos trabalhos pioneiros, inúmeras modificações vêm sendo propostas nesta técnica, no sentido de aprimorá-la ou adequá-la às condições laboratoriais disponíveis. Dentre as modificações mais frequentes, encontra-se a utilização de ensaios em microplacas - microdiluição- em vez de tubos -macrodiluição (SOLLIS *et al.*, 1993).

Esta técnica tem sido utilizada diante de sua boa correlação de toxicidade diante de distintas atividades biológicas, tais como: antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral e tripanossomicida (PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005) além da avaliação da citotoxicidade de uma gama bastante diversa de compostos naturais, como os extratos de *Eugenia umbelliflora* BERG. (MACHADO, 2005), *Syzygium aromaticum* (RABÊLO, 2010) tribu *Pipereae* (SÁNCHEZ *et al.*, 2011), Família *Meliaceae* (PISUTTHANAN *et al.*, 2004), em macroalgas bênticas (LHULLIER *et al.*, 2006), em compostos sintéticos, como por exemplo a 1,3,5-triazinas (CAVALCANTE *et al.*, 2000).

3.5 *Candida* sp.

As leveduras do gênero *Candida* são micro-organismos oportunistas comensais, presentes na microbiota sapróbia da cavidade bucal, trato gastrointestinal e urogenital de seres humanos sem, contudo, ocasionar processos patológicos quando se mantém em relações homeostáticas (SUZUKI, 2009; MATOS *et al.*, 2009). Este gênero abrange cerca de 200 espécies, que estão distribuídas taxonomicamente no Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina* ou *Ascomycotina*, Classe *Blastomycetes* e Família *Cryptococcaceae* (MALUCHE; SANTOS, 2008; RIBEIRO, 2008).

São micro-organismos eucarióticos desprovidos de pigmentos fotossintetizantes, com parede celular constituída basicamente por quitina; nutrindo-se através de fontes de carbono que são absorvidas do ambiente onde se encontram (AGUIAR, 2007). E dentre os isolados de *Candida* sp. encontra-se a espécie *Candida albicans* com uma prevalência de 60% a 90%, *Candida tropicalis* em cerca de 7%, e demais espécies como *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são evidenciadas com uma frequência menor em comparação à *C. albicans* e *C. tropicalis* (LACAZ, 1980; HENNING; PERRONE, 2001; URIZAR, 2002; MARTINS *et al.*; 2002; RIBEIRO, 2002; SCHERMA *et al.*, 2004).

Dentre as espécies que fazem parte do gênero *Candida*, somente 10% são reconhecidas como agentes etiológicos de infecções humanas (VALLE; RENDE; OKURA,

2010) e tal prevalência vem se evidenciando em prontuários epidemiológicos no decorrer do século XX (OLIVEIRA *et al.*, 2001). E dentre essa margem *Candida albicans* configura-se como um dos relevantes patógenos fúngicos causadores de infecções nosocomiais (SUZUKI, 2009; MATOS *et al.*, 2009) e de isolados de infecções bucais (MARSH; MARTIN, 2005).

3.5.1 *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura comensal encontrada na mucosa bucal, trato gastrointestinal, trato urogenital e na pele de seres humanos, desde o seu nascimento (MARTINS *et al.*, 2002; GONDIM *et al.*, 2009; SUZUKI, 2009; VALLE; RENDE; OKURA, 2010). Está amplamente distribuída na natureza ocupando diversos habitats (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007), no entanto, é a espécie de maior relevância em função de sua incidência em hospedeiros hígidos e imunocomprometidos. A imunodepressão ocasionada pela ruptura de fatores patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos, provoca um aumento na multiplicação e na invasão destes micro-organismos nos tecidos, provocando assim infecções denominadas de candidíases (MARTINS *et al.*, 2002; SUZUKI, 2009; VALLE; RENDE; OKURA, 2010).

Portanto, a relação de equilíbrio entre *Candida* e hospedeiro sem ocasionar sinais de doenças em condições fisiológicas orgânicas é propiciada pela manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota sapróbia e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo leveduriforme, permanência equilibrada na capacidade de aderência e na produção de enzimas e toxinas (CALDERONE; FONZIWA, 2001; VIEIRA *et al.*, 2005).

Este fungo possui morfologia colonial úmida, cremosa e de odor específico, de aspecto liso ou rugoso, com coloração branco-amarelada quando em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose, com formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa; quando tais leveduras são analisadas isoladamente, apresentam formato esférico, ovóide ou alongado, medindo cerca de 3µm a 5µm de diâmetro, e Gram-positivas quando expostas à coloração de Gram. Apesar, seu crescimento é favorecido por uma temperatura entre 20°C a 38°C e um pH compreendido em uma faixa de 2,5 a 7,5 (BARBIERI, 2005; ANDRADE, 2006; RIBEIRO, 2008). Suas células possuem parede celular composta por cerca de 80 a 90% de carboidratos, com polissacarídeos de glicose com ramificações e ligações β- 1,4 e β- 1,3, moléculas de N-acetil-D-glicosamina com ligações β-

1,4, polímeros de manose ligados covalentemente as manoproteínas, cerca de 6 a 25% de proteínas e certa quantidade de lipídeos (CHAFFIN, 1998).

Candida albicans expressa alguns fatores de virulência que proporcionam uma eficiência no desenvolvimento de infecções localizadas em mucosas onde tais fungos estão aderidos ou infecções sistêmicas dependendo do estágio e da natureza de resposta quanto ao processo infeccioso no hospedeiro. E perante a tais características que proporcionam uma maior virulência, incluem a capacidade de aderência, o polimorfismo, a variabilidade fenotípica, a produção de enzimas extracelulares e toxinas (RIBEIRO, 2008) que são determinados por diversos genes que possuem influencia direta na determinação da patogenicidade (KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009). Sendo um dos mais importantes fatores de virulência desta espécie a habilidade em formar biofilmes (HENRIQUES; AZEREDO; OLIVEIRA, 2005).

E além do mecanismo de formação de biofilmes que *Candida albicans* apresenta, este fungo também secreta proteinases e fosfolipases (LIMA *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2010) capazes de degradar, destruir ou transformar constituintes que fazem parte da membrana celular do hospedeiro, induzindo assim a disfunção e / ou destruição física no órgão ou superfície; apresentando dimorfismo com variação da parede do antígeno e *switching*, por exemplo (SANTANA *et al.*, 2010).

Perante a problemática que se depara frente às casuísticas provocadas por *Candida albicans*, identifica-se que a incidência de candidemias aumenta em portadores de câncer, em indivíduos que são submetidos a transplante de órgãos ou procedimentos cirúrgicos bastantes invasivos, crianças prematuras, pacientes sob terapia intensiva com falência de órgãos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003) e imunocomprometidos (GONDIM *et al.*, 2009).

3.5.2 Outras espécies de *Candida*

As outras espécies de *Candida* surgem no cenário clínico como patógenos que não apenas possuem capacidade colonizadora como também são responsáveis por graves infecções. O gênero *Candida* apresentada, há cerca de quase 30 anos ganha acentuada atenção pela particular capacidade de provocar infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo estas espécies de *Candida* responsáveis por cerca de 63% do total de episódios de candidemia (COLOMBO *et al.*, 1999; VIDIGAL; SVIDZINSKI, 2009).

E dentre este grupo *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* são consideradas os patógenos que vem exigindo maior estudo e atenção (MEDRANO *et al.*, 2006).

Candida tropicalis é o segundo agente mais comumente isolado de amostras obtidas nos hospitais brasileiros ficando atrás apenas de *Candida albicans*, está intimamente relacionada com casos de candidemia nosocomial e candidúria, no entanto, pode ser encontrada ocasionalmente como micro-organismo comensal, com pouca capacidade de tigmotropismo – quando comparada a capacidade apresentada por *Candida albicans* (NIKAWA *et al.*, 1997; BARCHIESI *et al.*, 2000; BIZERRA *et al.*, 2008). Possui capacidade patogênica em infecções invasivas e superficiais, estando associada à elevada incidência de morbi-mortalidade (DORNELAS-RIBEIRO *et al.*, 2012; MAGRI, 2012). É uma levedura diplóide, que está intimamente relacionada com a alta capacidade de formação de biofilmes em cateteres urinários, e tem sido relatada como a espécie do gênero *Candida* que possui uma capacidade maior em provocar infecções da corrente sanguínea e do trato gastrointestinal em indivíduos hospitalizados (DESNOS-OLIVIER *et al.*, 2008; NEGRI *et al.*, 2010; NEGRI *et al.*, 2012). O principal componente de sua matriz extracelular é a hexosamina -cerca de 27%-; essa estrutura que confere significativa resistência às drogas no biofilme formado (AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006). Os biofilmes de *Candida tropicalis* apresentam atividade hemolítica total (NEGRI *et al.*, 2010).

Candida parapsilosis é uma levedura com capacidade patogênica, que provoca sérias infecções no ser humano, principalmente em recém-nascidos, crianças e imunodeprimidos sob terapia intensiva, estando associada principalmente às infecções nosocomiais (JÚNIOR, 1987; LEVY *et al.*, 1998; GÁCSER *et al.*, 2007). Esta espécie é consituída por três sub-espécies genomicamente recém designadas que são praticamente morfologicamente indistinguíveis, que são: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthoparapsilosis* e *Candida metapsilosis* (ASBECK *et al.*; 2008). Diante dessa diferença genômica identifica-se que poucos estudos fazem distinção entre esses diferentes micro-organismos, fato tal que essa diferença pode suscitar atenção maior diante da susceptibilidade quanto às escolhas terapêuticas (BERNARDIS, 1999; ASBECK *et al.*; 2008; TROFA *et al.*, 2008). A incidência de doenças invasivas provocadas por *Candida parapsilosis* possui variação geográfica e está intimamente relacionada com o estado clínico de cada paciente tendo essas características relação sobre a susceptibilidade a agentes antifúngicos como fluconazol e voriconazol (SARVIKIVI *et al.*, 2005; MEDRANO *et al.*, 2006; PFALLER *et al.*, 2008). Possui acentuada morbi-mortalidade, cerca de 0,4 mortes por 100.000 habitantes e

sua transmissão é horizontal dada também por colonização prévia de dispositivos invasivos, de nutrição parenteral, soluções diversas e cateteres (JÚNIOR, 1987; LASKER *et al.*, 2006; TROFA *et al.*, 2008).

3.6 BIOFILMES

O potencial de virulência ou patogenicidade de um determinado micro-organismo como *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, em conjunto inclui a capacidade de aderir, infectar e causar doença. Estes fatores são determinados geneticamente, mas são expressos pelos micro-organismos quando submetidos a certas condições específicas (TAMURA *et al.*, 2007). A aderência das células do hospedeiro a uma superfície constitui o primeiro passo para uma colonização primária e posteriormente à formação de biofilmes (NOUMI *et al.*, 2010); e a hidrofobicidade da superfície celular mesmo sendo uma característica variável está diretamente relacionada com a aderência e formação do biofilme (BLANCO *et al.*, 2010).

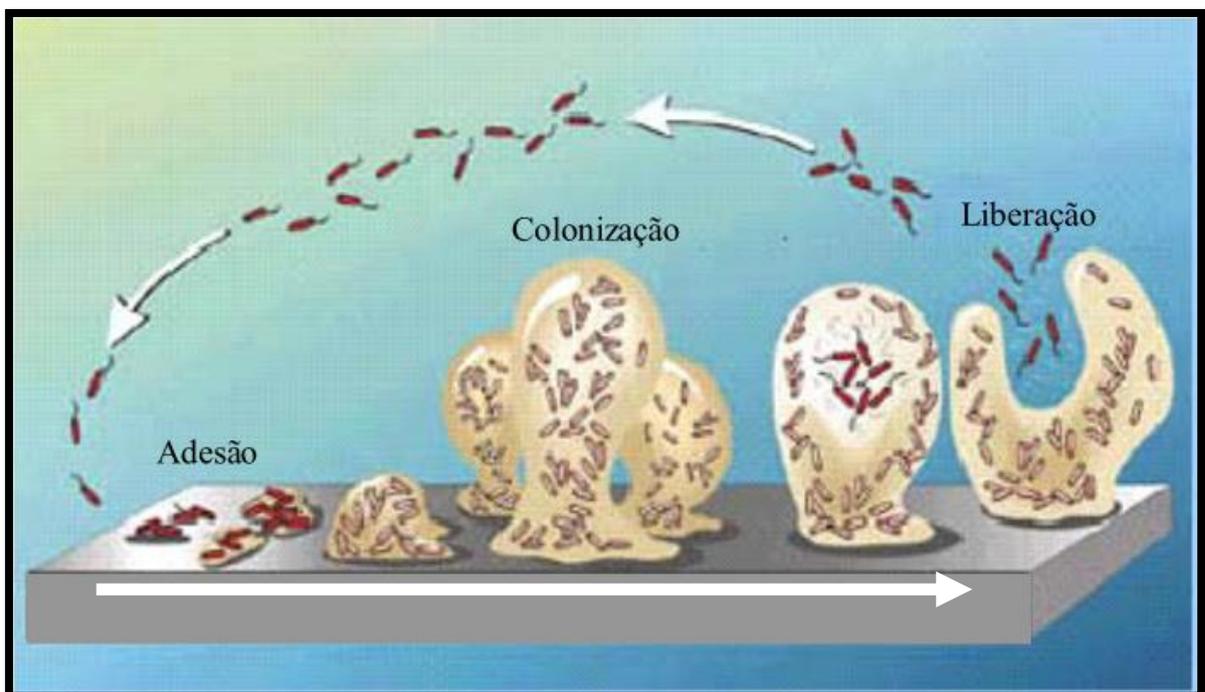


Figura 5: Etapas de formação de biofilme microbiano (Adaptado: CAPELLETTI, 2006).

O processo de desenvolvimento dessas comunidades ocorre em três fases distintas com um período compreendido em torno de 24 - 48 horas. Na fase inicial as células

planctônicas na forma de levedura aderem à superfície de um substrato em específico, nesse processo de adesão estão incluídos algumas interações eletrostáticas, hidrofóbicas e produção de adesinas; na fase secundária as células aderidas proliferam formando microcolônias e começam a produzir matriz extracelular e por último quando as células começam a se confluírem, a rede que outrora se formou começa a ser constituída de uma transição de células diferenciadas em leveduras, pseudohifas, hifas imersas em uma matriz extracelular polimérica com um crescimento tridimensional (SUZUKI, 2009).

Os mecanismos responsáveis pela resistência a antifúngicos estão relacionados com limitações difusionais da passagem do agente antimicrobiano pela matriz extracelular, com alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células. Outro mecanismo proposto pela resistência do biofilme aos agentes antimicrobianos é que as células associadas ao biofilme crescem significativamente mais devagar do que as células planctônicas e, como consequência captam os agentes antimicrobianos mais lentamente (DONLAN; COSTERTON, 2002; CARDOSO, 2004).

Os fatores de virulência quando associados – aderência, polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas (RIBEIRO, 2008) - permitem uma eficaz colonização ou infecção do hospedeiro, superando particularmente as defesas imunológicas dos hospedeiros susceptíveis (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Estas comunidades microbianas assumem uma importância particular perante a clínica, devido ao fato de estarem intimamente associadas à persistência dos micro-organismos nos processos infecciosos (DONLAN; COSTERTON, 2002), apresentando alterações fenotípicas e genotípicas, com um crescimento e uma captação significativamente mais lentos dos agentes antimicrobianos (DONLAN; COSTERTON, 2002; CARDOSO, 2004; ROSSI *et al.*, 2011). A adesão dos micro-organismos e uma porventura formação do biofilme sobre dispositivos médicos representam um grave problema na área médica, sendo responsável nas últimas décadas por cerca de 65% dos casos relacionados a infecções microbianas (KULETA; KOZIK; KOZIK, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DA *O*-CARBOXIMETILQUITOSANA

A preparação da *O*-Carboximetilquitosana seguiu a metodologia utilizada por Abreu (2002) com modificações. A quitosana utilizada no presente trabalho foi adquirida comercialmente (Oasis-Galena – LOTE: 1108001902) possuindo grau de pureza farmacêutico. O grau médio de acetilação da quitosana (%GA) é $17,6 \pm 1,3$. Em um erlenmeyer com capacidade de 500mL^{-1} , foram suspensos 9g de quitosana na forma neutra com tamanho médio de grãos de $150\mu\text{m}$ em 195 mL^{-1} de isopropanol. A suspensão foi deixada à temperatura ambiente sob agitação magnética por 20 minutos.

Em seguida, foram adicionados lentamente 61,2g de solução aquosa de hidróxido de sódio 40% (m/V). Após a adição de solução de NaOH, foram adicionados 43,2g de solução de ácido monocloroacético em isopropanol (1:1 m/m), deixando ocorrer a reação por 24h sob agitação magnética à temperatura ambiente ($\cong 25^\circ\text{C}$). Após a reação, o resíduo foi filtrado e suspenso em 450 mL^{-1} de metanol 80%, sendo em seguida neutralizado com ácido acético glacial. O resíduo sólido foi filtrado novamente e lavado várias vezes com etanol 80%, etanol absoluto, e metanol absoluto, sendo em seguida seco a temperatura ambiente ($\cong 25^\circ\text{C}$) (Figura 6).

4.2 PURIFICAÇÃO DA *O*-CARBOXIMETILQUITOSANA

A purificação da *O*-CMQT foi realizada segundo Abreu (2002): Em um béquer de 2L foram adicionados 1,5g de *O*-CMQT em 750 mL^{-1} de água destilada, sendo a suspensão mantida sob agitação por cerca de 24 horas e, em seguida, a solução resultante foi filtrada sob pressão positiva através de membranas de dimensões de poros de $5\mu\text{m}$, $1,2\mu\text{m}$ e $0,8\mu\text{m}$. À solução resultante foram adicionadas 750 mL^{-1} de NaCl 0,2 mol/L; permanecendo sob agitação durante cerca de 30 minutos. Em seguida, foi adicionado etanol 95%, em proporções de 100 mL^{-1} e com forte agitação até que ocorresse a precipitação. Após a precipitação, a solução ficou em repouso até a decantação do precipitado e foram então adicionados mais 20 mL^{-1} de etanol para assegurar-se que toda a *O*-CMQT fosse precipitado. O precipitado foi filtrado e então lavado com soluções de etanol a 75%, 80% e 90% (v/v), etanol absoluto e seco a temperatura ambiente ($\approx 25^\circ\text{C} - 1\text{ atm}$).

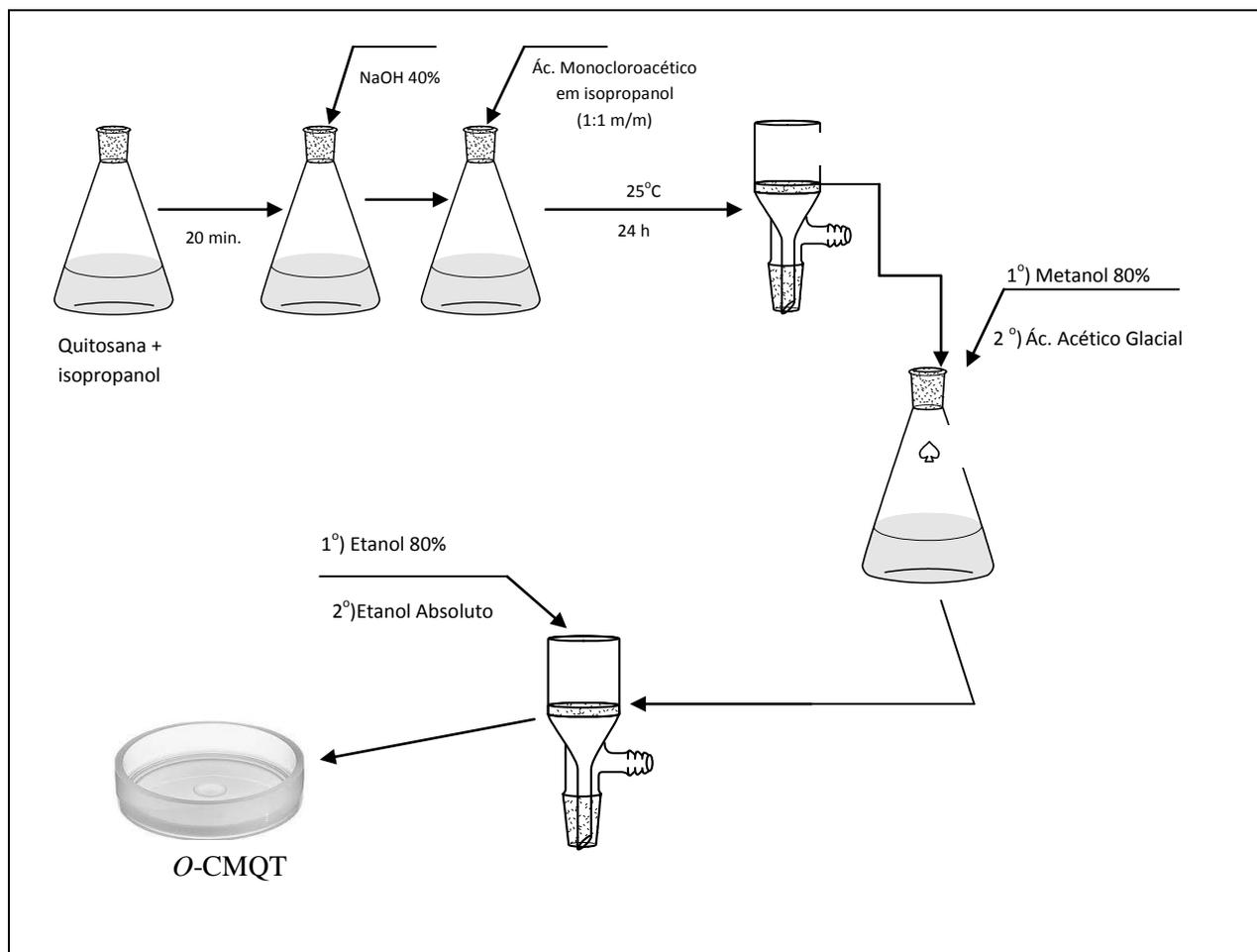


Figura 6: Preparação de *O*- Carboximetilquitosana.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DE *O*-CARBOXIMETILQUITOSANA

Os derivados secos de *O*-CMQT foram analisados segundo características de Grau de Substituição, Grau de solubilidade e por espectro na região do infravermelho para verificar as bandas características da carboximetilquitosana.

4.3.1 GRAU DE SUBSTITUIÇÃO

A determinação do grau de substituição (\overline{GS}) da *O*-CMQT, foi realizada segundo Abreu, 2002 através de análises potenciométricas: Cerca de 0,25 g de *O*-CMQT foi dissolvida em 250 mL⁻¹ de água deionizada e deixado sob agitação por 18 horas, adicionando-se em seguida 0,21 mL⁻¹ de HCl concentrado. O pH final da solução foi de cerca de 2,20- 2,40. Foi retirada então uma alíquota de 100 mL⁻¹ de solução de *O*-CMQT e titulada com solução aquosa padronizada de NaOH 0,1 Mol/L⁻¹. Todas as titulações foram realizadas utilizando o titulador automático Schott Titronic Universal com precisão de 0,05 mL⁻¹.

O grau médio de substituição foi calculado utilizando a *equação 1*:

$$\overline{\text{GS}} = \frac{M_x ([Base]) \times [v_2 - v_1]}{m - (80 [Base] \times [v_2 - v_1])}$$

em que:

$\overline{\text{GS}}$ = Grau de Substituição

M = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (193,0 g/Mol⁻¹)

[Base] = Concentração da base (Mol/L⁻¹)

v₁ = Volume de base empregado para atingir o primeiro ponto de viragem (L⁻¹)

v₂ = Volume de base empregado para atingir o segundo ponto de viragem (L⁻¹)

m = Massa de O-CMQT contida na alíquota de 100 mL⁻¹.

Na equação v₁ corresponde ao volume de solução de NaOH necessário para neutralizar o excesso de HCl presente na solução e a diferença v₂ - v₁ representa o volume da solução de NaOH gasto para neutralizar os grupos carboximéticos das cadeias de O-CMQT.

4.3.2- GRAU DE SOLUBILIDADE

As amostras de O-carboximetilquitosana foram suspensas em água na proporção de 100mg de amostra para 100mL⁻¹ de água. Todas as suspensões foram mantidas sob agitação constante por 24 horas à temperatura ambiente. As amostras insolúveis foram separadas do sobrenadante e pesadas, permitindo a determinação da porcentagem de material solúvel por diferença de massa. O grau de solubilidade foi calculado utilizando a equação:

$$M_{i\%} = \frac{M_s}{M_i} \times 100$$

em que:

M_{i%} = Porcentagem de massa inicial

M_s: Massa solúvel

M_i: Massa insolúvel

4.3.3- SOLUBILIDADE DA O-CMQT EM DIFERENTES FAIXAS DE pH

A solubilidade da O-CMQT foi realizada segundo Abreu (2002):

A determinação da solubilidade da O-CMQT em diferentes faixas de pH foi baseada na turbidez de suas soluções em água. As amostras foram dissolvidas em água deionizada e o pH das soluções (C_p = 1,5g / L⁻¹) foram ajustados com soluções aquosas de

HCl e NaOH 0,5%. A transmitância das soluções foi registrada em um espectrofotômetro UV-vis (QUIMIS, modelo: 0798U2V5) utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm. A solubilidade em água das amostras em diferentes pH foi estimada por medidas de transmitância da solução. A análise foi realizada considerando o aumento da absorção associada diretamente à turbidez das soluções, pois o aumento ou mesmo a diminuição do pH das amostras decorre a insolubilidade e as soluções passam a possuir suspensões.

4.3.4- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

O espectro na região do infravermelho de *O*-CMQT foi realizado por meio de pastilhas de KBr em espectrofotômetro FTIR, no Laboratório Instrumental da Universidade Estadual de Goiás - UEG, unidade UnUCET. As pastilhas foram preparadas usando aproximadamente 1mg de *O*-CMQT, previamente seca e cerca de 100 mg⁻¹ de KBr.

4.4 ENSAIO DE LETALIDADE COM *Artemia salina* LEACH.

A água salina foi preparada com a dissolução de sal marinho em água destilada (40 g/L⁻¹) e 100 mg de ovos de *Artemia salina* foram incubados por um período de 48 h à aproximadamente 36°C. O pH deve ser ajustado a 8,5 utilizando 1M de Na₂CO₃. O controle negativo é realizado através de K₂Cr₂O₇ em 100ppm. Após este período de incubação os metanúplios foram atraídos por uma fonte de luz utilizando uma lâmpada de 20W, a fim de atrair as larvas por fototaxia positiva. As larvas foram coletadas utilizando uma pipeta de Pasteur e agrupadas em um artemilheiro- este é utilizado a fim de se selecionar as larvas de *Artemia salina* dos cistos, sobrenadantes e cistos não eclodidos. Uma amostra foi colocada em uma placa de Petri com água salina, após com uma micropipeta coleta um volume total igual a 50µL, em tal volume deve-se existir cerca de aproximadamente 10 larvas. Estas larvas são transferidas para uma placa microtiter de Elisa, que possui previamente as concentrações a serem testadas, e incubou-se tal placa por um período de 24 h (**Figura 7**). Após este período, com o auxílio de um estereoscópio fez-se a contagem do número total de larvas vivas e mortas por poço através da mobilidade apresentada por cada larva em seu respectivo poço. Posteriormente as larvas móveis – vivas- foram inativadas utilizando cerca de 100µL de metanol em cada poço e incubando por cerca de 15 minutos, após este período fez-se a contagem do número total de larvas. Os valores foram analisados através do PROBIT que calcula a DL₅₀.

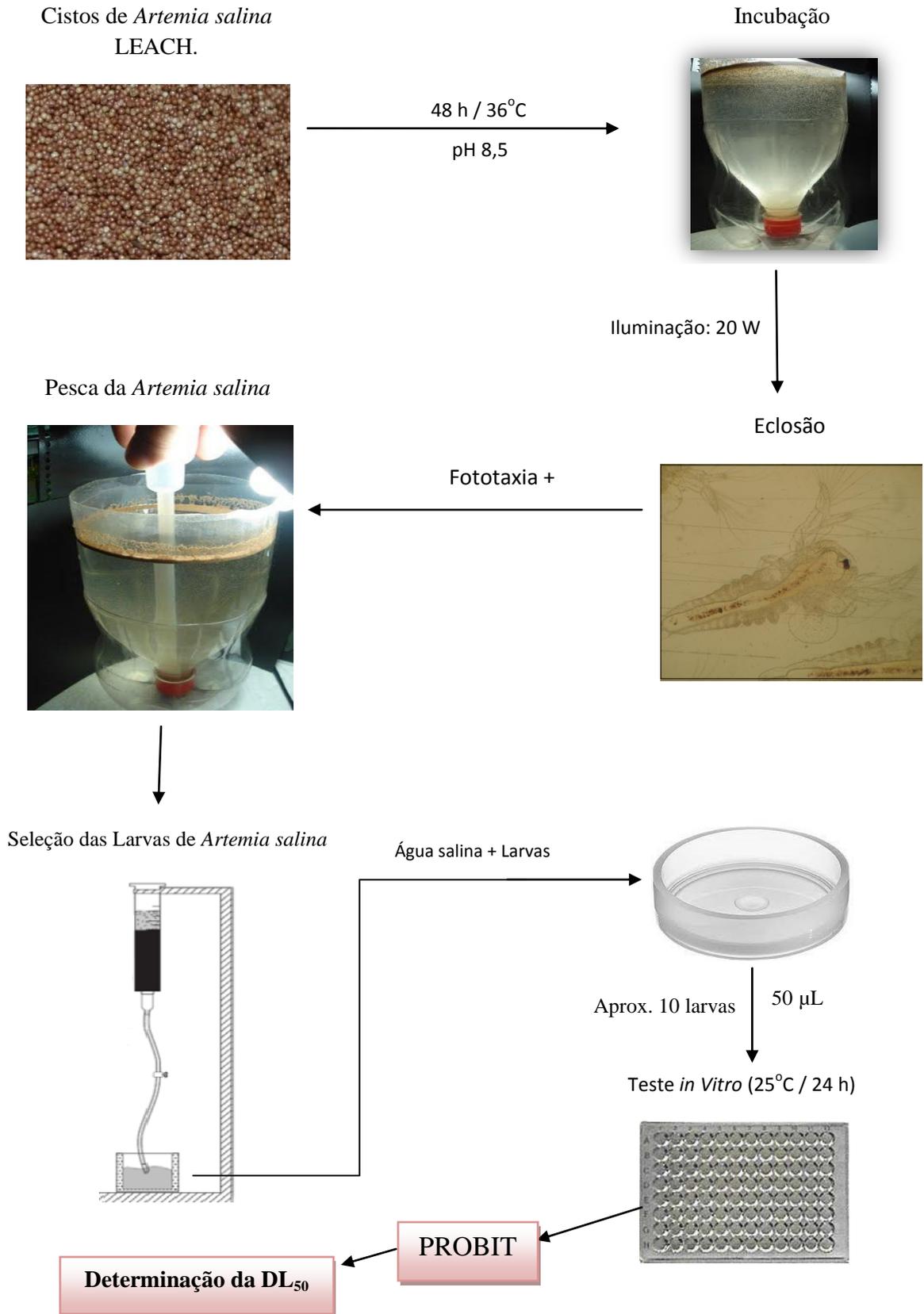


Figura 7: Esquema do ensaio de Letalidade de *Artemia salina* LEACH.

4.5 ENSAIO PARA A FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os ensaios para a formação de biofilmes sofreram adaptações em suas técnicas com base em técnicas previamente descritas. Assim, as amostras foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperatura de 37 °C por 48 horas, logo transferiu-se três colônias típicas para caldo Sabouraud dextrose (CSD) e incubou-se durante 24 horas a 37 °C, depois alíquotas de 500 µL do caldo crescido foram transferidas para 4,5 mL⁻¹ de diferentes meios- RPMI 1640, CSD e saliva artificial. Logo transferiu 200 µL para placas microtiter de poliestireno não tratadas que foram posteriormente incubadas a 48 horas a 37 °C (JAIN *et al.*, 2007). As placas foram posteriormente tratadas segundo metodologia descrita por Naves *et al.* (2008), com a determinação do crescimento total (CT) pela medida da densidade óptica a 630 nm, seguida da remoção do caldo crescido com as formas planctônicas e lavagem dos poços com solução fisiológica e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente as amostras foram coradas com 200 µL de cristal violeta a 1% por 5 minutos, o corante será desprezado e as placas lavadas quatro vezes com 300 µL de água destilada. As placas foram secadas a 37 °C por 20 minutos, posteriormente foram adicionados 200 µL de etanol absoluto em cada poço e incubou-se a placa durante 5 minutos. Após esse período as densidades ópticas foram lidas a 490 nm dos poços com as leveduras aderidas (LA) e poços controle (PC) (Figura 8).

As densidades ópticas obtidas permitiram o cálculo do índice de Formação Específica de Biofilme (FEB) por meio da fórmula $FEB = (LA - PC) / CT$, LA = leveduras aderidas, PC = poço controle e CT = crescimento total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes. Controles positivos e negativos serão incluídos.

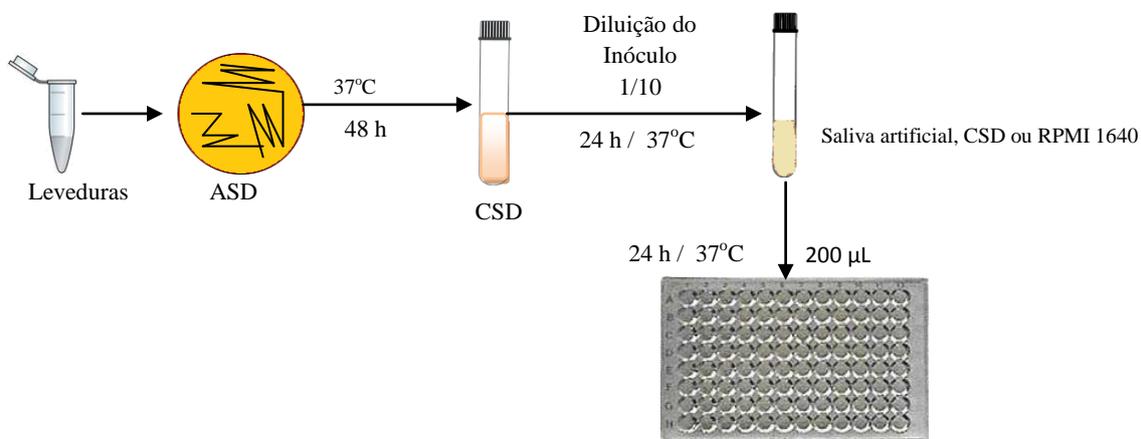


Figura 8: Esquema dos ensaios para a formação de biofilme nos meios de cultura saliva artificial, caldo Sabouraud dextrose (CSD) e RPMI 1640.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA *O*-CARBOXIMETILQUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Candida albicans* E OUTRAS ESPÉCIES DE *Candida*

O impacto da O-CMQT foi avaliado por meio do pré-tratamento dos poços com intervalos de exposição dos mesmos ao composto durante 1h e 24h à 35°C em condições assépticas seguindo a metodologia descrita por Naves *et al.*, (2010).

Suscintamente, a partir de uma solução padrão de *O*-CMQT com água destilada estéril com uma concentração de 50mg/mL⁻¹, fez-se alíquotas de 200µL da solução em cada poço das microplacas, que em seguida foram incubadas por 1 hora e 24 horas à 35°C. Após esse período, os poços foram lavados com RPMI 1640 e secados por 20 minutos a 35°C. Foram incluídos controles de crescimento com RPMI 1640 mais as cepas, controles negativos com RPMI 1640 mais *O*-CMQT nos intervalos testados e controles de esterilidade com somente o caldo RPMI 1640.

Após o pré-tratamento com a *O*-CMQT realizou-se o teste de formação de biofilme conforme descrito no item 4.5. Para a análise dos dados utilizou-se os testes T pareado e não pareado com um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA *O*-CMQT

O processo de obtenção da *O*-CMQT utilizado no presente estudo apresentou-se eficaz por demonstrar facilidade nos procedimentos envolvendo a síntese, além do rendimento do biopolímero ao final, que gerou em torno de 188,18%.

De fato, a carboximetilação resulta em ganho de massa e a razão molar entre o biopolímero base - quitosana - e o ácido monocloroacético é mais importante do que o tempo em que a reação ocorre (SILVA, 2011). O ganho de massa através da carboximetilação da quitosana se dá pela substituição do hidrogênio presente na hidroxila pelo grupamento CH_2COO^- . Em questão, o hidróxido de sódio é utilizado para provocar um meio que seja reacional, ou seja, atua ativando os grupos hidroxila, para se obter índices máximos de substituições nos agrupamentos *O*-hidroxila.

Quanto à purificação da *O*-CMQT, obteve-se um rendimento médio de 73,76%, e rendimento real de 140,23%. E a purificação é um procedimento importante principalmente quando se busca uma formulação de produtos para utilização farmacêutica (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998). Já a perda de massa, contrária, por exemplo, a síntese, deve-se em suma a presença de quitosana que não reagiu e a fragmentos de *O*-CMQT que apresentaram um grau de substituição muito baixo, não se solubilizando em água (SILVA, 2011). Alguns trabalhos utilizando a *O*-CMQT não fazem a purificação das amostras, como Martins (2010), enquanto outros, como Cerrutti (2010), utilizam método diferente ao realizado no presente estudo para obtenção da *O*-CMQT purificada. O método utilizado para a purificação da *O*-CMQT consegue retirar os fragmentos de quitosana que estão presentes na amostra e que não sofreram influência do meio reacional, além de alguns contaminantes insolúveis; separando-os através da precipitação de possíveis contaminantes solúveis presentes na amostra sintetizada.

5.2 GRAU DE SUBSTITUIÇÃO

O grau de substituição médio (%GS) da *O*-CMQT foi de $1,73 \pm 0,07$. O grau de substituição é um nível médio de grupamentos CH_2COO^- que substituíram o H presente nos grupamentos OH; principalmente nas posições C-6 e C-3 dos monômeros da cadeia polimérica de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose (RINAUDO; DUNG; MILAS, 1992; VELASQUÉZ, 2003, CAMPANA-FILHO, 2007) (Gráfico 1).

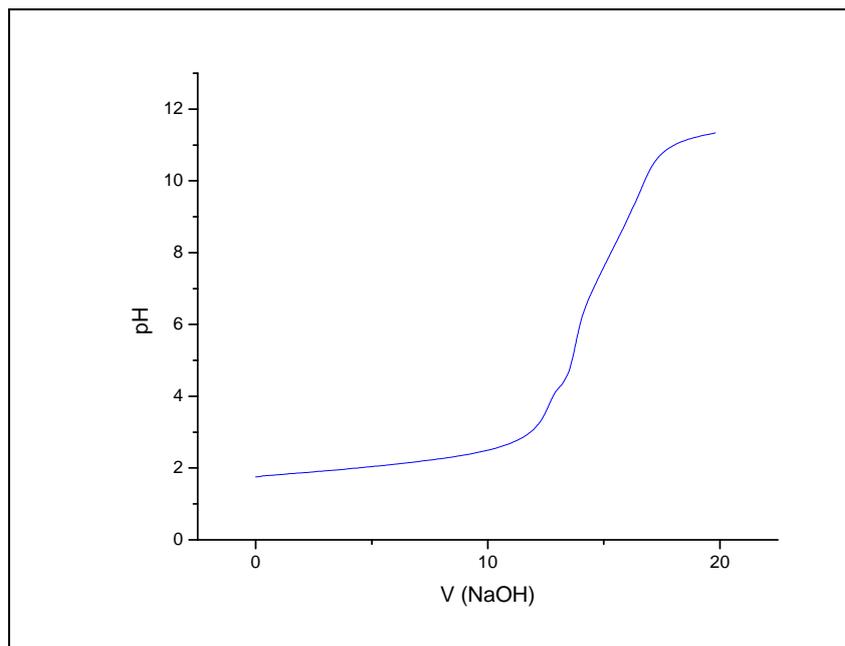


Gráfico 1: Curva de titulação potenciométrica da *O*-CMQT.

Os graus de substituição poderiam ser maiores segundo Silva (2011), com um aumento das concentrações de NaOH – em vez de 40% para 50% - entretanto, quanto maior a razão molar maior o favorecimento de maiores graus de substituição na cadeia polimérica de *O*-CMQT; fato confirmado por Chen, Du e Zeng (2003). O grau de substituição possui acentuada influência, por exemplo, no realce da ação antimicrobiana; quanto maior o grau de substituição maior amplitude da ação antimicrobiana da *O*-CMQT (SUN *et al.*, 2006; ANITHA *et al.*, 2009).

Outro fator para se obter um alto grau de substituição é o tempo em que ocorre a reação; no presente estudo utilizou-se um tempo de 24 horas, que para Abreu e Campana-Filho (2005), é excessivo, pois, um tempo maior que 10 horas de reação, provoca uma diminuição de ácido monocloroacético na solução, diminuindo assim as condições favoráveis de um meio reacional que favoreça um produto final com alto grau de substituição. E consegue-se recuperar grande parte da massa de carboximetilados- como a *O*-CMQT- quando se aumenta a quantidade de ácido monocloroacético na reação de carboximetilação (LAMAS, 2008).

5.3 GRAU DE SOLUBILIDADE

Todas as amostras sintetizadas para o presente estudo foram solúveis em água, apresentando valor médio de grau de solubilidade da *O*-CMQT foi de $86,54 \pm 3,99$, que atesta que a reação de carboximetilação foi bem sucedida (ABREU, 2009).

A carboximetilação é um mecanismo que confere aos carboximetilados maior solubilidade em água e em um amplo espectro de pH – neutro e alcalino-; essa capacidade é proporcionada devido ao emprego na reação de ácido monocloroacético. Índices de solubilidade estão proporcionalmente relacionados com os graus de substituição dos agrupamentos hidroxilas primários que estão livres na molécula de quitosana (CHEN; PARK, 2003; ZHU *et al.*, 2005; ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009; MELLO, 2009; GUJARATHI *et al.*, 2012). Essa capacidade própria da *O*-CMQT de ser solúvel em faixas de pH insolúveis para quitosana- a solubilidade da quitosana está compreendida em meios de moderada acidez à forte- , faz com que se prefira a utilização dessa substância para diversas aplicações, principalmente nas áreas farmacêuticas e biomédicas (ABREU, 2006; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

5.4 SOLUBILIDADE DA *O*-CMQT EM DIFERENTES FAIXAS DE pH

A solubilidade da *O*-CMQT em uma ampla faixa de pH é um fator extremamente importante para a determinação da sua utilização, principalmente na área farmacêutica.

A solubilidade/insolubilidade apresentada pela *O*-CMQT foi avaliada segundo a formação de suspensões - material insolúvel – nas amostras. Essas suspensões de material insolúvel difratam a luz, espalhando a radiação luminosa emitida pelo espectrômetro UV, não permitindo assim que a radiação atinja o detector. Assim, o aumento dos valores da absorbância são diretamente proporcionais ao aumento da insolubilidade de uma certa amostra.

A *O*-CMQT sintetizada foi solúvel em uma ampla faixa de pH, sendo insolúvel em uma faixa de 2,40 a 3,90; no entanto, em uma faixa compreendida entre 1,40 – 2,40 e 3,90 – 12,30 a *O*-CMQT foi solúvel (**Figura 9**). Os dados obtidos provaram que a *O*-CMQT foi solúvel em uma ampla faixa de pH- ácido/neutro/básico, comprovando o êxito da reação de carboximetilação (**Gráfico 2**).

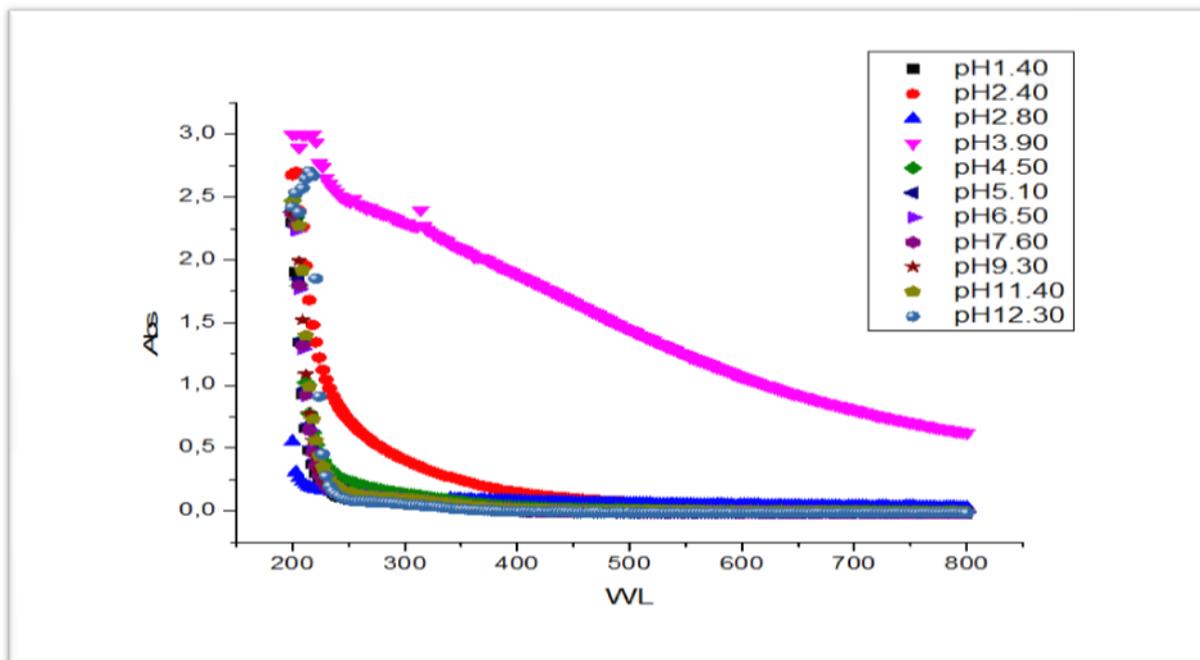


Gráfico 2: Solubilidade de *O*-CMQT em diferentes faixas de pH.

Os dados obtidos confrontam o apresentado por Mello (2009), que afirma que a solubilidade de *O*-CMQT é restrita apenas a meios alcalinos, sendo insolúveis em meios com pH ácidos, como também os dados apresentados por Silva (2011), que afirma que a *O*-CMQT é solúvel em um $\text{pH} < 3$. Com essa capacidade de ser solúvel em pH ácido, a *O*-CMQT apresenta a capacidade de perturbar as biomembranas ácidas, em sistemas básicos e neutros – como soluções fisiológicas (ZHU *et al.*, 2005).



Figura 9: Faixas de solubilidade (■) e insolubilidade (□) da *O*-CMQT em diferentes faixas de pH.

5.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

O espectro de infravermelho da quitosana apresenta uma banda característica de estiramento axial do grupo -OH na região de 3433 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H e uma banda característica de estiramento C-H em 2880 cm^{-1} . O espectro de infravermelho apresenta ainda uma banda forte correspondente à deformação angular

simétrica no plano de NH_2 na região perto de 1600 cm^{-1} ; banda de deformação axial de C-N de amina por volta de 1370 cm^{-1} ; bandas deformação axial de C-O de grupo éter na região de 1163 cm^{-1} e 1051 cm^{-1} e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 660 a 528 cm^{-1} . Estas bandas foram muito semelhantes às apresentadas anteriormente na literatura (BARROS *et al.*, 2006; GE ; LUO, 2005; MARTINS, 2008; SANTOS *et al.*, 2003) (**Gráfico 3**).

Após a reação de carboximetilação, foram observadas algumas mudanças no espectro de infravermelho, em relação à quitosana. O espectro de infravermelho da O-carboximetilquitosana apresentou bandas na região de 1610 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} , atribuídas às deformações axiais simétricas e assimétricas de grupos COOH. O espectro apresenta ainda uma banda característica de estiramento axial de grupo -OH na região de 3428 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; uma banda característica de estiramento C-H em 2893 cm^{-1} ; bandas de deformação axial de C-N de amida por volta de 1328 cm^{-1} ; deformação axial de C-O de grupo éter na região de 1040 cm^{-1} e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 710 a 578 cm^{-1} . Estas bandas foram muito semelhantes às apresentadas anteriormente na literatura (CHEN, PARK, 2003; MOURYA *et al.*, 2010; ANITHA *et al.*, 2009) (**Gráfico 3**).

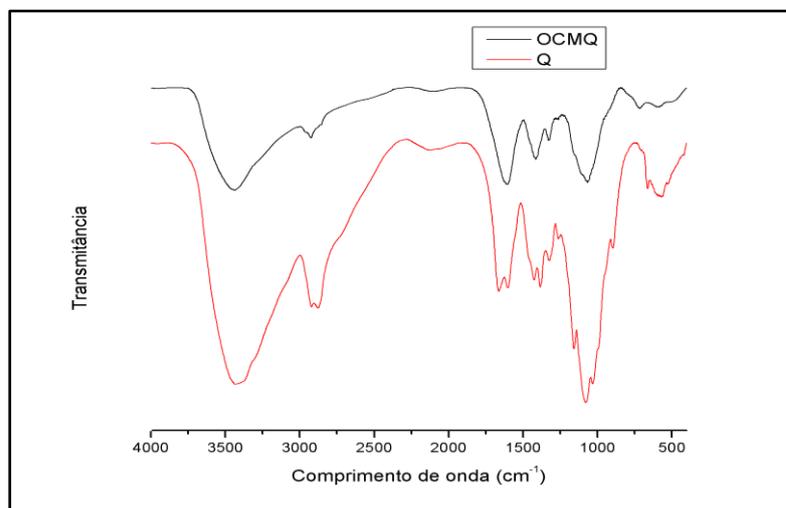


Gráfico 3: Espectro de infravermelho da quitosana e O-carboximetilquitosana.

5.6 ESTUDO DA TOXICIDADE DE O-CMQT PELO TESTE DE LETALIDADE DE *Artemia salina* LEACH.

Os testes de letalidade de *Artemia salina* LEACH. em microdiluição mostraram baixa toxicidade da O-CMQT contra o microcrustáceo.

No bioensaio realizado não foi observada DL_{50} nas concentrações testadas o que indica que o composto possui baixa toxicidade, pois sua dose letal é superior a maior concentração avaliada (50 mg/mL^{-1}). O fator limitante desta concentração foi o fato de que a *O*-CMQT apresenta um aumento de viscosidade, como também a capacidade de inchamento dificultando assim o teste com concentrações superiores a máxima testada (YIN *et al.*, 2007).

Considerando a literatura, o ensaio para a determinação de citotoxicidade ou letalidade de *A. salina* LEACH. em microplacas apresenta resultados comparáveis ao método tradicional e possui uma excelente correlação com ensaios de toxicidade as células “killer”, constituindo-se numa técnica conveniente para detecção de citotoxicidade de produtos naturais durante o fracionamento e isolamento destes produtos. O ensaio de letalidade seguiu os procedimentos adotados por Molina; Salvador (2004).

Em estudo realizado com a *O*-CMQT (MARTINS, 2010), no qual se analisou tanto a toxicidade de *O*-CMQT quanto de seus derivados anfifílicos, identificou-se que mesmo a $1000 \text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$ não houve níveis significativos de citotoxicidade no mesmo tipo de ensaio. Esses dados confirmam os apresentados por Rosa (2008) em que a *O*-CMQT não apresentam atividade citotóxica.

Meyer (1982) em seus estudos com extratos brutos de plantas da família *Euphorbiaceae*, preconizou que os compostos - não determinando sua origem - pelo teste de *Artemia salina* são considerados citotóxicos quando apresentam uma DL_{50} igual ou superior a 250 mg/mL^{-1} (Figura 10). Adicionalmente, de acordo com Lhullier *et al.* (2006) compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas concentrações.

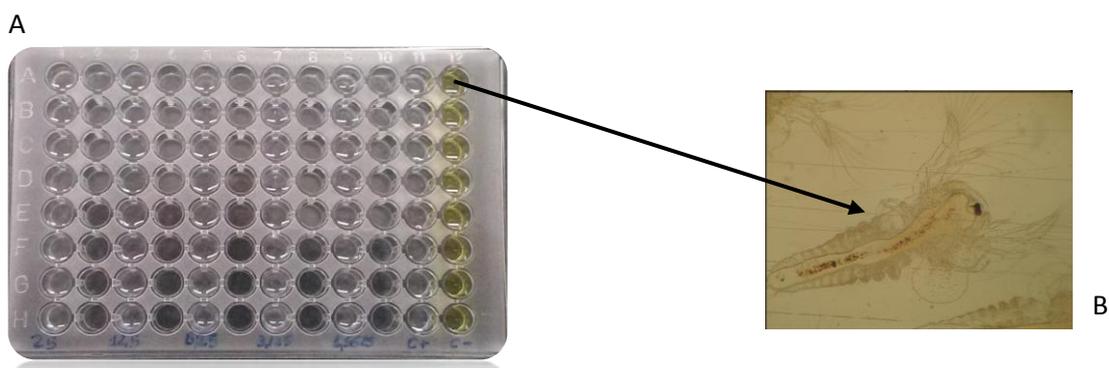


Figura 10: A- Placa Microtiter em que se realizou o teste de letalidade de *Artemia salina* LEACH. em microdiluição. B- Espécime de *Artemia salina* LEACH., metanáuplio, visualizada em microscópio estereoscópio binocular óptico – Bel Photonics; $10x \approx 160x$.

O teste de letalidade de *Artemia salina* possui boa correlação com outros testes mais complexos na determinação de várias atividades, tais como: antifúngicas, antivirais,

antimicrobianas, parasiticidas, antitumorais e tripanossomicidas, além de ser um teste de baixo custo e de fácil interpretação. Vem sendo amplamente empregado na triagem da atividade biológica de vários compostos (PISUTTHANAN *et al.*, 2004; LUNA *et al.*, 2005; KRISHNARAJU *et al.*, 2005) com possíveis potenciais de bioatividade.

5.7 FORMAÇÃO DE BIOFILME

5.7.1 DENSIDADES ÓPTICAS – CRISTAL VIOLETA

As densidades ópticas apresentadas a seguir são referentes ao ensaio de formação de biofilme em RPMI 1640, saliva artificial e caldo Sabouraud dextrose, com suas respectivas médias e desvios padrão.

Leveduras	DO _{630 nm}		
	RPMI 1640 Med (DP)	CSD Med (DP)	SA Med (DP)
Ca 12031*	0,593 ± 0,049	1,133 ± 0,060	0,662 ± 0,063
Ca 05	0,589 ± 0,041	1,028 ± 0,061	0,663 ± 0,136
Ca 19	0,775 ± 0,150	0,518 ± 0,091	0,459 ± 0,106
Ca 26	0,648 ± 0,059	0,305 ± 0,197	0,245 ± 0,151
Ca 33	0,710 ± 0,182	0,248 ± 0,111	0,267 ± 0,177
Ca 34	0,617 ± 0,012	1,185 ± 0,052	0,813 ± 0,149
Ca 35	0,731 ± 0,053	0,732 ± 0,403	1,007 ± 0,368
Cp 22019*	0,744 ± 0,017	0,958 ± 0,062	0,754 ± 0,103
Cp 120	0,699 ± 0,017	1,196 ± 0,014	0,731 ± 0,057
Cp 38	0,838 ± 0,050	0,754 ± 0,197	0,692 ± 0,096
Ct 154	0,339 ± 0,000	0,290 ± 0,000	0,284 ± 0,013
Ct 155	1,068 ± 0,022	0,240 ± 0,156	0,446 ± 0,543
PC	0,043 ± 0,001	0,063 ± 0,024	0,101 ± 0,061

Tabela 1: Médias e desvios padrão das densidades ópticas (DO_{630 nm}) de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) e dos Poços Controle (PC) não inoculados. *Cepas ATCC 12031 e 22019.

Leveduras	DO _{492 nm}		
	RPMI 1640 Med (DP)	CSD Med (DP)	SA Med (DP)
Ca 12031*	1,023 ± 0,291	0,122 ± 0,037	0,153 ± 0,013
Ca 05	2,001 ± 0,057	0,106 ± 0,011	0,222 ± 0,123
Ca 19	0,366 ± 0,077	0,177 ± 0,027	0,163 ± 0,055
Ca 26	0,437 ± 0,168	0,145 ± 0,062	0,111 ± 0,012
Ca 33	0,595 ± 0,199	0,146 ± 0,019	0,134 ± 0,040

Ca 34	2,290 ± 0,685	0,097 ± 0,021	0,315 ± 0,270
Ca 35	0,769 ± 0,026	0,216 ± 0,057	0,305 ± 0,091
Cp 22019*	0,522 ± 0,106	0,443 ± 0,150	0,281 ± 0,010
Cp 120	0,542 ± 0,228	0,120 ± 0,030	0,258 ± 0,111
Cp 38	2,012 ± 1,007	0,772 ± 0,548	0,737 ± 0,149
Ct 154	0,927 ± 0,631	0,167 ± 0,000	0,121 ± 0,018
Ct 155	0,440 ± 0,143	0,102 ± 0,002	0,218 ± 0,213
PC	0,119 ± 0,006	0,075 ± 0,009	0,111 ± 0,017

Tabela 2: Médias e desvios padrão das densidades ópticas ($DO_{492\text{ nm}}$) de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) e dos Poços Controle (PC) não inoculados. *Cepas ATCC 12031 e 22019.

A formação de biofilme foi mais intensa no meio RPMI 1640, o que pode ser constatado pelas maiores densidades ópticas detectadas para todas as leveduras.

Identificou-se que em 50% das leveduras houve um maior crescimento total no meio RPMI 1640, seguido pelo caldo Sabouraud dextrose com 41,7% das amostras. No entanto, quando se avaliou a formação de biofilme, identificou-se que em 100% das leveduras esta forma de crescimento foi maior no RPMI 1640 do que nos outros meios de cultura verificados pelas maiores densidades ópticas detectadas.

Outro critério analisado, o desvio padrão dos testes, foi maior em saliva artificial – 58,3% - fato esse corroborado pela formação de grumos durante o crescimento planctônico das leveduras, principalmente de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, dificultando o procedimento de pipetagem de quantidades homogêneas dos inóculos por poço.

A utilização de cristal de violeta é uma alternativa metodológica eficiente, devido ao fato desse corante apresentar afinidade por células, superfícies com cargas negativas e constituídas por matriz extracelular polissacarídica (LI *et al.*, 2003; RAMAGE *et al.*, 2005).

5.8 CATEGORIAS DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi avaliada de acordo com os critérios empregados por Naves (2009), distribuindo os valores obtidos em quartis para classificar de forma semi-quantitativa as leveduras em quatro categorias de formação de biofilme: Forte (F), Moderado (M), Escasso (E) e Não Formador (N). Foram consideradas três fórmulas indicativas de formação de biofilme.

Fórmula $FB_1 = DO_{1a} - DO_c$	Forte (F)	Moderado (M)	Escasso (E)	Não Formador (N)
RPMI 1640	$\geq 0,563$	$0,563 > M \geq 0,384$	$0,383 > E \geq 0,248$	$\leq 0,247$
CSD	$\geq 0,071$	$0,071 > M \geq 0,043$	$0,042 > E \geq 0,023$	$\leq 0,022$
SA	$\geq 0,109$	$0,109 > M \geq 0,038$	$0,037 > E \geq 0,001$	$\leq 0,000$

Fórmula $FB_2 = DO_{la} / DO_c$	Forte (F)	Moderado (M)	Escasso (E)	Não Formador (N)
RPMI 1640	$\geq 5,731$	$5,731 > M \geq 4,216$	$4,215 > E \geq 3,077$	$\leq 3,076$
CSD	$\geq 1,940$	$1,940 > M \geq 1,554$	$1,553 > E \geq 1,294$	$\leq 1,293$
SA	$\geq 1,982$	$1,982 > M \geq 1,336$	$1,335 > E \geq 1,001$	$\leq 1,000$

Fórmula	Forte (F)	Moderado (M)	Escasso (E)	Não Formador (N)
$FEB = (DO_{la} - DO_c) / DO_{CT}$				
RPMI 1640	$\geq 0,805$	$0,805 > M \geq 0,411$	$0,410 > E \geq 0,302$	$\leq 0,301$
CSD	$\geq 0,197$	$0,197 > M \geq 0,040$	$0,039 > E \geq 0,029$	$\leq 0,028$
SA	$\geq 0,190$	$0,190 > M \geq 0,117$	$0,116 > E \geq -0,400$	$\leq -0,399$

Tabela 3: Classificação semi-quantitativa capacidade de formação de biofilme em quatro categorias utilizando três fórmulas. FB_1 e FB_2 : Formação de Biofilme. FEB: Formação Específica de Biofilme. DO_{la} : $DO_{492\text{ nm}}$ das leveduras aderidas. DO_c : $DO_{492\text{ nm}}$ dos poços com o meio de cultura não inoculado. DO_{CT} : $DO_{630\text{ nm}}$ do crescimento das leveduras no meio de cultura.

A capacidade de formação de biofilme das leveduras está apresentada na tabela 4.

	$FB_1 = DO_{la} - DO_c$			$FB_2 = DO_{la} / DO_c$			$FEB = (DO_{la} - DO_c) / DO_{CT}$		
	RPMI 1640	CSD	AS	RPMI 1640	CSD	AS	RPMI 1640	CSD	SA
Ca19	0,247 N	0,102 F	0,052 M	3,076 N	2,360 F	1,468 M	0,383 E	0,229 F	0,181 M
Ca26	0,318 E	0,070 M	0,000 N	3,672 E	1,933 M	1,000 N	1,943 F	0,292 F	-0,029 N
Cp120	0,423 M	0,045 M	0,147 F	4,555 M	1,600 M	2,324 F	0,500 M	0,040 M	0,132 M
Ca34	2,171 F	0,022 N	0,204 F	19,244 F	1,293 N	2,838 F	3,647 F	0,028 N	0,364 F
Ca35	0,650 F	0,141 F	0,194 F	6,462 F	2,880 F	2,748 F	0,383 E	0,188 M	0,189 M
Ca12031*	0,904 F	0,047 M	0,042 M	8,597 F	1,627 M	1,378 M	2,510 F	0,037 E	0,068 E
Cp22019*	0,403 M	0,368 F	0,170 F	4,387 M	5,907 F	2,532 F	0,426 M	0,454 F	0,202 F
Ct154	0,808 F	0,092 F	0,010 E	7,790 F	2,227 F	1,090 E	1,110 F	0,205 F	-0,399 N
Ct155	0,321 E	0,027 E	0,107 M	3,697 E	1,360 E	1,964 M	0,301 N	0,104 M	0,333 F
Cp38	1,893 F	0,697 F	0,626 F	16,908 F	10,293 F	6,640 F	2,506 F	0,949 F	0,913 F
Ca33	0,476 M	0,071 F	0,023 E	5,000 M	1,947 F	1,207 E	0,419 M	0,349 F	0,281 F
Ca05	1,882 F	0,031 E	0,111 F	16,815 F	1,413 E	2,000 F	2,545 F	0,037 E	0,191 F

Tabela 4: Comparação da capacidade de formação de biofilme calculada com três fórmulas distintas – tabela 3 –, nos meios RPMI 1640, Saliva Artificial (SA) e Caldo Sabouraud Dextrose (CSD). FB_1 e FB_2 : Formação de Biofilme. FEB: Formação Específica de Biofilme. DO_{la} : $DO_{492\text{ nm}}$ das leveduras aderidas. DO_c : $DO_{492\text{ nm}}$ dos poços com o meio de cultura não inoculado. DO_{CT} : $DO_{630\text{ nm}}$ do crescimento das leveduras no meio de cultura.* ATCC 12031 e 22019.

Quanto à capacidade de formação de biofilme pelas leveduras, independente da fórmula utilizada, quatro (33,33%) cepas foram classificadas com o mesmo padrão nos diferentes meios analisados. Ao considerar cada fórmula separadamente, em cada meio de cultura, o mesmo fenômeno foi observado.

As categorias de formação de biofilme foram coincidentes para todas as cepas em todos os meios de cultura quando consideradas as fórmulas FB₁ e FB₂. Oito (66,66%) cepas foram categorizadas de forma distinta pela FEB em relação às outras fórmulas, entre as quais 4 cepas (Cp 120, Ca 35, Ca 12031 e Ct 154) foram classificadas em categorias inferiores as detectadas pelas outras fórmulas, enquanto que 4 cepas (Ca 19, Ca 26, Ca 33 e Ct 155) foram classificadas pela FEB em categorias de maior formação de biofilme, com uma exceção para Ct 155 em meio RPMI 1640.

A correlação dos valores obtidos por cada fórmula permite inferir que tanto a FB₁ quanto a FB₂ são as mais indicadas para análise dos dados de formação de biofilme neste estudo, pois consideram as variáveis relativas ao crescimento sésil das leveduras e dos poços-controle não inoculados. O índice FEB pode sofrer interferências das leituras do crescimento total, pois esta foi baseada somente na DO_{630nm} e pode ser influenciada por fatores inespecíficos como a precipitação de constituintes do meio de cultura, por exemplo. Assim, optou-se pela FB₁ para a análise dos dados da capacidade de formação de biofilme pelas amostras de *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*.

O RPMI 1640 foi o meio de cultura escolhido devido ao fato de ser o mais utilizado em testes de formação de biofilme, nos ensaios antifúngicos e por favorecer o crescimento sésil das leveduras por interações hidrofóbicas (BLANCO *et al.*, 2010) (**Gráfico 4**) considerando que a hidrofobicidade é uma condição favorável a formação de biofilme, enquanto que no CSD o crescimento das leveduras é influenciado por interações hidrofílicas (GOCKE; CERIKCIOGLU; YAGCI, 2007).

Nos gráficos a seguir (4, 5 e 6) são apresentados os índices de formação de biofilme nos meios RPMI 1640, caldo Sabouraud dextrose e saliva artificial.

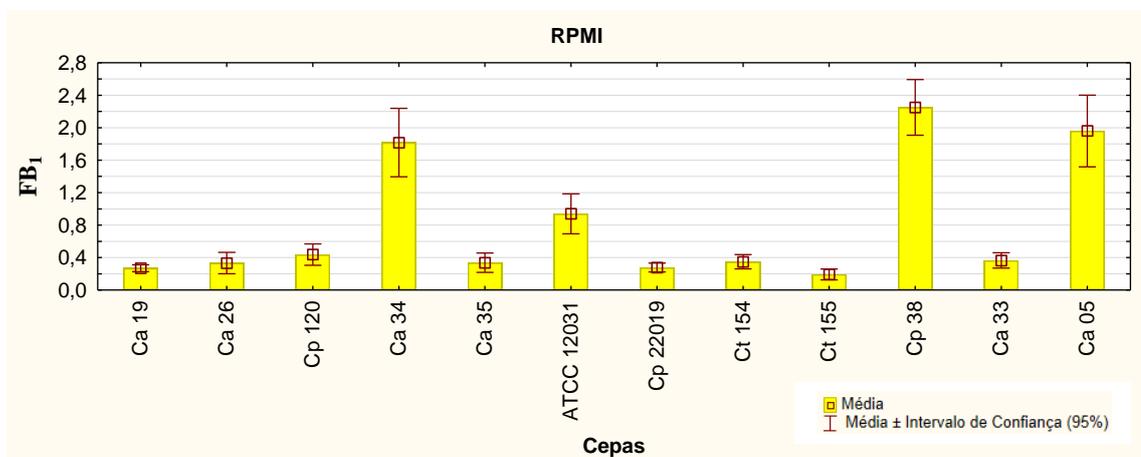


Gráfico 4: Formação específica de biofilme de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct) e *Candida parapsilosis* (Cp), no meio RPMI 1640.

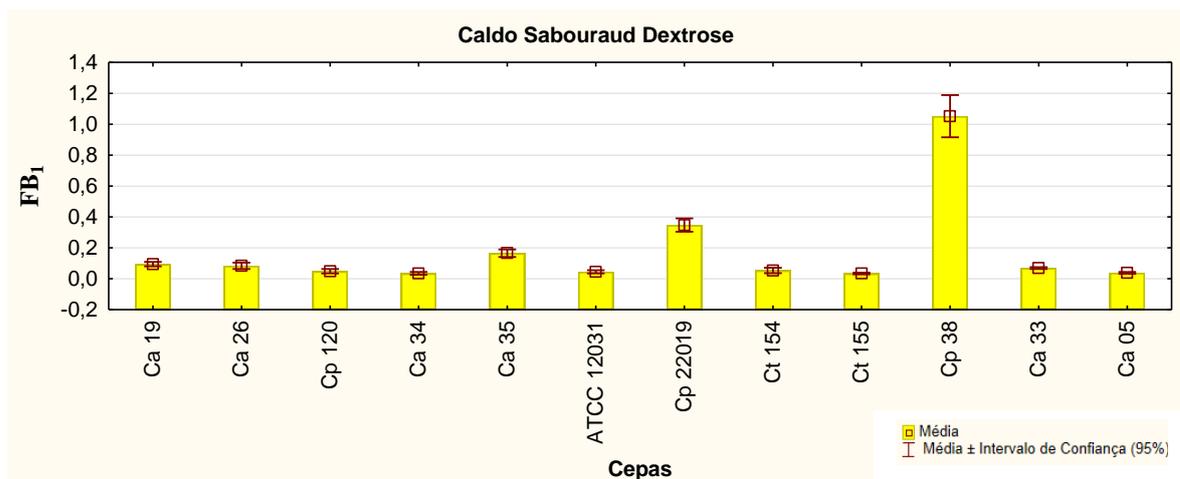


Gráfico 5: Gráfico de formação específica de biofilme de leveduras de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct) e *Candida parapsilosis* (Cp), no meio caldo Sabouraud dextrose.

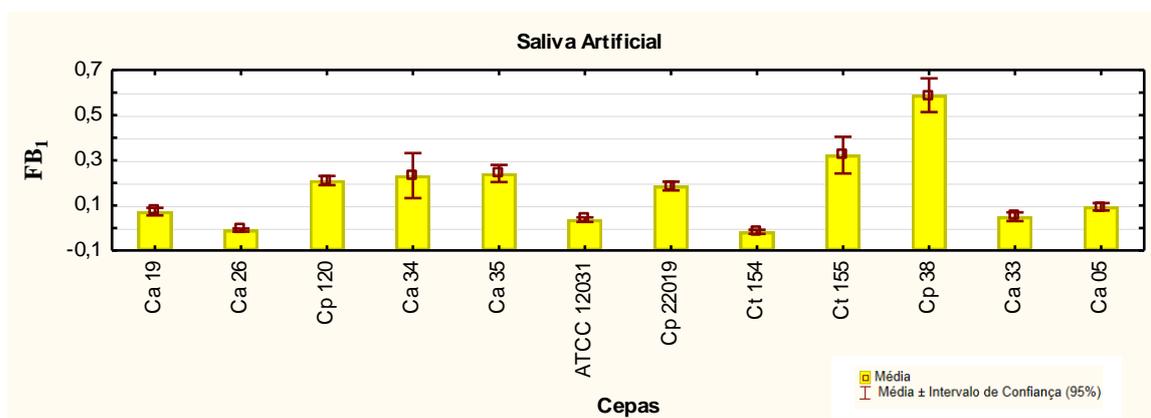


Gráfico 6: Formação específica de biofilme de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct) e *Candida parapsilosis* (Cp), no meio saliva artificial .

Detectou-se que no meio RPMI 1640 ocorreu maior formação de biofilme por leveduras de *Candida* sp. e que nesse meio as maiores formadoras de biofilmes foram: Ca12031, Cp38, Ca34 e a Ca05.

Os biofilmes são um nicho que conferem certa “proteção” aos micro-organismos, conferindo-os resistência aos tratamentos antimicrobianos e criando condições para fonte de infecções permanentes e resistentes. Estas estruturas são formadas em superfícies bióticas e abióticas com produção de matriz de exopolissacarídeos (CHANDRA *et al.*; 2001; LEWIS; 2001; COSTA; CANDIDO, 2009).

As espécies de *Candida* sp. possuem acentuada frequência de colonização e capacidade de provocar infecção no hospedeiro humano (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). *Candida albicans* possui maior capacidade de formação de biofilme que *Candida parapsilosis*

e *Candida tropicalis* e produz qualitativamente um biofilme mais complexo; mesmo *Candida parapsilosis* sendo uma boa formadora de biofilme (KUHN *et al.*, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003); além disso *Candida albicans* possui maior capacidade de crescimento, produção de enzimas hidrolíticas e atividade hemolítica (RORIG; COLACITE; ABEGG, 2009).

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA O-CARBOXIMETILQUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Candida albicans* E OUTRAS ESPÉCIES DE *Candida*

Na avaliação da atividade da O-CMQT na formação de biofilme das cepas de *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*, identificou-se que não houve inibição de forma significativa na formação de biofilme nas placas pré-tratadas em comparação com as placas não tratadas.

Contrariamente, foi observado aumento da formação de biofilme em duas cepas (Ca 12031 e Ca 05) com o tratamento de 24h em relação aos controles não tratados (Tabela 5).

	TRATAMENTOS COM O-CMQT			
	1hora		24 horas	
	Med	DP	Med	DP
Ca 12031*	1,376	0,386	1,246 [‡]	0,845
Ca 05	1,291	0,490	1,182 [‡]	0,239
Ca 19	0,643	0,159	1,220 [§]	0,124
Ca 26	0,778	0,558	1,104	0,340
Ca 33	1,227	0,296	1,412	0,293
Ca 34	1,297	0,087	1,277	0,611
Ca 35	1,042	0,386	1,336	0,459
Cp 22019*	0,108	0,045	0,864 [§]	0,127
Cp 120	0,143	0,055	1,788 [§]	0,597
Cp 38	1,179	0,273	1,212	0,450
Ct 154	1,034	0,382	1,169	0,294
Ct 155	0,194	0,086	0,723 [§]	0,231
Pcn	0,071	0,007	0,103	0,006
Pct	0,143	0,006	0,299	0,103

Tabela 5: Índice de Formação de Biofilme por *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct), *Candida parapsilosis* (Cp) em poços pré-tratados com *O*-CMQT em 1h e 24h. * Cepas ATCC 12031 e 22019. Pcn: Poços controle negativo. PC_{1h}: Poços controle tratamentos de 1h e 24h com *O*-CMQT, respectivamente.

£ = Diferença significativa entre os tratamentos e os controles não tratados ($p \leq 0,05$).

§ = Diferença significativa entre os tratamentos de 1h e 24h ($p \leq 0,05$).

Ao comparar o efeito de ambos os tratamentos com a *O*-CMQT foi detectado um aumento significativo de formação de biofilme em quatro cepas após o tratamento com 24h em relação ao tratamento de 1h, a saber, Ca 19, Cp 22019, Cp 120 e Ct 155 (**Gráfico 7**).

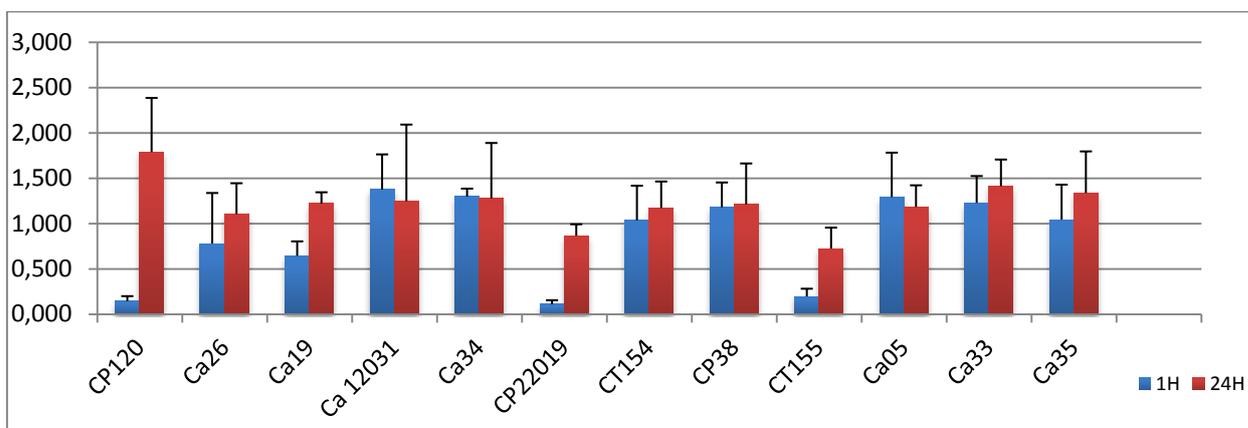


Gráfico 7: Formação de Biofilme de *Candida albicans* (Ca), *Candida tropicalis* (Ct) e *Candida parapsilosis* (Cp), em placas pré-tratadas com *O*-CMQT em um intervalo de tempo de 1h e 24h.

A *O*-CMQT induziu a formação de biofilme em apenas duas das leveduras testadas, após o tratamento de 24h. Tan *et al.* (2011), propuseram que a *O*-CMQT serve como agente antibiofilme, impedindo a aderência e inibindo a formação de biofilme por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ainda que não tenha sido observada esta atividade contra as leveduras testadas.

A ausência da atividade inibitória da *O*-CMQT na formação de biofilme pelas leveduras estudadas pode ter relação com a formação de película hidrofóbica sobre a superfície dos poços, pois a hidrofobicidade do composto pode estar correlacionada com uma maior capacidade de formação de biofilmes microbianos (BLANCO *et al.*, 2010).

Segundo Anitha *et al.* (2009), por meio de uma análise de potencial zeta, a *O*-CMQT possui superfície com cargas negativas, podendo essa característica ter relação com o aumento da formação de biofilme pelos fungos.

6 CONCLUSÕES

- Obteve-se na síntese da *O*-CMQT ganho de massa e na purificação perda de massa.
- O grau de substituição da *O*-CMQT é influenciado pelas condições do meio reacional e o tempo da reação.
- Todas as amostras da *O*-CMQT sintetizadas foram solúveis em água.
- Identificou-se solubilidade da *O*-CMQT em faixas de pH ácido-neutro-básico.
- A *O*-CMQT não apresentou citotoxicidade demonstrada pelo Teste de Letalidade de *Artemia salina* LEACH. nas concentrações avaliadas.
- Por meio da correlação dos valores obtidos pelas fórmulas, definiu-se que a FB₁ foi a mais indicada para análise da formação de biofilme neste estudo.
- O meio de cultura que propiciou a maior formação de biofilme foi o RPMI 1640.
- Em RPMI 1640, todas as amostras de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* formaram biofilme em níveis variáveis.
- As leveduras *Candida albicans* 34, *Candida albicans* 05 e *Candida parapsilosis* 38 foram as maiores formadoras de biofilme.
- A *O*-CMQT não inibiu significativamente a formação de biofilme das leveduras estudadas, entretanto observou-se aumento na formação de biofilme pelas cepas Ca 12031 e Ca 05 nas placas tratadas com *O*-CMQT em 24h.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, F.R. **Estudos de obtenção de carboximetilquitosanas e derivados entrecruzados e de sua interação com íons metálicos**. São Carlos, 96f, 2002. Dissertação (Mestrado Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais de São Carlos) Universidade de São Paulo, 2002.

ABREU, F.R.de.; CAMPANA-FILHO, S.P. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol.15, n.2, p.79-83, 2005.

ABREU, F.R.de. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. 182f. 2006. Tese (Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais- Universidade de São Paulo), 2006.

ABREU, F.R.de.; CAMPANA -FILHO, S.P. Characteristics and properties of carboxymethyl-chitosan. **Carbohydrate Polymers**. vol.75, p.214-221, 2009.

AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Bucal**. 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS, L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* e *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**. vol.55, p.999–1008, 2006.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO,M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **J Bras Patol Med Lab** , v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ANDRADE, I. P. B. **Efeitos do Vinagre em *Candida albicans* após Aderência *in vitro* em Resina Acrílica Termicamente Ativada**. 2006. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2006.

ANITHA, A.; RANI,V.V.D.; KRISHNA,R.; SREEJA,V.; SELVAMURUGAN,N.; NAIR, S.V.; TAMURA,H.; JAYAKUMAR,R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan *O*-carboxymethyl and *N,O*-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, n.78, p. 672 – 677, 2009.

ANITHA,A.; MAYA,S.; DEEPA,N.; CHENNAZHI,K.P.; NAIR,S.V.; TAMURA,H.; JAYAKUMAR,R. Efficient water soluble *O*-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, n.83, p. 492-461, 2011.

ANTONINO, N de A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueleto de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana**. João Pessoa, 89f, 2007. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Paraíba, 2007.

ASBECK, E.V.; CLEMONS, K.V.; MARTINEZ, M.; TONG, A.-N.; STEVENS, D.A. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. vol. 62, p. 106–109, 2008.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, vol.23, p. 27-34, 2007.

BARCHIESI, F.; CALABRESE, D.; SANGLARD, D.; FRANCESCO, L.F.D.; CASELLI, F.; GIANNINI, D.; GIACOMETTI, A.; GAVAUDAN, S.; SCALISE, G. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Jun., p. 1578-1584, 2000.

BARBIERI, D. S. V. **Análise da Aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na Superfície Dentária**. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BERNARDIS, F.de.; MONDELLO, F.; MILLÁN,R.S.; PONTÓN, J.; CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **J. Clin. Microbiol.**vol.37, n.11, 1999.

BARROS, F.C.F; CAVALCANTE, R.M.; CARVALHO, T.V.; DIAS, F.S.; QUEIROZ, D.C.; VASCONCELLOS, L.C.G.; NASCIMENTO,R.F. Produção e Caracterização de Esfera de Quitosana Modificada Quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polímero**.vol.7, n.4, Dez.,2006.

BIZERRA, F.C.; NAKAMURA,C.V.; POERSCH, C.de; SVIDZINSKI, T.I.E.; QUESADA,R.M.B.; GOLDENBERG,S.; KRIEGER, M.A.; YAMADA-OGATTA, S. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Res**. vol.8, p.442–450, 2008.

BLANCO, M.T.; SACRISTIÁN, B.; LÚCIO, L.; BLANCO, J.; PÉREZ-GIRALDO,C.; GÓMES-GARCIA,A.C. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulência em *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**. vol.27, n.04, p. 195- 199, 2010.

BRESOLIN, J.R. **Avaliação de O-carboximetilquitosana como excipiente de comprimidos matriciais contendo diltiazem**. 117f. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí), 2009.

BROWN, S. A.; PALMER, K.L.; WHITELEY, M. Revisiting the host as a growth medium. **Nature**, vol.6, p.657-666, 2008.

CAI, K.Y.; YAO,K.D.; LI,Z; YANG, Z.M.; LI, X.Q. Rat osteoblast functions on the O-carboxymethyl chitosan – modiWedpoly (D,L lactic acid) surface. **Journal of Biomaterial Science**. vol.12, p. 1303-1315, 2001.

CAIERÃO, J.; ANTUNES, A.G.; STEFENS,M.; MARCO,M.de; D’AZEVEDO,P.A. Novos antimicrobianos: Realidade e perspectivas. **NewsLab**.ed.66, 2004.

CALDERONE, R. A.; FONZIWA, W. A. Virulence factors of *C. albicans*. **Trends Microb.** v. 9, p. 327-335. 2001.

CAMPANA-FILHO, S.P.; DESBRIÈRES, J. **Chitin, chitosan and derivatives**. IN: FROLLINI, E.; LEÃO, A.L.; MATTOSO, L.H.C. Natural Polymers and Agrofibers Composites. USP; UNESP; EMBRAPA, p.41-71, 2000.

CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M.B. Propriedades e aplicações de quitosana. **Revista Processos Químicos**, n.2, p.9-20, 2007.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITO, de S.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de a⁻ e b⁻ quitina. **Química Nova**. vol.30, n.03, São Paulo, mai.- jun., 2007.

CAPELLETTI, R.V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006.81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CARASCHI, J.C.; CAMPANHA-FILHO, S.P. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio de carboximetilcelulose em solução aquosa. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, abr./ jun., 1999.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-HINDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**. 2002.

CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Universidade do Minho, 2004.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.de; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* LEACH. **Química Nova**. vol.3, n.1, 2000.

CEGELSKI, L.; MARSHALL, G. R.; ELDRIDGE, G.R.; HULTGREN, S.J. The biology and future prospects of antivirulence therapies. **Nature**, v.6, p.17-27, 2008.

CERRUTTI, B.M. **Biomacromoléculas Carboximetiladas: Atuação com agentes de Estabilização de suspensões de aquosas de alumina**. São Carlos, 139f, 2010. Tese (Doutorado em Ciências, Instituto de Química) Universidade de São Paulo, 2010.

CHAFFIN W.L, LÓPEZ-RIBOT J.L., CASANOVA M, GOZALBO D., MARTINEZ J.P. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62 (1): 130-180. 1998.

CHANDRA, J.; KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; HOYWER, L.L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. **Journal of Bacteriology**. set., p. 5385 – 5394, 2001.

CHEN, L.; DU, Y.; WU, H.; XIAO, L. Relationship between molecular structure and moisture-retention ability of carboxymethyl chitin and chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v.83, p.1233-1241, 2002.

CHEN, L. *et al.* The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, v.23, p.4609-4614, 2002.

CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture – absorption and moisture- retention abilities of carboxymethyl chitosan : II. Effect of degree of desacetylation and carboxymethylation. **Carbohydrate Research**. v.338,n.4, p.333-340, 2003.

CHEN, X.G.; PARK, H.J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**.vol. 53, p. 355–359, 2003.

CHEN, XI-GUANG; PARK, HYUN-JIN. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**. vol. 53, p. 355–359, 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.M.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S.B. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** vol. 34, p. 281–286, 1999.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol.36, n.05, set.-out., 2003.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.da; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.** vol.44, n.8, 2006.

CORRÊA, J.M.; PENAFORT, J.M. Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* SP. (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca). **REDVET - Revista electrónica de Veterinaria**. vol.12, n.12, 2011.

COSTA, K.R.C.da; CANDIDO, R.C. O papel do biofilme de *Candida* na infecção. **Newslab**. vol. 16, n.94, 2009.

DAROZ, L.R.D.; LOPES, J.B.; DALLAN, L.A.O.; CAMPANA-FILHO, S.P.; MOREIRA, L.F.P.; STOLF, N.A.G. Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termoestéril. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** vol. 23, p. 480-487, 2008.

DESNOS-OLIVIER, M.; BRETAGNE, S.; BERNÈDE, C.; ROBERT, V.; RAOUX, D.; CHACHATY, E.; FORGET, E.; LACROIX, C.; DROMER, F. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. **Emerging Infectious Diseases**. vol.14, n.04, apr., 2008.

DONLAN, R. M.; COSTERTON. J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Atlanta, Georgia v. 15, n. 2, p.167-193, 2002.

DORNELAS-RIBEIRO, M.; PINHEIRO, E.O.; GUERRA, C.; BRAGA-SILVA, L.A.; CARVALHO, S.M.F.de; SANTOS, A.L.S.dos; ROZENTAL, S.; FRACALANZZA, S.E.L. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro. vol. 107, n.1, p. 31-38, Febr., 2012.

DUNG, P.L.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymer**, v.24, p.209-214, 1994.

GÁCSEER, A.; TROFA, D.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J.D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. **The Journal of Clinical Investigation**. vol.117, n.10, Oct., 2007.

GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.L.; PÉREZ-GIRALDO, C.; GARDUÑO, E.; BRUQUE, J.M.; GÓMEZ-GARCÍA, A.C. Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. **Appl. Environ. Microbiol.** vol.68, n.5, 2002.

GE, H.C.; LUO, D.K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**. p. 1351-1356, 2005.

GOKCE, G.; CERIKCIOGLU, N.; YAGCI, A. Acid proteinases, phospholipases and biofilm production of *Candida* Species isolated from blood cultures. **Mycopathologia**. vol.9, p. 164-265, 2007.

GOMES, L.P.; OLIVEIRA, C.I.R.de; SILVA, M.C.da; ANDRADE, C.T.de; AGUILA, E.M.D.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. **Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinifera* L. CV RED GLOBE)** para a produção de quitosana a partir da quitina de camarão. **Quim.Nova**. vol. 33, n.9, p.1882- 1886, 2010.

GONDIM, B.A.; BRITO D.V.D.de; BRITO C.S.de; DONLINGER, E.J.O.V.; ABDALLAH, V.O.S.; FILHO, P.P.G. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em neonatos críticos. **Arq.Cien.Saúde**. vol.16,n.3,p.105-9, jul.-set., 2009.

GUJARATHI, N.A.; RANE, B.R.; PATEL, J.K. pH sensitive polyelectrolyte complex of O-carboxymethyl chitosan and poly (acrylic acid) cross-linked with calcium for sustained delivery of acid susceptible drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. vol.436, p.418-425, 2012.

GUO, Z.; CHEN, R.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; PIBO, W.; LI, C.; LI, P.. Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. **Carbohydrate Research**. vol. 341, p. 351–354, 2006.

HENNING, M. M.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida albicans* en cavidade bucal. **Acta Odontológica Venezolana**, Caracas, v. 39, n. 2, abr. 2001.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida albicans* and *dublinskiensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. **British Journal Of Biomedical Science**, v. 63, n. 1, 2005.

HÉQUET, A.; HUMBLLOT, V.; BERJEAUD, J.M.; PRADIER, C.M. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.84, p.301-309, 2011

HERNÁNDEZ, L. La Quitosana: Un Producto Bioactivo de Diversas Aplicaciones. **Cultivos Tropicales- Redalyc-**, v.25, n. 3, p.97-110, 2004.

IGARASHI, M. A. **Pubvet**,v 2,n.31, Ed. 42, Art. 386, 2008.

JAIN, N *et al.* Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. **Applied and Environmental Microbiology**. New York, vol. 73, n.6, p.1697-1703, mar., 2007.

JUNIOR, J.J.W.; CHAMBERLAND, M.E.; WARD, J.; WILLY, M.; PADHYE, A.A.; SOLOMON, S.L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. **J. Clin. Microbiol.**vol.25, n.6, 1987.

KATRAGKOU, A.; CHATZIMOSCHOU, A.; SIMITSOPOULOU, M.; DALAKIOURIDOU, M.; DIZA-MATAFTSI, E.; TSANTALI, C.; ROILIDES, E. Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilm. **Antimicrob. Agents Chemother.**vol.52, n.1, 2008.

KRISHNARAJU,A.V.; RAO,T.V.N.; SUNDA RARAJU,D.; VANISREE, M.; TSAY,H.S.; SUBBARAJU, G.V. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **Internacional of Applied Science and Engineering**.vol.3, n.2,p.125-134, 2005.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**. vol. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v.26, p.1921-1971, 2000.

KUHN, D.M.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. **Infection and Immunity**. fev., p. 878-888, 2002.

LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: EPU e EDUSP, p. 190, 1980.

LAMAS, J.C. **Carboximetilquitosanas**: Preparação, caracterização e aplicação como agentes de estabilização de suspensões aquosas de alumina. 2008.103f. Dissertação (Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo), 2006.

LASKER, B.A.; BUTLER, G.; LOTT, T.J. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. **J.Clin. Microbiol.** vol.44, n.3, 2006.

LEITE, F.; MODESTO, C.M.D.; NASCIMENTO, R.F. do; DIAS, F.S. Adsorção de Cd (II) de soluções aquosas com microesferas de N-carboximetilquitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. vol. 6, n. 3, 2005.

LEVY,I.; RUBIN,L.G.; VASISHTHA,S.; TUCCI,V.; SOOD,S.K. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. **CID**. vol.26, may.,1998.

LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. apr., p.999-1007, 2001.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litbucal catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.02, n.16, p. 158-163, abr.-jun., 2006.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**. p. 353- 362, 2003.

LIMA, T.D.; FERNANDES, O.de F.L.; SOUZA, L.K.H.e; PASSOS, X.S.; SILVA, M.doR.R. *Candida albicans* de mucosa vaginal: Morfotipagem e produção de proteinase. **Revista de Patologia Tropical**. vol.33, n.1, jan.-jun., p.65-70, 2004.

LUNA,J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA,M.C.; MENDONÇA,F.A.C.; BIEBER,L.W.; SANT'ANA,A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacol**. vol.97, n.2, p. 199-206, 2005.

MARTINS, P. **Avaliação da atividade antimicrobiana, mutagênica e toxicidade aguda de derivados anfílicos da O-Carboximetilquitosana**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado acadêmico em ciências farmacêuticas- Universidade do Vale do Itajaí), Itajaí, 2010.

MACÊDO, M.de O.C.; MACÊDO, H.R.A.de; BARBOSA, J.C.P.; NETO, C.L.de B.G.; PEREIRA, M.R.; JÚNIOR, C.A. O uso do plasma de nitrogênio para modificação superficial em membranas de quitosana. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde** [online]. 2011.

MACHADO, K.E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* BERG**. 83f. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Vale do Itajaí. 2005.

HENNING, M.M.de; PERRONE,M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecologia de *Candida albicans* em cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez**.vol.39, n.2, p.55-59, 2001.

MAGRI, M.M.C. **Caracterização molecular e perfil de sensibilidade de *Candida tropicalis* isoladas em corrente sanguínea e cateter de pacientes internados em hospitais de ensino**. 2012. (138 f). Tese (Programa de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina). Universidade de São Paulo, 2012.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **RBAC**. vol. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARTINEZ, L.R.; MIHU, M.R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R.J.B.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A.J.; FRIEDMAN, J.M.; NOSANCHUK, J.D. The use chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v.31, p.669-679, 2010.

MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, O.C. Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Ciênc. Odontol. Bras**. vol. 5, p. 75-85, 2002.

MARTINS, P.C. **Quitosana como catalisador na transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel**. Brasília, 63f, 2008. Dissertação (Mestrado em Química – Instituto de Química) Universidade de Brasília, 2008.

MARTINS, P. **Avaliação da atividade antimicrobiana, mutagênica e toxicidade aguda de derivados anfílicos da O-carboximetilquitosana**. Itajaí, 83f, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, 2010.

MARSH, P.; MARTIN, M.V. **Microbiologia Bucal**. São Paulo: Editora Santos, 4 ed., 192 p., 2005.

MATOS, B. M. *et al.* Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita*. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, vol. 38, n. 4, p. 244-48, jun./ago, 2009.

MEDRANO, D.J.A.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.de A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORST, S.H.B.; SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian hospital: The importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**.vol.48, n.1, p.17-20, Jan. – Febr., 2006.

MELLO, K.G.P.C.de. **Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana**.2009. 99f. Tese (Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-farmacêutica- Universidade de São Paulo), 2009.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**.vol. 45, p. 31-34, 1982.

MOLINAS-SALINAS, G.M.; SAID-FERNÁNDEZ, S. A modified microplate cytotoxicity with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**.vol.3, p.633-638, 2006.

MONAGAS, S.A.F. Características hidrodinâmicas de carboximetilquitina y carboximetilquitosana. **Rev. Cubana Farm.** vol.34, p. 6-11, 2000.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO,L. Quitina e quitosana produzidas a partir de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**. Rio Grande. vol.16, p.37-48, 2006.

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

MUZZARELLI, R.A.A. Carboxymethylated chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.8, p.1-21, 1998.

NASCIMENTO, J.E.; MELO A.F.M.; LIMA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.1; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*). **Rev. Ciênc. Farm. Básica**. vol.29, n.2, p.145-150, 2008.

NAVES, P.L.F. *et al.* Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microb. Pathogen**. vol.45, p.88-91, 2008.

NAVES, P.L.F. **Formación de biopelículas por “*Escherichia coli*” y su correlación con factores de virulência:** Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. 2009, 164 f. Tese (Universidad Complutense de Madrid- Facultad de Farmacia), 2009.

NAVES, P.L.F.; PRADO, G.del; HUELVES, L.; RODRÍGUES-CERRATO,V.; RUIZ,V.; PONTE, M.C.; SORIANO,F. Effects of human serum albumin, ibuprofen and *N*-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. **Journal of Hospital Infection**.vol.76, oct., p.165-170, 2010.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.I.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potencial virulence factors of *Candida tropicalis* isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**. vol.169, n.3, p.175-182, mar., 2010.

NEGRI, M.; SILVA, S.; BREDÁ, D. HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida tropicalis* biofilms: Effect on urinary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**. vol 53, p. 95-99, 2012.

NETO, R.S.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.de; MARCANTONIO, R.A.C.; JÚNIOR, E.M. Biomateriais a Base de Quitosana com Aplicação Médica e Odontológica: Revisão de Literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.37, n.2, p.155-161, 2008.

NIKAWA, H.; NISHIMURA,H.; HAMADA,T.; SADAMORI,S. Quantification of thigmotropismo (contact sensing) of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Mycopathologia**. p.13-19, 1997.

NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; HENTATI, H.; MAHDOUANI, K; DEL CASTILLO, L.; VALENTIN, L.; *et al.* Adhesive propierties and hydrolytic enzymes of bucal *Candida albicans* strains. **Mycopathologia**, n. 169, p.269-278, 2010.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine bucal acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. vol. 8, n.5, p. 395–400; 2001.

PFALLER,M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL,V.A.; COLOMBO,A.; Ng,K.P.; FINQUELIEVICH, J.; BARNES, R.; . WADULA, J. Geographic and tempbucal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the Artemis Disk Antifungal Surveillances Program, 2001 to 2005. **J. Clin. Microbiol**. vol.46, n.3, 2008.

PISUTTHANAN,S.; PLIANBANGCHANG,P.; PISUTTHANAN,N.; RUANRUAY,S.; MUANRIT,O. Brine shrimp activity of thai medicinal plants in the family Meliaceae. **Naresuan University Journal**. vol. 12, n. 2, p.13-18, 2004.

RABÊLO, W.F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação antimicrobiana do óleo essencial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*).**76 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Universidade Federal do Maranhão, 2010.

RAHMAN, Atta-ur; CHOUDHARY, M.Iqbal; THOMSON, W. J. Bioassay techniques for drug development. **Harwood academic publishers**, 2001.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: An Update. **American Society for Microbiology**. vol.04, n.04, p.633-638, apr., 2005.

RAMIREZ, C.C.; SALCIDO, N.M.de la F.; CANO,R.D.P.; ORTIZ-RODRÍGUES,T.; CORONA,J.E.B. Potencial de los quito-oligosacarídeos generados de quitina e quitosana.**Acta Universitaria**.vol.21, n.03, set.-dez., 2011.

RAMOS, P.P.; MONAGANAS, S.A.F.; REVOREDO, O.B.; LEDEA, D.F.; LÓPEZ, L.M. Parámetros quimicofísicos de la carboximetilquitosana. **Rev. Cubana Farm**. vol.39, 2005.

REIS, N.T.P.dos; LELIS, T.C.; MENDONÇA, A.T.; CHAVASCO, J.K. Avaliação da ação de extratos vegetais sobre a formação de biofilme por *Candida albicans*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, vol. 9, n. 2, p. 337-343, ago.- dez. 2011.

RIBEIRO, M. A. **Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência ao fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas**. 2002. 156 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

RIBEIRO, E. L. **Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. London: The Macmillan Press LTD, 1992, 349 p.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P.L.Characterization of fully deacetylation chitosan. influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**. vol.15, p.281-285, 1993.

RORIG, K.C.O.; CALOCITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol.42, n.02, mar.-abr.; p. 225-227, 2009.

ROSA, T.R.O. **Síntese de derivados anfífilos da *O*-carboximetilquitosanae aplicações de solubilidade de fármaco pouco solúvel (triancinolona)**. 2008.134f. Dissertação (Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas- Universidade do Vale do Itajaí), Itajaí, 2008.

ROSSI, T.de.; LOZOVYOY,M.A.B.; SILVA, R.V.da; FERNANDES, E.V.; GERALDINO, T.H.; COSTA, I.C.; SARIDAKIS, H.O.; WATANABE, M.A.E.; FELIPE,I. Interações entre *Candida albicans* e o hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.32, n.1, jan.-jun., p. 15-28, 2011.

SANCHÉZ, Y.; PINO, O.; LAZO,F.J.; ABREU,J.; NARANJO,E.; IGLESIA, A. Actividad Promisoria de aceites esenciales de espécies pertenencientes a la tribu Pipereae frente a *Artemia salina* y *Xanthomons albilineans*. **Rev.Protección.Veg**. vol.26, n.1, p.45-51, 2011.

SANTANA, D.P.; THAGIANE, R.; SOUZA, S.O.de; NAVES,P.L.F.; RIBEIRO,E.L. Prevalência de fatores de virulência de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças portadoras e não portadoras de Síndrome de Down. **Enciclopédia Biosfera**. vol. 6, n.11, Goiânia, 2010.

SANTOS, J.E.dos; SOARES, J.da P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA-FILHO, S.P; CAVALHEIRO, E.T.G . Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**.vol.13, n.4, p.242-249, 2003.

SANTOS, M.C.; CIRILO, A.T.de O.; NUNES, M.L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, vol. 7, n.9, 2011.

SARVIKIVI, E.; LYYTIKÄINEN, O.; SOLL, D.R.; PUJOL, C.; PFALLER,M.A.; RICHARDSON,M.; KOUKILA-KÄHKÖLÄ,P.; LUUKKAINEN,P.; SAXÉN,H. Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol**.vol.43, n.3, 2005.

SCHERMA, A. P.; SANTOS, P.V.O.; JORGE, A.O.C.; ROCHA, R.F. Presença de *Candida* spp na cavidade bucal de lactantes durante os primeiros quatro meses de vida. **Cienc Odontol Bras**, vol.7, n. 3, p. 79-86, 2004.

SEVERINO, P.; VASCONCELLOS, F. da C.; FIGUEIREDO, E.S.de. Uso tópico de quitosana em oftalmologia. **Rev.Bras.Farm**. n.88, v.4, p. 155- 158, 2007.

SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S.P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol.10, p. 63-68, 1998.

SIGNINI, R; CAMPANA-FILHO, S.P. Características e Propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol.11, n.2, p.58-64, 2001.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.dos; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**. vol. 29, n.04, São Paulo, jun./aug., 2006.

SILVA, D. de S. de. **Estudos físico-químicos de O-Carboximetilação de quitosana**. 2011.102f. Dissertação (Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo), 2011.

SIMÕES,M; BENNETT,R.N.; ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**. vol.26, p.746-757, 2009.

SOLIS, P.N., WRIGHT, C.W., ANDERSON, M.M., GUPTA, M.P., PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Med**. vol.59, p.250-252, 1993.

SORGELOOS, P.; LAVENS, P.; LEGER, P.; TACKAERT, W.;VERSICHELE, D. Manual para el cultivo y uso de artemia em acuicultura. **Project reports**, n.10, 312p., 1986.

SUN,L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN,X.; YANG,J. Preparation characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp cap. **Polymer**. vol.47, p.1796-1804, 2006.

SUZUKI, L. C. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans in vitro* para estudo da terapia fotodinâmica.** 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp. Isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** n.1, vol. 40, jan.-fev., p.91-93, 2007.

TANG, H.; ZHANG, P.; KIEFT, T.L.; RYAN, S.J.; BAKER, S.M.; WISMANN, W.P.; ROGELJ, S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. **Acta Biomaterialia.** vol.6, p.2562-2571, 2010.

TAN, Y.; HAN, F.; MA, S; YU, W. Carboxymethyl chitosan prevents formation of broad-spectrum biofilm. **Carbohydrate Polymers.**vol.84,p.1365–1370, 2011.

TEIXEIRA, M.L.; MEZZARI, A. Prevalência de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* em próteses dentárias. **NewsLab.** ed.70, 2005.

TROFA, D.; GÁCSE, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, na emerging fungal pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.** vol.21, n.4, 2008.

URIZAR, J.M.A. Candidíasis bucales. **Rev Iberoam Micol,** vol.19, p. 17-21, 2002.

VALLE, G. C.; RENDE J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab,** ed. 101, p. 202-222, 2010.

VARO, S.D.; MARTINS, C.H.G.; CARDOSO, M.J.de O.; SARTORI, F.G.; MONTANARI, L.B.; PIRES-GONÇALVES, R.H. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** vol. 40, n.3, p. 326-331, mai-jun, 2007.

VELÁSQUEZ, C.L. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. **Revista Iberoamericana de Polímeros.** vol.4,n.2, 2003.

VIDIGAL, P.G.; SVIDZINSKI, T.I.E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: Infecção fúngica ou não?. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol. 45, n.1, p.55-64, fev., 2009.

VIEIRA, J. D. G. *et al.* *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** vol. 38, n. 5, p. 383-386, set/out. 2005.

YIN, L.; FEI, L.; CUI, F.; TANG, C.; YIN, C. Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid-co-acrylamide) / O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. **Biomaterials.** n.28, p.1258-1266, 2007.

YU, C.; LIU, Y.-F.; TANG, H.-L.; TAN, H.-M. Study of Carboxymethyl Chitosan- based Polyampholyte superabsorbent Polymer (Parte II): Investigating the State of Water in CMCTS. **Iranian Polymer Journal.** vol.19, n.6, p.417-425, 2010.

ZHAO, Z.; WANG, Z.; WANG, N.S. A novel N,O-carboxymethyl amphoteric chitosan/poly(ethersulfone) composite MF membrane and its charged characteristics. **Desalination**. vol.144, p. 35-39, 2002.

ZHAO, L. *et al.* Radiation synthesis and characteristic of the hidrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. **Carbohydrate Polymers**. vol.51, p.169-175, 2003.

ZHU, A.; CHAN-PARK, M.B.; DAI, S.; LI, L. The aggregation behavior of O-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. vol. 43, p. 143–149, 2005.

ZHU, A.P.; FANG, N.; CHAN-PARK, M.B.; CHAN, V. Interaction between O-carboxymethylchitosan and dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayer. **Biomaterials**. vol.26, p. 6873–6879, 2005.

ZHU, A.P.; ZHAO, F.; FANG,N. Regulation of vascular smooth muscle cells on poly (ethylene terephthalate) film by O-carboxymethylchitosan surface immobilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. vol. 50, p.120-125, 2006.

ZHU, A.P.; JIN, W.; YUAN, L.; YANG, G.; YU, H.; WU, H. O-carboxymethylchitosan – based novel gatifloxacin delivery system. **Carbohydrate Polymers**. vol.68, p. 693-700, 2007.

8 ANEXOS

OBTENÇÃO E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DA QUITINA, QUITOSANA E CARBOXIMETILQUITOSANA

CHARLES LIMA RIBEIRO (UEG)

charles20lima@gmail.com

ROBERTA SIGNINI (UEG)

roberta.signini@ueg.br

PLÍNIO LÁZARO FALEIRO NAVES (UEG)

plinionaves@ueg.br

Resumo: A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás somente da celulose. Em laboratórios pode ser obtida através dos processos de desproteíntização, de desmineralização e de despigmentação de vários materiais biológicos oriundos de animais invertebrados e alguns fungos. Devido às diversas propriedades biológicas descritas, notadamente a baixa toxicidade, a quitina e seus derivados vêm sendo cada vez mais utilizados em distintos ramos, principalmente na medicina e biomedicina. A quitosana é um dos derivados da quitina, obtidos através do processo de desacetilação parcial em meio alcalino, e por mais de 70 anos vem ganhando importância biotecnológica em áreas diversas que compreendem desde a agricultura até a medicina; sua ampla utilização deve-se basicamente a seu amplo espectro de propriedades que compreendem sua biocompatibilidade e a biodegradabilidade. No entanto, suas aplicações esbarram na insolubilidade da quitosana em meio neutro e alcalino, objetivando-se contornar esta característica, propõem-se modificações químicas a fim de ampliar ainda mais suas aplicações. Assim a carboximetilação da quitosana é um dos processos mais importantes, a partir da qual a quitosana torna-se solúvel em pH neutro e alcalino, fato que faz da carboximetilquitosana um composto cada vez mais pesquisado nas áreas médica e farmacêutica.

Palavras-chave: Quitina, Quitosana, Carboximetilquitosana.

“A quitina, a quitosana e seus derivados exibem um potencial ilimitado de aplicações para seu uso em grande escala”.

AZEVEDO *et al.*, 2007 (*Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais*)

QUITINA E QUITOSANA

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, atrás somente da celulose. Foi isolada pela primeira vez no ano de 1811 através de estudos realizados com fungos, em 1823 identificou a presença deste polímero nas carapaças de insetos e logo deduziu-se sua presença nos demais animais invertebrados como cnidários, anelídeos, moluscos e demais artrópodes, além disso, foi descrita a ocorrência de quitina em fungos - basidiomicetos, ascomicetos, zigomicetos e deuteromicetos - e algas (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; ROBERTS, 1992; SANTOS *et al.*, 2011; VELÁSQUEZ, 2003).

A quitina está associada a proteínas, materiais inorgânicos, pigmentos e lipídios, no entanto, encontrou-se quitina pura em algas diatomáceas *Thalassiosira fluviatilis* e *Cyclotella cryptica*. Por estar associada a diversos componentes celulares é necessário isolá-la utilizando-se alguns métodos que compreendem a desproteinização, a desmineralização e a despigmentação (ANTONINO, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; SIGNINI, 2002). Para a desproteinização utiliza-se diferentes tipos de solventes e enzimas, na desmineralização o tratamento é realizado a partir de variados ácidos em concentrações diferentes e na despigmentação utiliza-se basicamente etanol ou acetona (SIGNINI, 2002).

A quitina é um polímero constituído por uma sequência de monômeros de 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligações glicosídicas β no sentido $1 \rightarrow 4$ – com predomínio da porção 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose-, e apresenta característica de sólido cristalino, conforme pode ser verificado na **Figura 1** (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2006; RAMIREZ *et al.*, 2011).

De uma forma geral este polímero é insolúvel em água, solventes orgânicos, ácido diluído e álcalis, e solúvel em ácidos minerais concentrados que provocam uma gradativa degradação do polímero (CAMPANA-FILHO *et al.*; 2007; MATHUR; NARANG, 1990; MOURA *et al.*, 2006; RAMIREZ *et al.*, 2011). A quitina possui cadeia linear e três estruturas polimórficas diferentes: α , β e γ que se diferenciam basicamente devido suas disposições nas lamelas que formam o polímero, sendo as estruturas α e β as mais comuns (ANTONINO, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; ROBERTS, 1992).

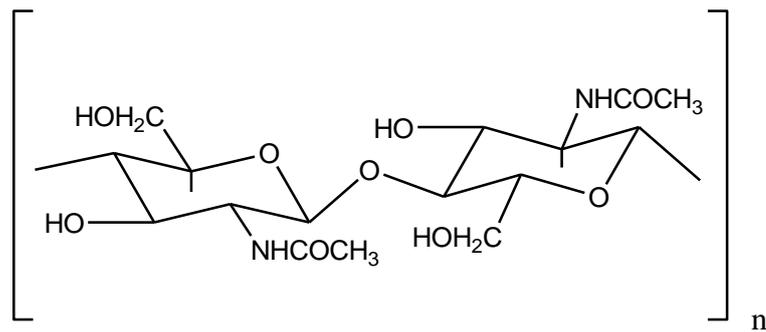


Figura 1: Estrutura primária da quitina, onde n é o grau de polimerização.

A quitina apresenta um alto potencial de utilização na área da saúde devido sua baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade, e por estes motivos está sendo cada vez mais empregada também na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos, entretanto, para tais aplicações faz-se importante garantir a pureza do polímero (AZEVEDO *et al.*, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; MATSUI, 2007).

A obtenção da quitosana pode ocorrer de maneira homogênea ou heterogênea. No primeiro caso, utiliza-se solução aquosa alcalina, enquanto que no segundo utiliza-se dimetilacetamida-cloreto de lítio (SIGNINI, 2002). Através do processo de desacetilação parcial em meio alcalino a quitina transforma-se em quitosana; um polímero constituído basicamente por uma sequência linear de co-polímeros de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose, em uma quantidade variando de 50-60% do total da biomassa do polímero (**Figura 2**), com uma massa molar variando de 10.000 até a ordem de milhões de Daltons (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; VELASQUÉZ, 2003; YU *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ, 2004).

No entanto, a quitosana também pode ser encontrada na natureza, em espécies de fungos do gênero *Mucor* e *Zygomycetes* (ROBERTS, 1992; AZEVEDO *et al.*, 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

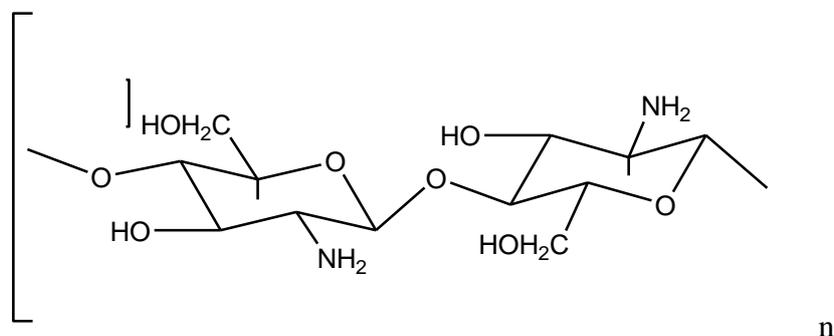


Figura 2: Estrutura química da quitosana, onde n é o grau de polimerização.

Apesar da quitosana ter sido descoberta a mais de 150 anos, suas propriedades e aplicações biotecnológicas só vêm sendo estudadas a cerca de 70 anos (AZEVEDO *et al.*, 2007; MUZZARELLI, 1998; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Devido ao fato de ser preparada a partir de matérias-primas renováveis relativamente baratas, como rejeitos da indústria pesqueira e apresentar diferentes possibilidades de manipulação, desde géis até suportes celulares e carreadores de fatores de crescimento, a quitosana desperta interesse na comunidade científica de diversas áreas (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005; SPIN-NETO *et al.*, 2008).

Propriedades tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e interação com diferentes tipos de substâncias torna sua aplicação biotecnológica ampla, principalmente nas áreas de farmácia, indústria de alimentos, de cosméticos, odontologia, agricultura e no tratamento de água (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2005; CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007; GOMES *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2010).

A quitosana é um polímero policatiônico, trombogênico, com afinidade por determinadas enzimas, que possui ampla capacidade de bioatividade diversas tais como: ação antimicrobiana, efeitos coagulante, analgésico, hipocolesterolêmico, hipolipidêmico, quelante, atua efetivamente na aceleração da cicatrização e no funcionamento celular, com atividades antioxidantes e inibitórias da apoptose e redução da massa corporal (AZEVEDO, 2007; MOURYA *et al.*, 2010; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SEVERINO *et al.*, 2007).

Tais propriedades, assim como sua solubilidade e atividades biológicas citadas anteriormente, possuem relação com o grau médio de cargas do polímero e sua consequente distribuição ao longo das cadeias poliméricas (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

Sua destacada ação antimicrobiana pode ser explicada devido à presença de grupos amínicos que, por sua vez, quando em contato com os fluídos fisiológicos, são protonados, ligando-se a grupos aniônicos presentes nos micro-organismos e desencadeando a aglutinação das células microbianas e consequentemente inibindo o crescimento. Tal atividade pode, ainda, estar relacionada às propriedades físico-químicas do polímero e a características específicas da membrana de certos micro-organismos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SEVERINO *et al.*, 2007).

Não obstante, a quitosana possui alguns fatores que limitam sua utilização em diversas aplicações, como, por exemplo, o fato de possuir solubilidade em meio ácido e insolubilidade em meio neutro ou alcalino, devido aos grupos amino se apresentarem como

ácidos fracos ($pK_a \approx 6,5-7,0$) (CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007). A solubilidade da quitosana depende principalmente do grau médio de cargas que os polímeros possuem, além da distribuição das mesmas ao longo da cadeia polimérica; e tais comportamentos inerentes à solubilidade da quitosana devem-se a preservação parcial dos domínios com interações associativas dos polímeros de partida (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

Devido a este fato, há a necessidade de se realizar modificações químicas na estrutura da quitosana para produzir derivados que possuam um espectro mais amplo de utilizações. Um dos processos que pode ser empregado é a carboxilação; neste processo podem ser introduzidos novos grupos funcionais nas sequências monoméricas, basicamente nas repetidas unidades dos grupos hidroxila e amino, com o objetivo de ampliar as propriedades inerentes ao polímero, tais como a biocompatibilidade e estabilidade química, por exemplo (CAMPANA-FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007; NGAH *et al.*, 2002).

Dentre os diversos derivados de quitosana, encontram-se por exemplo a N-succinilquitosana, a N-carboximetilquitosana, a N-carboxibutilquitosana e a O-carboximetilquitosana, sendo os compostos carboximetilados os mais importantes (GUO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

CARBOXIMETILQUITOSANA

A carboximetilquitosana é o derivado de quitosana considerado mais interessante, devido a sua capacidade de dissolução em água e em uma ampla faixa de pH. Tal propriedade deve-se a modificação sofrida por este polímero, na reação de carboximetilação, conferindo por exemplo, capacidade de adsorção e/ou seletividade e otimização da ação antifúngica (CHEN *et al.*, 2002; CHEN; DU; ZENG, 2003; CHEN; PARK, 2003; GUO *et al.*, 2006; LEITE *et al.*; 2005; ZHAO *et al.*, 2003).

Devido às propriedades de ação em meios neutros, o seu espectro de utilização pode ser ampliado em diferentes ramos das áreas médicas e farmacêuticas. Ainda sim, tais características são encontradas não só em derivados carboxilados, mas também em sais de amônio quartenário e em derivados N-alquilados e N-acilados (ROBERTS, 1992).

A carboximetilação da quitosana leva à produção de derivados O-, N- ou N,O-substituídos, sendo que a diss substituição nos grupos amino também pode ocorrer, gerando derivados N,N-substituídos, sendo estes os únicos derivados da quitosana que apresentam tanto, grupos $-COOH$, quanto grupos $-NH_2$ (CHEN; PARK, 2003; DUNG; MILAS;

MUZZARELLI, 1998; RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993; ZHAO.; WANG, Z.; WANG, N.S., 2002).

A *O*-carboximetilação da quitosana, por exemplo, é geralmente produzida por reação do biopolímero com ácido monocloroacético em suspensão com isopropanol e solução aquosa de hidróxido de sódio à temperatura ambiente; a *N*- carboximetilação é geralmente realizada com ácido glioxílico, com redução posterior do cianoborodreto de sódio; a *N,O*-carboximetilação já apresenta como um subproduto dos processo de *N*-carboximetilação e *O*-carboximetilação, enquanto a *N,N*-dicarboximetilação é obtida na presença de um excesso de ácido glioxílico (ABREU, 2002; ABREU, CAMPANA-FILHO, 2005; ROBERTS, 1992).

A carboximetilquitosana apresenta estabilidade térmica, à aproximadamente 250°C, fato que permite sua esterilização por calor húmido sem, contudo alterar suas propriedades físico-químicas, além de um ponto isoelétrico igual a 4. Também é um polímero polieletrólito que possui uma equivalência de cerca de 3% e 4% para grupos amínicos e carboxílicos, além de um pK_a igual a 3,2 e uma rotação óptica específica igual a 0,735 (DAROZ *et al.*, 2008; MONAGAS, 2000; RAMOS *et al.*, 2005).

A escolha adequada das condições e dos reagentes a serem empregados nas derivações permite a obtenção de *N*-, *O*-, ou *N,O*-substituídos, pois a carboximetilação da quitosana pode ocorrer em dois sítios reativos: quando o sítio reativo for o agrupamento amínico obtém-se a *N*-carboximetilquitosana, quando o sítio reativo for o agrupamento hidroxila obter-se-á a *O*-carboximetilquitosana (CAMPANA-FILHO; DESBRIÈRES, 2000; CERRUTTI, 2010; CHEN *et al.*, 2002; KURITA, 2000).

As características mais frequentemente avaliadas nos produtos resultantes das diferentes reações de carboximetilação são o grau médio de acetilação, o grau médio de substituição, a massa molar, a cristalinidade, a solubilidade, o teor de cinzas, o grau de umidade, cujas importâncias relativas serão dependentes de qual uso terá a amostra considerada, como a observância da massa molar assim como da variação da viscosidade, por serem fatores que interferem na atividade biológica dos polímeros e nas características inerentes aos polieletrólitos (MONAGAS, 2000; NETO *et al.*, 2008).

A carboximetilquitosana, então, apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas tais como baixa toxicidade, biocompatibilidade e boa correlação na formação de películas, fibras e hidrogéis, apresentando bons resultados no tratamento de lesões da mucosa oral e dermatológicas, como agente desintegrante e na formação de complexos lipoprotéicos de baixa densidade e estabilização de emulsões (CHEN *et al.*; 2005; MONAGAS, 1998; MONAGAS *et al.*, 1998; MUZZARELLI, 1998).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A quitina e seus derivados como a quitosana e carboximetilquitosana, cada vez mais chamam a atenção da comunidade científica devido ao fato da amplitude de suas propriedades e utilizações, são compostos de baixo custo, por fazerem parte da biomassa pesqueira que é rejeitada. Suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não tóxico, particularmente são características que fazem com que tal composto apresente uma gama mais diversa de aplicações em diferentes áreas; além a produção destes compostos não necessita de produtos e procedimentos muito onerosos.

Abstract: Chitin is the second most abundant polysaccharide in nature, second only to cellulose. In laboratories can be obtained through the processes of deproteinization, demineralization and depigmentation of various biological materials derived from invertebrates and some fungi. Due to the diverse biological properties described, notably low toxicity, chitin and its derivatives are being increasingly used in different branches, mainly in medicine and biomedicine. Chitosan is derived from chitin one obtained through the process of partial deacetylation in alkaline medium, and for more than 70 years biotechnology has been gaining importance in several areas that comprise this agriculture to medicine, its widespread use is due primarily to its broad spectrum of properties that comprise its biocompatibility and biodegradability. However, their applications bump in insolubility of chitosan in neutral and alkaline, aiming to circumvent this characteristic, it was proposed chemical modifications in order to further expand its applications. Thus the carboxymethylation of chitosan is one of the most important processes, from which the chitosan becomes soluble in neutral and alkaline pH, a fact that makes Carboxymethyl chitosan a compound increasingly researched in the medical and pharmaceutical industry.

Key words: Chitin, Chitosan, Carboxymethyl chitosan.

Referências

ABREU, F.R. **Estudos de obtenção de carboximetilquitosanas e derivados entrecruzados e de sua interação com íons metálicos.** São Carlos, 96f, 2002. Dissertação (Mestrado Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais de São Carlos) Universidade de São Paulo, 2002.

ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P.. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros**, São Carlos, vol. 15, n. 2, jun., 2005.

ANTONINO, N de A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueleto de camarões oriundos da indústria pesqueira paraibana.** João Pessoa, 89f, 2007. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Paraíba, 2007.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, vol.23, p. 27-34, 2007.

CAMPANA-FILHO, S.P.; DESBRIÈRES, J. **Chitin, chitosan and derivatives.** IN: FROLLINI, E.; LEÃO, A.L.; MATTOSO, L.H.C. Natural Polymers and Agrofibers Composites. USP; UNESP; EMBRAPA, p.41-71, 2000.

CAMPANA-FILHO, S.P.; BRITO, de S.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de a⁻ e b⁻ quitina. **Química Nova**. vol.30, n.03, São Paulo, mai.- jun., 2007.

CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M.B. Propriedades e aplicações de quitosana. **Revista Processos Químicos**, n.2, p.9-20, 2007.

CERRUTTI, B.M. **Biomacromoléculas Carboximetiladas:** Atuação com agentes de Estabilização de suspensões de aquosas de alumina. São Carlos, 139f, 2010. Tese (Doutorado em Ciências, Instituto de Química) Universidade de São Paulo, 2010.

CHEN, L. *et al.* The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, vol.23, p.4609-4614, 2002.

CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl-chitosan. II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **Carbohydrate Research**, vol.338, p.333-340, 2003.

CHEN, X.G.; PARK, H.J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**. vol. 53, p. 355–359, 2003.

CHEN, L.; DU, Y.; TIAN, Z.; SUN, L. Effect of the degree of desacetylation and the substitution of carboxymethyl chitosan on its aggregation behavior. **J. Polym. Sci. Polym. Phys.** vol.43, p.296-305, 2005.

DAROZ, L.R.D.; LOPES, J.B.; DALLAN, L.A.O.; CAMPANA-FILHO, S.P.; MOREIRA, L.F.P.; STOLF, N.A.G. Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termoestéril. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.** vol. 23, p. 480-487, 2008.

DUNG, P.L.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymer**, vol.24, p.209-214, 1994.

GOMES, L.P.; OLIVEIRA, C.I.R.de; SILVA, M.C.da; ANDRADE, C.T.de; AGUILA, E.M.D.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. CV RED GLOBE) para a produção de quitosana a partir da quitina de camarão. **Quim.Nova**, vol. 33, n.9, p.1882- 1886, 2010.

GUO, Z.; CHEN, R.; XING, R.; LIU, S.; YU, H.; WANG, P.; LI, C.; LI, P.; Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. **Carbohydrate Research**. vol. 341, p. 351-354, 2006.

HERNÁNDEZ, L. La Quitosana: Un Producto Bioactivo de Diversas Aplicaciones. **Cultivos Tropicales- Redalyc-**, vol.25, n. 3, p.97-110, 2004.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, vol.26, p.1921-1971, 2000.

LEITE, F.; MODESTO, C.M.D.; NASCIMENTO, R.F. do; DIAS, F.S. Adsorção de Cd (II) de soluções aquosas com microesferas de N-carboximetilquitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. vol. 6, n. 3, 2005.

MARTINEZ, L.R.; MIHU, M.R.; HAN, G.; FRASES, S.; CORDERO, R.J.B.; CASADEVALL, A.; FRIEDMAN, A.J.; FRIEDMAN, J.M.; NOSANCHUK, J.D. The use chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, vol.31, p.669-679, 2010.

MATHUR, N. K., NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J. of Chem. Educ.** vol. 67, n.11, p. 938-942, 1990.

MATSUI, M. Correlações entre estrutura química, superestruturas macromoleculares e morfologia de blendas e redes poliméricas à base de quitina e poluuretano. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MONAGAS, S.A.F. Hidrólisis enzimática de carboximetilquitina e carboximetilquitosana. **Rev. Cubana Farm.** vol.32, n.02, p.125-129, 1998.

MONAGAS, S.A.F.; ALBADALEJO, M.D.R.; REVOREDO, O.B.; ACOSTA, O.M.N. Quitina e Carboximetilquitosana como agentes desintegrantes. **Rev. Cubana Farm.** vol.32, n.02, p.120-124, 1998.

MONAGAS, S.A.F. Características hidrodinámicas de carboximetilquitina y carboximetilquitosana. **Rev. Cubana Farm.** vol.34, p. 6-11, 2000.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L. Quitina e quitosana produzidas a partir de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**. Rio Grande. vol.16, p.37-48, 2006.

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

MUZZARELLI, R.A.A. Carboxymethylated chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, vol.8, p.1-21, 1998.

NETO,R.S.; PAVONE,C.; FREITAS,R.M.de; MARCANTONIO,R.A.C.; JÚNIOR,E.M. Biomateriais a base de quitosana com aplicação médica e odontológica: Revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, vol.37, n.02, p.155-161,2008.

NGAH, W. S. W.; ENDUD, C. S.; MAYANAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive & Functional Polymers**. vol. 50, p. 181 – 190, 2002.

RAMIREZ, C.C.; SALCIDO, N.M.de la F.; CANO,R.D.P.; ORTIZ-RODRÍGUES,T.; CORONA,J.E.B. Potencial de los quitosano-oligosacarídeos generados de quitina e quitosana.**Acta Universitaria**.vol.21, n.03, set.-dez., 2011.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P.L.Characterization of fully deacetylation chitosan. influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol.15, p.281-285, 1993.

ROBERTS, G. **Chitin Chemistry**. London: The Macmillan Press LTD, 1992, 349 p.

SANTOS, M.C.; CIRILO, A.T.de O.; NUNES, M.L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachium jelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, vol. 7, n.9, 2011.

SEVERINO, P.; VASCONCELLOS, F. da C.; FIGUEIREDO, E.S.de. Uso tópico de quitosana em oftalmologia. **Rev.Bras.Farm**. vol.4, n.88, p. 155- 158, 2007.

SIGNINI, R; CAMPANA-FILHO, S.P. Características e Propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. vol.11, n.2, p.58-64, 2001.

SIGNINI, R. **Estudo das relações estrutura/propriedades de quitina e quitosana**. 148f. 2002. Tese (Doutorado em Ciências- Físico-química, Instituto de Química de São Carlos) Universidade de São Paulo, 2002.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

VELÁSQUEZ, C.L. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**. vol.4,n.2,2003.

RAMOS, P.P.; MONAGANAS, S.A.F.; REVOREDO, O.B.; LEDEA, D.F.; LÓPEZ, L.M. Parámetros quimicofísicos de la carboximetilquitosana. **Rev. Cubana Farm**. vol.39, 2005.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.de; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JÚNIO, E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: Revisão bibliográfica. **Revista de Odontologia da UNESP**. vol.37, n.2,p.155-161, 2008.

YU, C.; LIU, Y.-F.; TANG, H.-L.; TAN, H.-M. Study of Carboxymethyl Chitosan- based Polyampholyte superabsorbent Polymer (Parte II): Investigating the State of Water in CMCTS. **Iranian Polymer Journal**, vol.19, n.6, p.417-425, 2010.

ZHAO, Z.; WANG, Z.; WANG, N.S. A novel N,O-carboxymethyl amphoteric chitosan/poly(ethersulfone) composite MF membrane and its charged characteristics. **Desalination**, vol.144, p. 35-39, 2002.

ZHAO, L. *et al.* Radiation synthesis and characteristic of the hidrogels based carboxymethylated chitin derivatives. **Carbohydrate Polymers**, vol.51, p.169-175, 2003.

MODIFICAÇÕES DO TESTE DE LETALIDADE DE *Artemia salina* LEACH PROPOSTO DE MEYER (1982) AO LONGO DO TEMPO

CHARLES LIMA RIBEIRO (UEG)

Pós- Graduando em Ciências Moleculares, Bolsita CAPES, UnUCET, Anápolis
charles20lima@gmail.com

DIORGENES PINTO SANTANA (UEG)

Pós- Graduando em Ciências Moleculares, Bolsita CAPES, UnUCET, Anápolis
diorgenesps@gmail.com

PLÍNIO LAZARO FALEIRO NAVES (UEG)

Professor Orientador, Laboratório de Bioensaios, UnUCET, Anápolis
plinionaves@ueg.br

Introdução

O teste de letalidade de *Artemia salina* LEACH. foi proposto em 1956 por Michael, Thompson e Abramovitz para avaliar a toxicidade de compostos naturais (LHULLIER *et al.*, 2006). Desde então este ensaio é amplamente utilizado por vários pesquisadores na triagem da atividade biológica de vários compostos. Sua ampla utilização se deve ao fato de possuir boa correlação com outros testes mais complexos na determinação de atividades antifúngicas, antivirais, antimicrobianas, parasiticidas, antitumorais e tripanossomicidas, além de apresentar baixo custo e ser de fácil interpretação (LUNA *et al.*, 2005; PISUTTHANAN *et al.*, 2004; KRISHNARAJU *et al.*, 2005).

Em 1981 Vanhaeche e colaboradores (LHULLIER *et al.*, 2006) aprimoraram a técnica e em 1982, Meyer e colaboradores empregaram esta metodologia a fim de validar a toxicidade de extratos brutos de algumas espécies de plantas da família *Euphorbiaceae*. A partir de então a técnica de letalidade obteve reconhecimento como um teste preliminar para a validação toxicológica de compostos naturais (PISUTTHANAN *et al.*, 2004).

Objetivos

Rastrear as modificações sofridas pela técnica de letalidade de *Artemia salina* leach proposta por Meyer em 1982 na literatura especializada ao longo do tempo para propor a sua otimização às condições disponíveis no Laboratório de Bioensaios da UEG.

Metodologia

Realizou-se um levantamento dos artigos da literatura especializada, no período de 1982 até 2012, disponível na base de dados do Google Acadêmico utilizando como descritor o termo: “*Brine Shrimp Bioassay*”, entre os meses de fevereiro a abril de 2012.

Os artigos foram acessados e analisados quanto a possíveis variações da técnica empregada, tendo por base o ensaio proposto por Meyer, 1982.

Resultados e discussão

Um total de 222 artigos foram descarregados a partir de uma lista com 731 referências na página do Google Acadêmico, destes 181 (81,5%) foram analisados. Os 41 (18,5%) trabalhos restantes não foram estudados, pois estavam indisponíveis ou corrompidos no momento da busca.

No levantamento realizado constatou-se a inexistência de trabalhos com o termo descritor antes de 1982. No quadro 1 pode-se constatar a distribuição dos trabalhos no período analisado.

Décadas	Nº de publicações
1982-1992	14
1992-2002	51
2002-2012	111
2012-S/D	05
Total	181

Quadro 1. Distribuição das publicações com a técnica de letalidade de *Artemia salina* no período analisado

Outra importante observação foi a constatação que em 24 (13,3%) dos artigos o termo pesquisado foi empregado em seus títulos, ressaltando a relevância da técnica nos estudos realizados. Além disso, detectou-se que o bioensaio é utilizado de maneira complementar a outras técnicas, objetivando a obtenção de resultados ainda mais abrangentes e confiáveis em relação à citotoxicidade dos compostos avaliados.

Em 174 (96,1%) dos trabalhos havia citação direta de Meyer, dentre os quais 98 (54,1%) referiam exclusivamente a estes autores, demonstrando que o estudo pioneiro para otimizar a técnica é uma importante referência para os pesquisadores que empregam este bioensaio.

As modificações mais frequentemente encontradas na técnica ao longo do período estudado estão listadas a seguir:

- * Divergências na técnica de captura das larvas de *Artemia salina*,
- * Intervalo do tempo de eclosão das larvas – 24, 36 e 48 h,
- * Intermitência de iluminação,
- * Temperatura,
- * Contagem e seleção de espécimes,
- * Utilização de artemilheiros e
- * Particularmente ensaios empregando técnicas de macrodiluição e microdiluição.

O tempo de eclosão pode determinar a utilização de larvas em diferentes estágios, pois em um prazo de 24 h serão desenvolvidas larvas em estágio de náuplio e em 48 h de metanáuplio, o que poderia implicar em distintos graus de sensibilidade aos compostos analisados.

A captura das larvas por pipeta de Pasteur foi citada em apenas 17 (9,3%) trabalhos sendo normatizada a fim de se uniformizar a quantidade de larvas que serão adicionadas aos testes de citotoxicidade, no entanto, nenhum trabalho explicou em detalhes tal procedimento.

Enquanto a macrodiluição foi utilizada em 148 (81,8%) dos trabalhos, a técnica de microdiluição proposta por McLaughlin, 1991 foi empregada em 35 (19,3%) sendo que tal abordagem amplifica o número de triagens realizadas, conferindo assim uma agilidade maior aos testes realizados.

Detectamos que em 80 (44,2%) artigos havia alguma inferência implícita ou mesmo justificada das adaptações da técnica a partir de Meyer, ou ainda, faziam referência a outros autores que propuseram otimizações da técnica pioneira.

Considerações finais

O teste de letalidade de *Artemia salina* LEACH. é uma metodologia amplamente utilizada para a triagem de atividade biológica ou citotoxicidade de diversos compostos. Mesmo com as inúmeras adaptações que a técnica sofreu ao longo do tempo, Meyer e colaboradores são os autores mais citados.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro nº 475935/2011-0, chamada universal 14/2011 e à CAPES pela concessão das bolsas aos mestrandos.

Referências

KRISHNARAJU, A. V.; RAO, T. V. N.; SUNDARARAJU, D.; VANISREE M.; TSAY, H.S.; SUBBARAJU, G. V. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *International Journal of Applied Science and Engineering*. vol.3,n.2, p. 125-134, 2005.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista Brasileira Farmacognosia*. vol. 2; p. 158-163, 2006.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal Ethnopharmacol*. vol. 97, n.2, p. 199-206, 2005.

McLAUGHLIN, J.L. Crown Gall Tumours on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plants screening and fractionation. In.: *Methods in Plant Biochemistry*, n.6, p. 1-32, 1991.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*. vol. 45, p. 31-34, 1982.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O. Brine shrimp lethality activity of thai medicinal plants in the family *Meliaceae*. *Naresuan University Journal*. vol. 12, n.2, p. 13-18, 2004

