

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Efeitos da quitosana na inativação fotodinâmica de *Escherichia coli***

**Marina Paz Hyppólito**

**UBERLÂNDIA**  
**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

**Efeitos da quitosana na inativação fotodinâmica de *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de Concentração:** Química  
Bioinorgânica

**Orientado:** Marina Paz Hyppólito

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

**UBERLÂNDIA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

H998e  
2014      Hyppólito, Marina Paz, 1989-  
             Efeitos da quitosana na inativação fotodinâmica de Escherichia coli /  
             Marina Paz Hyppólito. - 2014.  
             69 f. : il.

             Orientador: Carlos Alberto de Oliveira.  
             Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
             Programa de Pós-Graduação em Química.  
             Inclui bibliografia.

             1. Química - Teses. 2. Quitosana - Teses. 3. Corantes - Teses. 4.  
             Nanopartículas - Teses. I. Oliveira, Carlos Alberto de. II. Universidade  
             Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química. III.  
             Título.

---

CDU: 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 193/PPQUI.

DATA: 30/05/2014

DISCENTE: Marina Paz Hyppólito

MATRÍCULA: 11212QMI013

TÍTULO DO TRABALHO: Utilização de quitosana para a inativação fotodinâmica de micro-organismos.

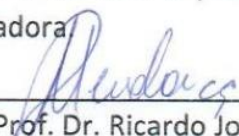
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

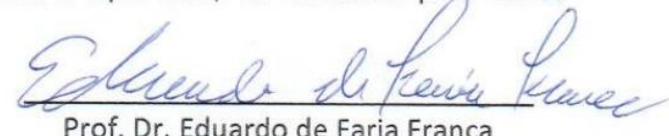
LINHA DE PESQUISA: Química Bioinorgânica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Avaliação de fotossensibilizadores sobre o crescimento de culturas de micro-organismos.

Às nove horas do dia trinta de maio do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Ricardo José Mendonça, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Eduardo de Faria Franca e Carlos Alberto de Oliveira, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será EFEITOS DA QUITOSANA NA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE Escherichia coli


Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 18 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Ricardo José Mendonça

  
Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

UFTM

IQUFU

  
Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

*À Deus que me sustenta e dá forças para  
continuar a buscar meus sonhos, à  
minha família pela educação, cuidado,  
dedicação que me forneceram todo  
suporte e segurança na certeza de que  
nunca estarei só.*

*“Por vezes sentimos que aquilo que  
fazemos não é senão uma gota de água  
no mar. Mas o mar seria menor se lhe  
faltasse uma gota.”*

*Madre Teresa de Calcutá*

*“Tenho a impressão de ter sido uma  
criança brincando à beira-mar,  
divertindo-me em descobrir uma  
pedrinha mais lisa ou uma concha mais  
bonita que as outras, enquanto o imenso  
oceano da verdade continua misterioso  
diante de meus olhos”.*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele em seu laboratório, por ter tido paciência e compreensão durante esse período.

Aos professores que aceitaram meu convite para ser banca, Eduardo, Ricardo e Fábio. Espero crescer e melhorar ainda mais com suas críticas e sugestões.

À Mayta por sempre me ajudar de forma tão gentil e amável com os problemas durante esses dois anos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos colegas de trabalho do LABIOFOT que estiveram presentes e me auxiliaram neste período. Em especial à Renatinha, Ana Caroline, Bruno, Natália e Ludmilla.

Ao meu amigo Erick, que esteve ao meu lado no último ano, me direcionando, auxiliando e co-orientando.

Ao querido, Richard, pela presença diária por seis anos. Obrigada por ter sido uma de minhas inspirações na vida.

À Sângela, Mariana Alves (Mel), Ana Cristina (Tininha), Heden (Zituz), Marcelo, e a tantos outros amigos e colegas que estiveram do meu lado no último ano, me consolando e me impulsionando para a felicidade.

À minha querida amiga Elen, por sempre me apoiar e aquecer meu coração. A distância e a saudade são grandes, mas nada separa nossos corações.

À minha família, principalmente aos meus pais, Marli e Helton e meu irmão Helton Jr., que sempre tiveram fé no meu futuro, sendo suporte e me dando coragem para encarar os desafios da vida.

À Deus pela vida e oportunidades de amadurecimento e crescimento pessoal e profissional.

Obrigada.

## RESUMO

A quitosana é um material funcional que oferece características únicas: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, inércia fisiológica, propriedades antibacterianas, quelante de íons metálicos pesados, propriedades de formação de géis e hidrofiliçidade, e notável afinidade com proteínas. Este trabalho teve como objetivo a investigação da utilização da quitosana e aditivos, tais como, fotossensibilizadores e nanopartículas de ouro, como tratamentos alternativos para a inativação de micro-organismos. Quitosana de marcas comerciais diferentes foram testadas e caracterizadas segundo suas propriedades estruturais no intuito de avaliar se há diferenças significativas entre as marcas. A faixa de pH do ácido de solubilização da quitosana foi variada e analisada a partir de testes de viabilidade celular para estudo das propriedades antimicrobianas da quitosana. A faixa de estudos de pH onde não há interferência do meio ácido nos resultados é entre os pHs 5,0 e 6,5. Propriedades agregantes da quitosana e sua interação com bactérias foram analisadas na presença de nanopartículas de ouro, em que ficou evidente que a metodologia proposta é rápida, simples, eficaz e não compromete a atividade antimicrobiana da quitosana. Estes experimentos também mostraram uma provável competição entre ouro coloidal e bactérias em interagir com a quitosana, porém também foi constatada uma forte interação entre os materiais. Outros ensaios foram realizados com fotossensibilizadores buscando avaliar a interação e possível sinergismo entre os materiais melhorando a fotoinativação de micro-organismos, mas não foi verificada uma intensificação das propriedades e em um dos corantes não houve efeito de atividade antimicrobiana pela quitosana.

**Palavras chave:** Quitosana, inativação fotodinâmica, corantes, nanopartículas de ouro, viabilidade celular.



## ABSTRACT

Chitosan is a functional material which offers unique characteristics as biocompatibility, biodegradability, atoxic, physiological inertness, antibacterial, chelating heavy metal ions, properties of gel formation, and hydrophilicity, and remarkable affinity for proteins. This study aimed to investigate the use of chitosan and additives, such as gold nanoparticles and photosensitizers, as alternative to inactivate microorganisms treatments. Chitosan of different brands were tested and characterized according to their structural properties in order to assess whether there are significant differences between the brands. The pH range of the acid solubilization of chitosan was varied and analyzed from tests of cell viability study of the antimicrobial properties of chitosan. The range of pH studies where there is no interference from acid in the results is at pH 5.0 and 6.5. Aggregation properties of chitosan and its interaction with bacteria were analyzed in the presence of gold nanoparticles, which became evident that the proposed method is simple, fast, effective and does not compromise the antimicrobial activity of chitosan. These experiments also showed a probable competition between colloidal gold and bacteria interaction with chitosan, but were also found a strong interaction between these materials. Other tests were performed with photosensitizers by assessing the interaction and possible synergism between materials improving the photoinactivation of microorganisms, but not verified or an intensification of the properties of the dyes and there was no effect of antimicrobial activity by chitosan.

**Keywords:** Chitosan, photodynamic inactivation, dyes, gold nanoparticles, cell viability.

# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração mostrando a diferença entre bactérias Gram positivas e negativas.	2
<b>Figura 2.</b> Ilustração do evento fotodinâmico onde na presença de luz o corante é excitado e ao retornar para o estado fundamental emite energia para o oxigênio molecular.	5
<b>Figura 3.</b> Estrutura molecular dos fotossensibilizadores utilizados.	6
<b>Figura 4.</b> Estruturas da celulose, quitina e quitosana	7
<b>Figura 5.</b> Esquema ilustrando a estrutura da quitina e quitosana e o processo de desacetilação com hidróxido de sódio.	8
<b>Figura 6.</b> Sistema de irradiação PHLS.	19
<b>Figura 7.</b> Espectros de IV das amostras de quitosana Polymar e Sigma-Aldrich.	22
<b>Figura 8.</b> Difrátogramas de Raios-X de quitosana Sigma-Aldrich e quitosana Polymar.	24
<b>Figura 9.</b> Curvas de TG de quitosana Sigma-Aldrich e Polymar.	25
<b>Figura 10.</b> Curvas de viscosidade relativa de diferentes marcas de quitosana com relação ao pH.	28
<b>Figura 11.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 3,0.	30
<b>Figura 12.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 3,5.	31
<b>Figura 13.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 4,0.	31

<b>Figura 14.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 4,5.....	31
<b>Figura 15.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 5,0.....	32
<b>Figura 16.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 5,5.....	32
<b>Figura 17.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 6,0.....	32
<b>Figura 18.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 6,5.....	33
<b>Figura 19.</b> Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 7,0.....	33
<b>Figura 20.</b> Imagem das placas após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C.....	36
<b>Figura 21.</b> Placa de 96 poços ilustrando com cores o procedimento acima.....	38
<b>Figura 22.</b> Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando ZnPc e QTS suspensa em água, (A) e (B) irradiada (C) e (D) não irradiada, em luz branca e negra. ....	39
<b>Figura 23.</b> Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando AM e QTS suspensa em água, (A) não irradiada (B) irradiada. ....	40
<b>Figura 24.</b> Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando RB e QTS suspensa em água, (A) não irradiada (B) irradiada. ....	41
<b>Figura 25.</b> Foto ilustrando o resultado após 40 minutos da interação e agregação de quitosana com nanopartículas de ouro. ....	42
<b>Figura 26.</b> Fotos com aumento simples dos poços representantes da quitosana solubilizada em pH 5,5 (A) e (B) dos poços A1 e A9, respectivamente; quitosana solubilizada em pH 6,5 (C) e (D) dos poços E1 e E9, respectivamente e quitosana suspensa em água (E) e (F) dos poços H1e H9, respectivamente. ....	43

<b>Figura 27.</b> Espectros de absorção UV de diferentes suspensões de ouro coloidal. ....	44
<b>Figura 28.</b> Fotografia ilustrativa do resultado do crescimento de <i>E. coli</i> após 24 horas em estufa.....	45
<b>Figura 29.</b> Imagens de quitosana com nanopartículas de ouro vistas em lupa com aproximação simples em diferentes valores de pH, 5,5, 6,5, respectivamente. As referências em cada imagem são dos poços correspondentes. ....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais bandas características da quitosana.....	23
<b>Tabela 2.</b> Tempos de escoamento médios das soluções contendo quitosana e sem quitosana e a viscosidade relativa das marcas Sigma-Aldrich e Polymar com relação ao pH.....	27
<b>Tabela 3.</b> Procedimento experimental avaliando a qualidade da quitosana e a inibição do crescimento microbiano em diferentes valores de pH.....	30
<b>Tabela 4.</b> Resultado dos testes de solubilidade e viabilidade celular da quitosana em diversos meios.....	35
<b>Tabela 5.</b> Diagrama simplificado do experimento que avalia a interação de fotossensibilizadores e quitosana na fotoinativação de micro-organismos. ....	37
<b>Tabela 6.</b> Procedimento esquematizado simplificado em 2 triplicatas e 1 duplicata....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico  
**AM** - Azul de Metileno  
**ATG** - Análise Termogravimétrica  
**AuNP** - Nanopartículas de Ouro  
**CMI** - Concentração Mínima Inibitória  
**DRX** - Difração de Raios-X  
**EMB** - Eosina Azul de Metileno  
**FTIR** - Infravermelho com Transformada de Fourier  
**GD** - Grau de Desacetilação  
**HAc** – Ácido Acético  
**IFD** - Inativação Fotodinâmica  
**IV** - Infravermelho  
**QTS** - Quitosana  
**RB** - Rosa de Bengala  
**RHBC** - “*Rapid HiBroth Coliform*”  
**TFD** - Terapia Fotodinâmica  
**UFC** - Unidades Formadoras de Colônias  
**ZnPc** - Ftalocianina de Zinco

# SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Escherichia coli.....	1
1.2. Inativação Fotodinâmica .....	3
1.3. Quitosana.....	7
1.3.1. Processabilidade da quitosana .....	8
1.3.2. Aspectos econômicos .....	9
1.3.3. Estrutura da quitosana e propriedades .....	9
1.3.4. Aplicações da quitosana .....	11
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>13</b>
2.1. Objetivo Geral .....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1. Materiais e reagentes.....	14
3.2. Preparo de soluções .....	14
3.2.1. Solução salina .....	14
3.2.2. Solução estoque de ftalocianina de zinco (ZnPc). .....	14
3.2.3. Solução estoque de azul de metileno (AM). .....	14
3.2.4. Solução de ácido acético (HAc).....	14
3.2.5. Solução de hidróxido de amônio (NH <sub>4</sub> OH).....	15
3.2.6. Solução de hidróxido de sódio .....	15
3.2.7. Solução de quitosana .....	15
3.3. Caracterização estrutural por Espectroscopia Infravermelho (IV) .....	15
3.4. Caracterização estrutural por Difração de raios-X .....	15
3.5. Caracterização por Termogravimetria (TG).....	16
3.6. Teste de Viscosidade.....	16
3.7. Avaliação da eficácia antimicrobiana .....	16
3.7.1. Ensaios de concentração mínima inibitória (CMI) .....	17
3.7.2. Ensaios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) .....	17
3.8. Testes de Solubilidade das quitosanas .....	18

3.9.	Teste da interação da quitosana com corantes na fotoinativação de microrganismos .....	18
3.9.1.	Ensaio de concentração mínima inibitória (CMI) .....	18
3.9.2.	Sistema de irradiação. ....	19
3.10.	Testes de propriedades agregantes da quitosana .....	19
3.10.1.	Preparo das nanopartículas de ouro .....	20
3.10.2.	Ensaio de propriedade agregante .....	20
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
4.1.	Quitosana Polymar versus Quitosana Sigma-Aldrich.....	21
4.1.1.	Espectroscopia de Infravermelho .....	21
4.1.2.	Difração de raios x .....	23
4.1.3.	Análise Termogravimétrica (ATG) .....	24
4.1.4.	Teste de Viscosidade .....	26
4.1.5.	Testes de atividade antimicrobiana.....	29
4.2.	Testes de solubilidade da quitosana e viabilidade celular .....	34
4.3.	Teste da interação da quitosana com corantes na fotoinativação de microrganismos .....	37
4.3.1.	Ftalocianina de Zinco (ZnPC) .....	38
4.3.2.	Azul de Metileno (AM).....	39
4.3.3.	Rosa de Bengala (RB).....	40
4.4.	Interação de quitosana com nanopartículas de ouro .....	41
4.4.1.	Teste de Agregação das nanopartículas de ouro(AuNP) .....	41
4.4.2.	Testes de viabilidade celular quitosana e nanopartículas de ouro .....	45
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>



# 1. INTRODUÇÃO

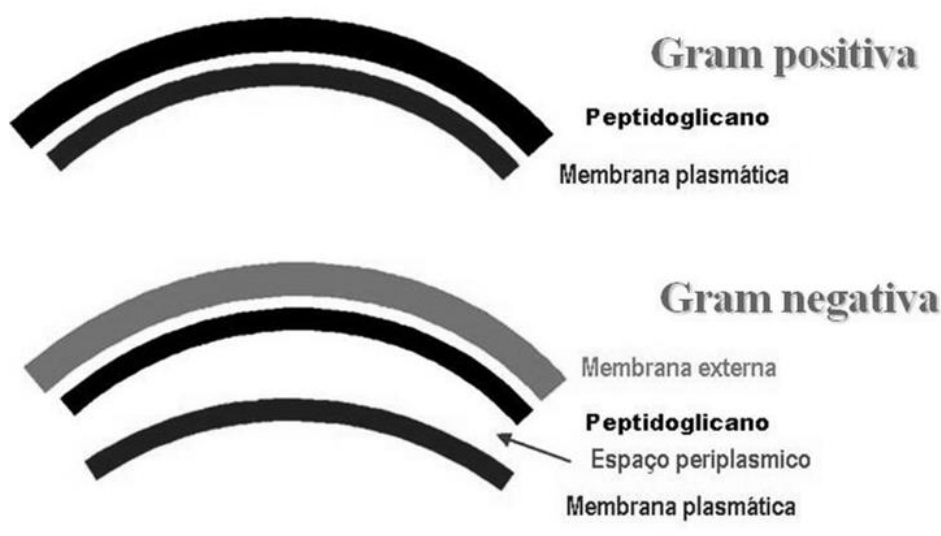
## 1.1. *Escherichia coli*

As células são unidades estruturais e funcionais de todos os organismos vivos. Os menores organismos são unicelulares e são microscópicos, enquanto os organismos maiores são pluricelulares. Todas as células vivas possuem certas características estruturais e em geral um núcleo ou nucleóide, onde o genoma (conjunto completo de genes, composto de Ácido Desoxirribonucleico - ADN) é armazenado e replicado. O nucleóide bacteriano não é separado do citoplasma por uma membrana, mas nos organismos superiores o material nuclear é envolto por uma membrana dupla, e envelope nuclear. As células providas do envelope nuclear são chamadas de “eucariotos” e as desprovidas - células bacterianas – “procariotos” (NELSON e COX, 2002).

As bactérias do gênero *Escherichia coli* pertencem à família Enterobacteriaceae e são micro-organismos anaeróbios facultativos, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose, e é oxidase-negativa. Elas metabolizam uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Produzem catalase, utilizam glicose, amônia e nitrogênio como fontes de material orgânico (BRASIL, 2001).

A célula da *E. coli* tem cerca de 2 µm de comprimento e pouco menos de 1 µm de diâmetro, tem uma membrana externa protetora e uma membrana plasmática interna que envolve o citoplasma e o nucleóide. Entre as membranas interna e externa há uma fina, mas forte, camada de peptideoglicanos (polímeros de açúcar unidos por ligações cruzadas de aminoácidos), que fornece à célula sua forma e rigidez. A membrana plasmática e as camadas externas constituem o envelope celular. Diferenças no envelope celular são responsáveis pelas afinidades diferentes para o corante violeta de genciana que é a base do corante de Gram; as bactérias Gram-positivas retêm o corante, e as bactérias gram-negativas não. A membrana externa da *E. coli*, como a de outras eubactérias gram-negativas, é semelhante à membrana plasmática na estrutura, mas é diferente na composição. Nas bactérias gram-positivas não há membrana externa e a camada de peptideoglicanos que envolve a membrana plasmática é muito mais espessa do que nas bactérias gram-negativas. As membranas plasmáticas das eubactérias consistem de uma fina bicamada de moléculas de lipídios penetrada por proteínas. A

membrana plasmática contém proteínas capazes de transportar certos íons e compostos para dentro da célula e transportar produtos e resíduos para fora (NELSON e COX, 2002).



**Figura 1.** Ilustração mostrando a diferença entre bactérias Gram positivas e negativas.

As bactérias modernas habitam quase todos os nichos ecológicos na biosfera, havendo espécies de bactérias capazes de usar praticamente todo tipo de composto orgânico como fonte de carbono e energia. A *E. coli* é uma habitante usualmente inofensiva do trato intestinal dos seres humanos e de muitos outros mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos (micro-organismos que podem causar doenças veiculadas por alimentos) para o homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal. A transmissão das infecções causadas por *E. coli* seguem principalmente três vias: o contato direto com animais, o contato com humanos e o consumo de alimentos contaminados (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1997).

Algumas estirpes de *E. coli* conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 7 e 46 °C e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C (temperatura à qual a taxa específica de crescimento é máxima). As estirpes patogênicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução de sua população após uma a cinco semanas de armazenamento (VARMAN e EVANS, 1996). O efeito do pH no crescimento depende do tipo de ácido presente. A *E. coli* é destruída por irradiação. A presença de oxigênio aumenta o efeito letal da irradiação, que é máximo a temperaturas entre os 45 e os 55°C (BUCHANAM e KLAWITER, 1992).

As enterobactérias apresentam ou produzem vários fatores de virulência comprovados e potenciais. Algumas linhagens especiais desse microrganismo podem causar doenças no homem e também em animais, recebendo a denominação genérica de *Escherichia coli* enterovirulenta. Existem cinco classes distintas de *E. coli* enterovirulenta: *E. coli* enteropatogênica, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasora e *E. coli* enteroagregativa (VARMAN e EVANS,1996; LEVINE,1987; HOBBS e ROBERT,1998).

Os sintomas surgem cerca de 3 a nove dias após a ingestão do alimento contaminado e podem ter uma duração de até 9 dias. Os sintomas mais comuns são colites hemorrágicas caracterizada por uma diarreia sanguinolenta, fortes dores abdominais, vômitos e ausência de febre. Em casos mais graves pode ocorrer síndrome hemolítico-urêmica e Púrpura Trombótica Trombocitopênica em crianças e idosos, respectivamente. Estas síndromes caracterizam-se por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, alterações da função renal, febre e anomalias do sistema nervoso central. (TARR,1995).

Diante da ampla variedade de sorotipos patogênicos, da alta taxa de mortalidade proveniente das síndromes decorrentes à ingestão de alimentos contaminados, da resistência às drogas antibióticas e outros tratamentos convencionais pelas bactérias, os cientistas têm aprofundado seus estudos em tratamentos alternativos para a inativação microbiana.

### ***1.2. Inativação Fotodinâmica***

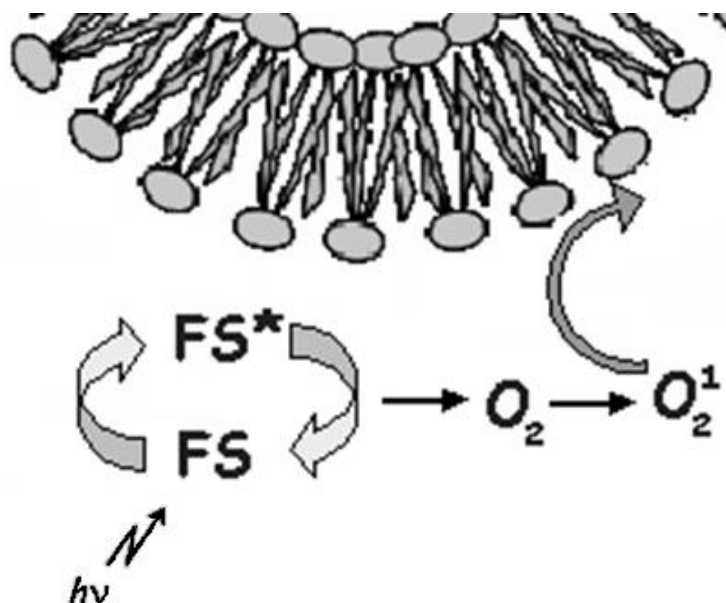
A luz solar pode tanto trazer benefícios quanto malefícios, porém, a luz tem sido usada com propósitos terapêuticos há séculos. Em tratamentos de pele tuberculosa e debilitada, a priori, apenas era aplicada a radiação ultravioleta (BERTOLONI, ROSSI, VALDUGA, *et al*, 1990).

Colorantes (corantes e pigmentos) se caracterizam pela sua habilidade de absorver luz visível. Um número considerável de corantes ao longo de mais de um século é produzido em escala industrial, em que se destacam os compostos azo, devido á simplicidade de síntese e durabilidade. (BERTOLONI, ROSSI, VALDUGA, *et al*, 1990). Como absorvem luz com elevada eficiência, em alguma região do espectro visível, alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de certas reações fotoquímicas específicas, sugerindo que corantes excitados por aplicação de luz teriam

efeitos destrutivos em sistemas biológicos. (ACKROYD, KELTY, BROWN, *et al*, 2001).

Vários autores observaram uma forma alternativa para o tratamento de alguns tipos de cânceres e de outras moléstias conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD) e também um excelente método para inativação de micro-organismos, a Inativação Fotodinâmica (IFD) (SPESIA *et al*, 2009).

Corantes que na presença de luz possuem atividade citotóxica são chamados de fotossensibilizadores devido à geração de agentes citotóxicos através da interação dinâmica entre um fotossensibilizador excitado por luz em comprimento de onda específico. A absorção de fótons pelo fotossensibilizador gera a ativação destes agentes, tais como, oxigênio singlete e radicais livres, (MAISCH, BOSL, SZEIMIES, *et al*, 2005), levando estas moléculas a uma instabilidade química, com a mudança do padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de qualquer composto em um estado excitado eletronicamente é retornar ao seu estado fundamental, pois ele é energeticamente mais favorável. Este retorno ao estado fundamental ocorre com emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção do fóton absorvido (LUKISIENE, 2003; MAISCH, BOSL, SZEIMIES, *et al*, 2005).



**Figura 2.** Ilustração do evento fotodinâmico onde na presença de luz o corante é excitado e ao retornar para o estado fundamental emite energia para o oxigênio molecular.

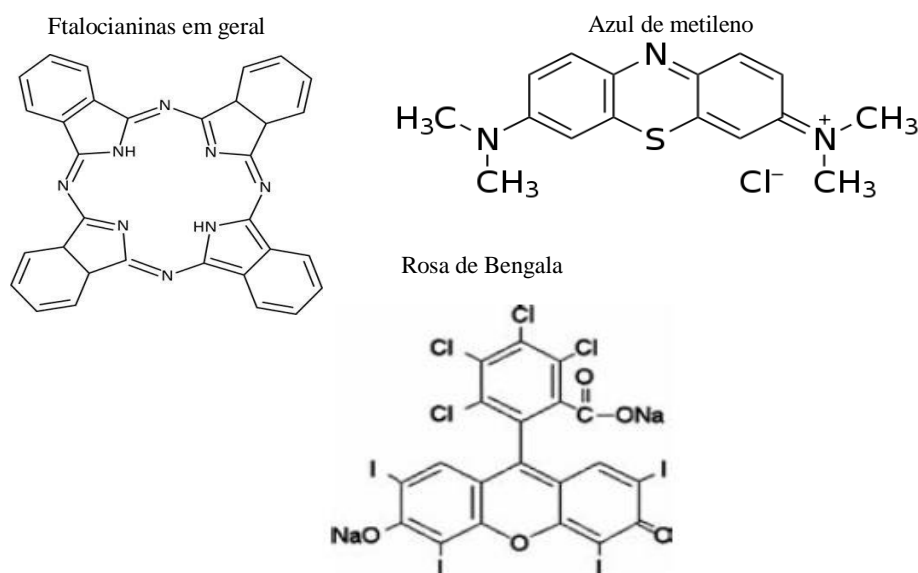
A resistência bacteriana crescente aos métodos tradicionais antimicrobianos gerou a necessidade pelo desenvolvimento de novas drogas ou novos procedimentos de tratamento. Vários autores demonstraram que a combinação de fotossensibilizadores fenotiazínicos com luz vermelha, possui considerável potencial para utilização clínica em desinfecção de pele, queimaduras esterilização de sangue e água, etc (WAINWRIGHT, PHOENIX, GASKELL, *et al*, 1997). Em outro trabalho, demonstrou que um fotossensibilizador fenotiazínico ativo em membranas e seu efeito fototóxico observado em bactérias é negligenciável contra queratinócitos e fibroblastos (SOUKOS, XIMENEZ-FYVIE, HAMBLIN, 1998).

A IFD vem como um procedimento alternativo aos antimicrobianos tradicionais, permitindo a eliminação dos micro-organismos de vários meios e superfícies. Esta é uma boa vantagem da fotoinativação de micro-organismos, pois tem efeito rápido, altamente localizado e como depende da geração de eventos citotóxicos, como oxigênio singlete e radicais livres, o desenvolvimento de resistência ao procedimento é pouco provável (BERTOLONI, G., SALVATO, B., DALT'ACQUA, *et al*, 1984).

Bactérias gram-positivas são, em geral, mais suscetíveis à IFD quando comparado com bactérias gram-negativas. Esta diferença é atribuída a diferenças

estruturais na parede celular. Bactérias gram-negativas como relatado anteriormente, têm uma estrutura complexa da membrana externa formada por duas bicamadas lipídicas enquanto gram-positivas possuem uma única bicamada e uma camada externa relativamente permeável. Várias são as classes de fotossensibilizadores, que variam entre corantes iônicos, corantes extremamente apolares e outras drogas. Fotossensibilizadores neutros ou negativamente carregados não são hábeis em penetrar a barreira da bactéria gram-negativa, entretanto fotossensibilizadores catiônicos se ligam fortemente e conseguem exercer o efeito fotodinâmico (BATZRI, KORN, 1975).

A Figura 3, abaixo, apresenta a estrutura molecular dos fotossensibilizadores utilizados nesse trabalho.



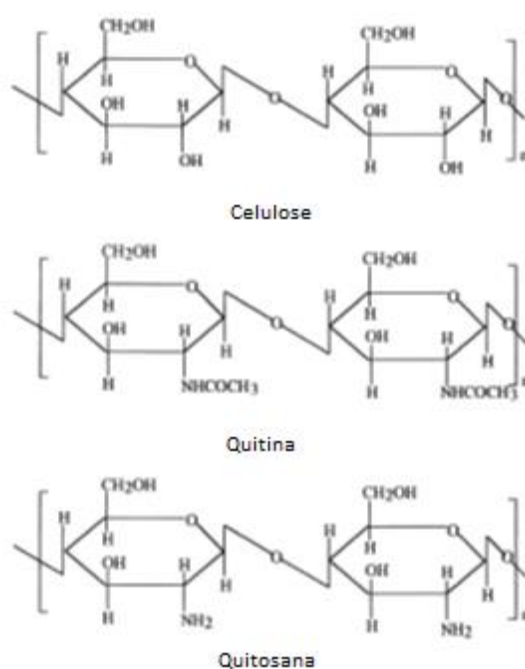
**Figura 3.** Estrutura molecular dos fotossensibilizadores utilizados.

O uso específico desses sensibilizadores é devido a polaridade e natureza de cargas. As ftalocianinas são corantes apolares, os demais são corantes iônicos, sendo que, o azul de metileno é catiônico e rosa de bengala é aniônico. O inconveniente nestas drogas vem sendo além do alto custo, o uso de doses elevadas, que acarretam efeitos colaterais, devido à presença destes agentes no organismo após o tratamento. Desse modo, tornou-se necessário a busca por novos sensibilizadores mais seletivos na retenção na célula alvo, facilmente eliminados após o tratamento, e ter possibilidade de ativação e fácil penetração no comprimento de onda adequado com baixa citotoxicidade (ACKROYD, KELTY, BROWN, *et al*, 2001).

Alternativamente, materiais como quitosana tem sido usado para interagir com os fotossensibilizadores e melhorar sua efetividade perante micro-organismos.

### 1.3. Quitosana

Quitina, um polissacarídeo naturalmente abundante e material suporte de crustáceos, insetos e dentre outros, é bastante conhecido por consistir em 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glicose através de uma ligação glicosídica  $\beta(1\rightarrow4)$ . Sua imunogenicidade é extremamente baixa, devido a presença de nitrogênio. Assemelha-se a celulose por ser insolúvel, baixa reatividade química, polissacarídeo estrutural e diferencia-se pelo ligante no carbono 2 (C-2) ser o grupamento acetamido ao invés da hidroxila. Quitina é branca, dura, inelástica, polissacarídeo nitrogenado e a maior fonte de poluição superficial de áreas costeiras (KUMAR, 2000, RINAUDO, 2006). A quitosana é obtida a partir da reação de desacetilação da quitina em soluções alcalinas. Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido ( $-\text{NHCOCH}_3$ ) da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), dando origem a quitosana. Na Figura 4, abaixo, são apresentadas a estrutura da celulose, quitina e quitosana.

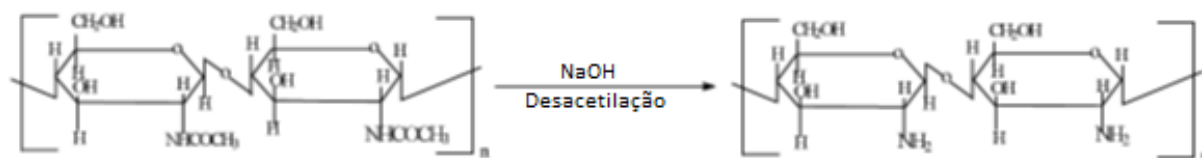


**Figura 4.** Estruturas da celulose, quitina e quitosana (KUMAR, 2000).

A Quitina e a quitosana são de interesse comercial devido a sua alta porcentagem de nitrogênio (6,89 %) comparado com a celulose sinteticamente substituída (1,25 %). Essa característica faz com que a quitina seja um agente quelante útil. Assim, como a maior parte dos polímeros hoje em dia são materiais sintéticos, a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade são muito mais limitadas do que as de polímeros naturais tais como celulose quitina, quitosana e seus derivados. No entanto, estes materiais naturalmente abundantes exibem também uma limitação na sua reatividade e processabilidade. Recentemente, muita atenção tem sido dada à quitosana como um potencial recurso polissacarídico (KUMAR, 2000, RINAUDO, 2006).

### 1.3.1. Processabilidade da quitosana

A quitina é facilmente obtida de conchas de caranguejos e camarões e *mycelia* de fungos. No primeiro caso, a produção da quitina está associada com a indústria alimentícia. No segundo caso, a produção de complexos de quitosana-glicana está associada a processos fermentativos. O processamento das conchas de crustáceos comumente envolve a remoção de proteínas e dissolução de carbonato de cálcio presente nos exoesqueletos de caranguejos em altas concentrações através de soluções diluídas de Ácido Clorídrico (HCl) e redução de nitrogênio protéico com soluções diluídas de Hidróxido de Sódio (NaOH). A quitina resultante é desacetilada em hidróxido de sódio a 40 % a 120 °C por 1 a 3 horas. Este tratamento produz quitosana 70 % desacetilada (KUMAR, 2000; DUTTA, DUTTA, TRIPATHI, 2004). A Figura 5 mostra o esquema da desacetilação da quitina para produção de quitosana.



**Figura 5.** Esquema ilustrando a estrutura da quitina e quitosana e o processo de desacetilação com hidróxido de sódio (KUMAR, 2000).



Quando o grau de desacetilação (GD) da quitina atinge cerca de 50 %, esta passa a ser solúvel em meio de solução aquosa ácida, sendo chamada de quitosana. A solubilização ocorre pela protonação da função  $-NH_2$  na posição C-2 da unidade repetida de D-glucosamina, onde o polissacarídeo é convertido a um polieletrólito em meio ácido. A quitosana é o único polímero catiônico pseudonatural e assim, encontra várias aplicações que seguem a partir dessa característica única (floculantes para recuperação de proteínas, despoluição, etc.). Sendo solúvel em soluções aquosas, e largamente usado em diferentes condições como em soluções, géis, filmes e fibras (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; DUTTA, DUTTA, TRIPATHI, 2004).

### 1.3.2. Aspectos econômicos

A produção de quitina e quitosana baseiam-se nos descartes de resíduos provenientes da indústria pesqueira. Muitos países possuem grandes fontes inexploráveis de crustáceos. A produção de quitosana a partir de conchas de crustáceos provenientes de lixo da indústria alimentícia é economicamente possível especialmente se inclui a recuperação de carotenoides.

Para produzir 1 Kg de quitosana 70% desacetilada de cascas de camarão são necessários 6,3 Kg de ácido clorídrico e 1,8 Kg de hidróxido de sódio, água processada e água quente (KUMAR, 2000).

Quitina e quitosana são produzidas comercialmente na Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália.

### 1.3.3. Estrutura da quitosana e propriedades

No estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino possuindo uma estrutura organizada em folhas com alto grau de cristalinidade e polimorfismo. Cristais separados de quitosana são obtidos usando quitina totalmente desacetilada de baixo peso molecular (RINAUDO, 2006).

As condições experimentais de cristalização e síntese da quitosana fazem com que os filamentos possam adotar diferentes estruturas. Apesar da flexibilidade da quitosana, sua estrutura no estado sólido é mantida por forças intra e intermoleculares bem definidas. As ligações de hidrogênio têm papel primordial na definição da estrutura da quitosana (CUNHA, 2013).

A combinação de técnicas de cristalografia de raios-X, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e infra-vermelho (IV) permitiram obter a estrutura molecular da quitina e da quitosana. A descrição da estrutura de açúcares é um desafio, pois esta classe de biomoléculas é bastante flexível e frente a modificações químicas como: complexação com biomoléculas, mudanças no pH, força iônica e tipos de solvente, tende a sofrer severas modificações conformacionais (CUNHA, 2013).

#### 1.3.3.1. Solubilidade da quitosana

As propriedades em solução da quitosana dependem não somente de médias do GD, mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, além do peso molecular. A desacetilação, usualmente feita no estado sólido, oferece uma estrutura irregular devido ao carácter semicristalino do polímero inicial. Examinando o papel da protonação da quitosana na presença de ácido acético e ácido clorídrico na solubilidade mostrou que o grau de ionização depende do pH e o pK do ácido. A solubilidade da quitosana também depende das concentrações iônicas e um efeito de sais em excesso foi observado para o HCl 1mol L<sup>-1</sup>, tornando possível a preparação da forma cloro hidratada da quitosana (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; DUTTA, DUTTA, TRIPATHI, 2004).

A solubilidade da quitosana foi usualmente testada em ácido acético pela dissolução em 1% ou 0,1 mol L<sup>-1</sup> de ácido acético. Foi demonstrado que a quantidade de ácido necessário depende da quantidade de quitosana que será dissolvida. A concentração de prótons necessária é pelo menos igual à concentração de unidades –NH<sub>2</sub> envolvida (RINAUDO, PAVLOV, DESBRIÈRES, 1999).

Na realidade, a solubilidade é um parâmetro bastante difícil de controlar. Está relacionado com GD, concentração iônica, pH, a natureza do ácido usado para protonação, a distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, bem como as condições de isolamento e secagem do polissacarídeo.

#### 1.3.3.2. Grau de desacetilação e a distribuição dos grupos acetil

A distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia (aleatório ou por blocos) podem influenciar a solubilidade do polímero e também as interações inter-cadeia devido a ligações de hidrogênio e o caráter hidrofóbico dos grupos acetil. Essa

distribuição pode ser avaliada com medidas de RMN de carbono em que frequências são determinadas por homogêneas e heterogêneas quitosanas com diferentes valores de GD (RINAUDO, 2006).

#### 1.3.3.3. Peso molecular

O peso molecular e sua distribuição são importantes características para considerar para esses polímeros. A primeira dificuldade encontrada a este respeito relaciona-se com a solubilidade das amostras e a dissociação dos agregados muitas vezes presentes nas soluções de polissacarídeos. O solvente é importante também quando o peso molecular é calculado a partir da viscosidade intrínseca usando a relação de Mark-Houwink, equação (1) abaixo,

$$[\eta] = KM^a \quad \text{equação (1)}$$

em que,  $M$  = peso molecular,  $[\eta]$  = viscosidade intrínseca relativa e  $K$  = parâmetro de valores experimentais com valores conhecidos dos parâmetros  $K$  e  $a$ . O peso molecular é determinado por espalhamento de luz usando a relação de valores  $dn/dc$ , em que  $c$  é a concentração do polímero (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; DUTTA, DUTTA, TRIPATHI, 2004).

#### 1.3.4. Aplicações da quitosana

Devido a suas propriedades físico-químicas, a quitosana vem sendo usada massivamente em diferentes produtos e aplicações, desde produtos cosméticos e farmacêuticos a tratamento de água e proteção de plantas. Em diferentes aplicações, são necessárias diferentes propriedades da quitosana. Essas propriedades mudam com o grau de desacetilação e o peso molecular (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Quitosana é fungicida na natureza e compatível com vários componentes biologicamente ativos incorporados nas composições de produtos cosméticos, podendo conter outros hidrocolóides antioxidantes, antialérgicos e anti-inflamatórios de origem

vegetal, podendo ser usado nas áreas cosméticas de cuidados com cabelos, pele e boca (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Na área de engenharia de águas, a quitosana é usada como agente floculante devido à sua natureza policatiónica, podendo agir como agente quelante, e complexante com metais pesados e corantes. Considerável quantidade da produção de quitina e quitosana no mundo são usadas no tratamento de águas e esgotos. As moléculas de quitosana aglomeram largamente com contaminantes aniônicos na solução, formando precipitados e floculando (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

O uso de quitosana na indústria alimentícia é bastante conhecida devido à sua não toxicidade e apresentam boas propriedades emulsificantes, espessamento e gelificação para estabilizantes em produtos alimentícios. Vários autores retratam a atividade antimicrobiana da quitosana (LIU, *et al.*, 2004; JE, KIM, 2006; HELANDER, *et al.*, 2001; PALMA-GUERRERO, *et al.*, 2009; KRAJEWSKA, *et al.*, 2011), o que a torna tão versátil tanto na indústria alimentícia, quanto na agroindústria. Ainda que o mecanismo de atividade antimicrobiana não tenha sido elucidado, várias hipóteses são apontadas. A mais difundida é devido a protonação do grupamento amino e sua interação com a porção carregada negativamente dos fosfolipídeos da membrana celular dos micro-organismos (LIU, *et al.*, 2004). Existem também outras teorias como, por exemplo, a quitosana causa grandes alterações na superfície da célula e cobre a membrana exterior o que decorre da perda da função de barreira, devido à ligação da quitosana com a membrana externa (HELANDER, *et al.*, 2001).

## **2. OBJETIVO**

### ***2.1. Objetivo Geral***

Realizar uma investigação aprofundada da utilização da quitosana e aditivos, tais como, fotossensibilizadores e demais materiais na fotoinativação de micro-organismos, no intuito de buscar novas alternativas e ampliar, de forma sinérgica, o potencial de atividade antimicrobiana da quitosana.

### ***2.2. Objetivos Específicos***

- Investigar de forma comparativa as propriedades e características de quitosanas de diferentes marcas por caracterizações estruturais de Espectroscopia de infravermelho, Difração de raios-X e Termogravimetria.
- Estudar sistematicamente a ação antimicrobiana da quitosana com relação ao pH em que se encontra e avaliar se existe interferência do meio ácido de solubilização da quitosana nos resultados.
- Avaliar a interação da quitosana com diferentes fotossensibilizadores e se ocorre efeito sinérgico de propriedades ou interferência na fotoinativação de micro-organismos.
- Investigar as propriedades aglutinantes/agregantes da quitosana com nanopartículas de ouro e sua interação (com melhoria de ação) e/ou possível interferência na atividade antimicrobiana da quitosana.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. *Materiais e reagentes*

Os reagentes utilizados em sua maioria apresentaram grau de pureza acima de 90% ou pureza analítica. A quitosana utilizada nos experimentos foi comprada de duas fontes distintas, comercial e Sigma-Aldrich.

#### 3.2. *Preparo de soluções*

##### 3.2.1. Solução salina

Solução de Cloreto de Sódio (NaCl)  $0,154 \text{ mol L}^{-1}$  ou 0,9% (m/v) foi preparada com a dissolução de 9 g do sal para 1 litro de solução.

##### 3.2.2. Solução estoque de ftalocianina de zinco (ZnPc).

As soluções estoque de ftalocianina de zinco (ZnPc) a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  foram preparadas com a dissolução do corante em dimetilformamida. O recipiente contendo a solução estoque foi mantido sobre refrigeração ao abrigo da luz quando não estava sendo usado.

##### 3.2.3. Solução estoque de azul de metileno (AM).

Solução estoque de azul de metileno (AM) foi preparada na concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A solução foi mantida a  $4^\circ\text{C}$  na ausência de luz até o momento do uso.

##### 3.2.4. Solução de ácido acético (HAc)

A solução de ácido acético (HAc) foi preparada na concentração de 1% (v/v) ou  $0,174 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.2.5. Solução de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )

A solução de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) foi preparada na concentração de  $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.2.6. Solução de hidróxido de sódio

A solução de hidróxido de sódio a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada a partir da dissolução dos cristais de  $\text{NaOH}$  em béquer contendo água deionizada

### 3.2.7. Solução de quitosana

A proporção de 1 mg de quitosana a cada 1 mL de solução foi adicionada a um béquer contendo solução de ácido acético 1% (v/v) sob agitação magnética até completa solubilização da quitosana. A solução de quitosana com pH inicial igual a 3 foi separada em diversas porções e ajustado o pH da solução com as soluções de bases acima citadas a faixas de pH definidas: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0.

## **3.3. Caracterização estrutural por Espectroscopia Infravermelho (IV)**

As medidas de IV foram realizadas no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, da marca SHIMADZU IR PRESTIGE-21, pertencente ao laboratório de multiusuários da pós graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras foram analisadas em Brometo de Potássio ( $\text{KBr}$ ), e os espectros foram obtidos na região espectral de  $4000$  a  $450 \text{ cm}^{-1}$ .

## **3.4. Caracterização estrutural por Difração de raios-X**

Os difratogramas de raios X (DRX) foram obtidos em um equipamento Shimadzu XRD-6000, com radiação  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), e as seguintes condições de trabalho: voltagem  $40 \text{ kV}$ , corrente  $30 \text{ mA}$ , velocidade de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ , na faixa de valores ( $2\theta$ ) de  $5$  a  $70^\circ$ , com velocidade de passo igual a  $0,02^\circ \text{ s}^{-1}$ . As amostras

foram preparadas a partir da amostra em pó, prensando o sólido com placa de vidro em porta amostra de vidro.

### **3.5. Caracterização por Termogravimetria (TG)**

As curvas TG foram obtidas utilizando-se um sistema de análise termogravimétrica (ATG) Shimadzu DTG-60H *simultaneous* DTA-TG *apparatus*, com velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera de  $\text{N}_2$  (vazão de  $30\text{ mL min}^{-1}$ ), com massa aproximadamente de 6 mg em cadinho de alumínio no intervalo de temperatura de 20 – 600  $^{\circ}\text{C}$ . As curvas TG das amostras foram obtidas para verificar o perfil da decomposição térmica. A amostra de referência utilizada foi alumina.

### **3.6. Teste de Viscosidade**

As soluções de quitosana comercial e Sigma-Aldrich (peso molecular médio) foram preparadas na concentração de 1 mg a cada 1 mL de solução. O pH das soluções foi variado de modo a descobrir a influência do pH na viscosidade das soluções de quitosana. Também foi investigado se havia diferença nas viscosidades entre quitosana Polymar e Sigma-Aldrich.

O viscosímetro de vidro capilar de Ostwald tamanho 150 foi utilizado para determinar as viscosidades das amostras à temperatura ambiente ( $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A influência da temperatura sobre as viscosidades não foi investigada.

### **3.7. Avaliação da eficácia antimicrobiana**

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. A marca da quitosana, os pHs do meio de solubilização da quitosana, concentração de quitosana, solvente, e interação com aditivos foram variados. A efetividade antimicrobiana da quitosana foi testada frente à *Escherichia coli* na escala nefelométrica (padrões de turvação) de Mc Farland, que é utilizada para a padronização da concentração bacteriana em uma suspensão através da turbidez.



Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana da quitosana foram com relação à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* e os meios de cultura utilizados foram os meios sólidos ágar eosina azul de metileno (EMB), ágar com “*Rapid HiBroth Coliform*” (RHBC) e o meio líquido caldo RHBC e LMX, preparados segundo protocolo impresso do fabricante.

Para todos os ensaios microbiológicos foram realizados controles contendo apenas bactérias, controles do meio de solubilização da quitosana e demais solventes, para confirmar a ação antibacteriana da quitosana e aditivos e não de interferentes ou contaminações cruzadas.

#### 3.7.1. Ensaios de concentração mínima inibitória (CMI)

Os ensaios de concentração mínima inibitória foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços utilizando a solução de quitosana a diferentes faixas de pH e o fotossensibilizador em diluições sucessivas (fator de diluição igual a 1/2), o aditivo (solução salina ou água deionizada), a suspensão celular de *Escherichia coli* e o meio de cultura líquido (caldo LMX ou RHBC). Após o preparo das placas, as mesmas foram colocadas em estufa a 37 °C durante 24 horas.

#### 3.7.2. Ensaios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os ensaios para determinação de unidades formadoras de colônia de *Escherichia coli* foram feitos utilizando 50 µL do inóculo em contato com 50 µL de solução de quitosana na escala Mc Farland. Após o tempo de incubação e irradiação previsto no protocolo, 10 µL e 100 µL da suspensão celular foram colocados em placas de petri e foram cobertas com Agar e meio nutritivo RHBC.

As placas foram colocadas em estufa à 37 °C durante 48 horas e a contagem das Unidades Formadoras de Colônia foi realizada com o auxílio de um contador de colônias.

### **3.8. Testes de Solubilidade das quitosanas**

As amostras de quitosana foram testadas quanto a solubilidade em diferentes pHs à temperatura ambiente. Foram preparadas soluções em tubos de ensaios a 1 mg de quitosana a cada 1 mL de solução. Foram testados vários pHs (3,0 a 7,0), água deionizada (pH= 7,0), solução salina (pH= 6,5) e solução hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> (pH= 12,0). As amostras foram mantidas sob agitação magnética por 30 minutos e em seguida agitadas a cada 10 minutos no intervalo de 30 minutos, depois foram deixadas em repouso *over night*.

### **3.9. Teste da interação da quitosana com corantes na fotoinativação de microrganismos**

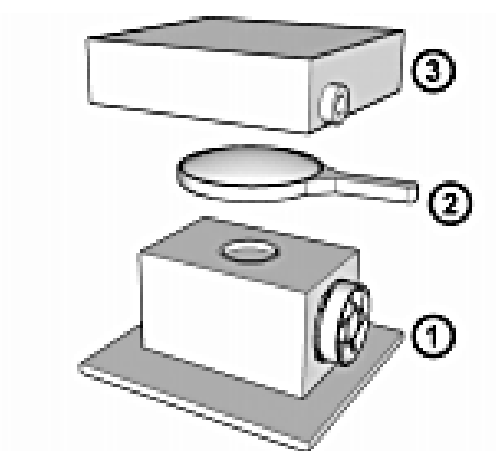
Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. A marca da quitosana usada foi Sigma-Aldrich e a quitosana foi suspensa em água na razão de 1 mg de quitosana para cada 1 mL de água. Também foi variada os tipos de corantes: Ftalocianina de Zinco, Rosa de Bengala e Azul de Metileno e suas concentrações. A efetividade antimicrobiana da quitosana foi testada frente à *Escherichia coli* na escala nefelométrica (padrões de turvação) de Mc Farland, que é utilizada para a padronização da concentração bacteriana em uma suspensão através da turbidez.

#### **3.9.1. Ensaio de concentração mínima inibitória (CMI)**

A suspensão bacteriana foi preparada utilizando como referência a escala de Mc Farland na graduação 0,1. Em seguida a bactéria foi misturada aos corantes em microdiluição seriada (fator de diluição igual a 1/2). As placas foram incubadas durante 15 minutos em estufa à 37°C e separadas dependendo da sua exposição à luz: irradiada e controle não irradiado. Posteriormente, com a adição de um meio de cultura adequado, a placa é deixada em uma estufa à 37°C por 24 horas para coleta de resultado.

### 3.9.2. Sistema de irradiação.

O PHLS, sistema de irradiação desenvolvido pelo grupo em trabalhos anteriores foi utilizado neste trabalho (PAULA, SANTOS, OLIVEIRA, *et al.* 2010). Este sistema de irradiação é constituído de uma (1) lâmpada halógena utilizada em retroprojetores (marca OSRAM, modelo ENH, potência de 250W), acoplada a uma caixa metálica proveniente de uma fonte de alimentação ATX. Nessa estrutura foi inserido um “cooler” de fonte de alimentação (1). Possui também uma (2) lupa de leitura de vidro cristal 100% (marca DFV, modelo LL-P100, com 100 mm de diâmetro, 175 mm de foco, armação plástica, aumento de 1,5 vezes) fixada à uma distância de 7 cm da lâmpada e a uma distância de 22,5 cm de uma (3) cuba de refrigeração de vidro oca de formato retangular, com 5 cm de percurso, ao qual foi soldado um bocal permitindo a fixação de mangueiras de silicone em suas extremidades para circulação de água em seu interior. Essa cuba permite a passagem de fluxo de água visando à refrigeração da região próxima à amostra. A Figura 6, abaixo, ilustra o aparelho e sua descrição.



**Figura 6.** Sistema de irradiação PHLS. (PAULA, SANTOS, OLIVEIRA, *et al.* 2010)

### 3.10. *Testes de propriedades agregantes da quitosana*

Os testes de atividade aglutinante foram realizados utilizando uma metodologia desenvolvida no LABIOFOT através de nanopartículas de ouro (ouro coloidal).

### 3.10.1. Preparo das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram preparadas de acordo com o descrito em MELO JR (2012).

A solução de  $\text{HAuCl}_4$  a uma concentração de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  foi aquecida até ebulição em um erlenmeyer, com agitação. Rapidamente foram adicionadas 5,0 mL de solução 1% de citrato de sódio e a solução foi mantida em ebulição e agitação, tampada com um vidro de relógio, por 10 min. O aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em outra placa de agitação, porém sem aquecimento. A barra magnética foi, então, removida e a solução foi resfriada à temperatura ambiente sem a utilização de banho de gelo.

### 3.10.2. Ensaaios de propriedade agregante

A propriedade agregante ou aglutinante da quitosana foi avaliada utilizando nanopartículas de ouro 15 nm, variando concentração de quitosana, marca, pH e diferentes meios em que a quitosana estava suspensa. O teste foi realizado em placas de microdiluição sendo realizadas diluições seriadas da proteína de quitosana com a posterior adição do ouro coloidal. Após a microdiluição, a amostra foi incubada por 45 minutos para constatação do resultado. O microscópio STEMI 2000-C da marca ZEISS foi utilizado para tirar fotografias dos poços com aproximação de 50 x.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Quitosana Polymar versus Quitosana Sigma-Aldrich*

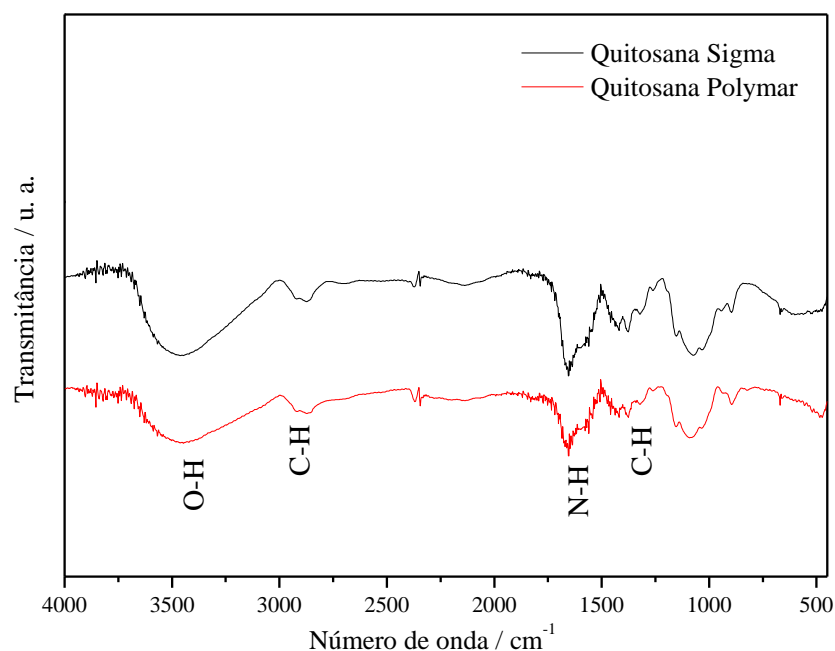
De modo a determinar possíveis contaminantes ou interferentes, foram realizadas caracterizações físico-químicas para nível de comparação entre as duas marcas de quitosana, Polymar e Sigma-Aldrich. A quitosana dos dois fornecedores não passou por nenhum procedimento de purificação ou de melhoria do material.

#### 4.1.1. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica instrumental rápida e simples dependente da interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética, evidenciando a presença de grupos funcionais. Essa radiação causa aumento da amplitude de vibrações das ligações covalentes entre átomos e grupos funcionais de compostos orgânicos e de insaturações. Nos compostos orgânicos os grupos funcionais possuem átomos ligados por arranjos específicos, então a absorção de energia IV por uma molécula orgânica ocorrerá de modo característico destes grupos funcionais, específicos daquela molécula.

O espectro de infravermelho pode ser considerado a impressão digital da molécula, pois como tem muitas bandas de absorção, a possibilidade de dois compostos apresentarem o mesmo espectro é praticamente inexistente (SILVERSTEIN, *et. al.*, 1994).

Os espectros de infravermelho das amostras de quitosana comercial Polymar e quitosana Sigma-Aldrich estão representadas na Figura 7.



**Figura 7.** Espectros de IV das amostras de quitosana Polymar e Sigma-Aldrich.

A Figura 7 exibe os espectros espectroscopia IV das quitosanas na região espectral de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ . As quitosanas de marcas distintas apresentaram grande semelhança no perfil espectral. Banda em 1600  $\text{cm}^{-1}$  devido a deformação  $\text{NH}_2$  que predomina sobre a banda em 1655  $\text{cm}^{-1}$ , em que esta última banda está associada à carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) que tende a diminuir, conforme aumenta o grau de desacetilação da quitosana. As bandas observadas na região dos 850- 900  $\text{cm}^{-1}$  devem-se a estiramentos simétricos da ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ . Bandas com deformações em 1380  $\text{cm}^{-1}$  referentes a  $\text{C}=\text{O}-\text{NH}$  e grupo  $\text{CH}_2$  e em 1420  $\text{cm}^{-1}$  deformação simétrica do  $\text{CH}_3$ . Estiramentos antissimétricos da ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  foram identificados na região dos 1150  $\text{cm}^{-1}$ , e o estiramento  $\text{C}-\text{OH}$  aparece em 1270  $\text{cm}^{-1}$ . As quitosanas das diferentes marcas possuem os mesmos grupos químicos e semelhança estrutural, mas devido a graus de desacetilação diferenciados observam-se diferenças nas intensidades e posição de algumas bandas, sugerindo que houve deslocamento das mesmas. A Tabela 1, apresenta as principais bandas características da quitosana.

**Tabela 1.** Principais bandas características da quitosana.

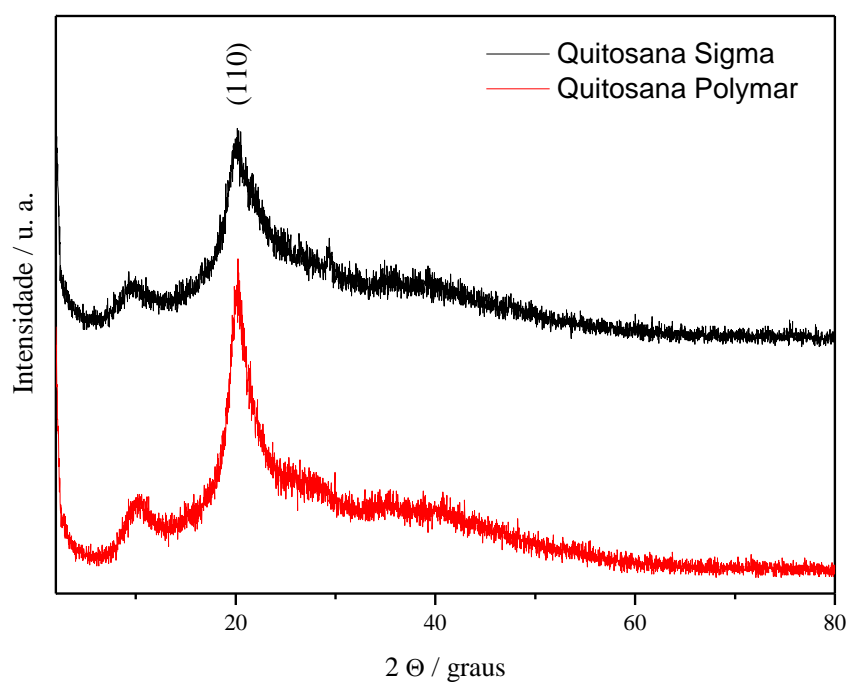
AMOSTRA	ATRIBUIÇÃO	NÚMERO DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )
QUITOSANA	$\nu$ (O-H)	3450
	$N_{\text{sim}}$ (C-H)	2925
	$\delta$ (N-H)	1630
	$\Delta_{\text{sim}}$ (C-H)	1375

#### *4.1.2. Difração de raios x*

A finalidade do uso de difração de raios X é apropriada para determinação dos índices de cristalinidade de quitosana.

O difratograma mostra dois picos característicos da quitosana em  $2\theta \approx 10^\circ$  (regiões amorfas) e  $2\theta \approx 20^\circ$  (regiões cristalinas) e ambas as marcas apresentaram o mesmo perfil (JAWORSKA, SAKURAI, GAUDON e GUIBAL, 2003). No processo de desacetilação da quitina para produção de quitosana vários picos desaparecem, porém os picos nas regiões citadas são mantidos para a quitosana. Quando a extensão da desacetilação aumenta, a intensidade do pico em  $2\theta \approx 20^\circ$  tende a diminuir, ou seja, o índice de cristalinidade relativo é inversamente proporcional à desacetilação, quanto maior índice de cristalinidade menor será o grau de desacetilação.

A quitosana da marca Polymar apresentou uma maior intensidade em ambos picos característicos  $2\theta \approx 10^\circ$  e  $2\theta \approx 20^\circ$  indicando uma maior cristalinidade, ou seja, o grau de desacetilação do produto desta marca é menor que da marca Sigma-Aldrich. A Figura 8, mostra os difratogramas de raios-X comparativos das quitosanas de marcas diferentes.

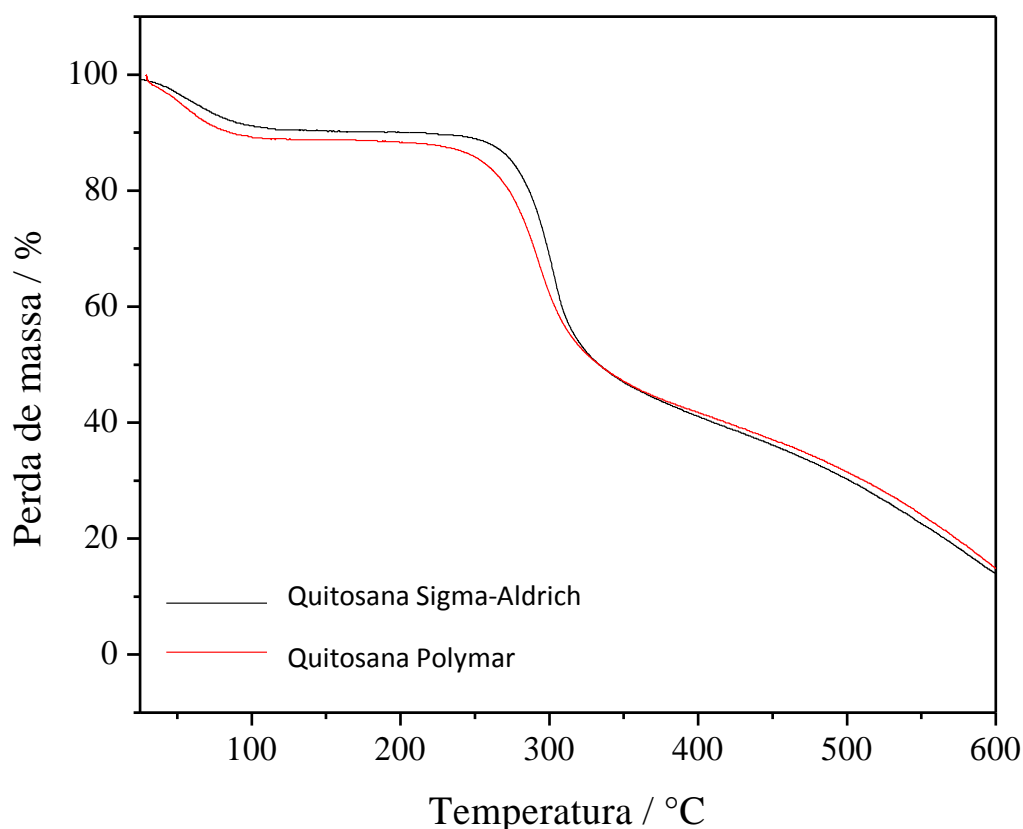


**Figura 8.** Difratomogramas de Raios-X de quitosana Sigma-Aldrich e quitosana Polymar.

#### 4.1.3. Análise Termogravimétrica (ATG)

As curvas TG, Figura 9, apresentam três eventos térmicos: perda de massa referente à evaporação de água, a material orgânico e, por final, material inorgânico e possível formação de óxidos. Na Figura as curvas termogravimétricas (TG) são a representação gráfica da medida comparativa entre as marcas diferentes de quitosana, submetidas à taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  sob atmosfera de nitrogênio, relacionando a perda de massa em função da temperatura.





**Figura 9.** Curvas de TG de quitosana Sigma-Aldrich e Polymar.

Na primeira decomposição, houve uma perda de 8,81% de massa até 100 °C para quitosana Sigma-Aldrich referente à perda de água e de 10,78% para a quitosana Polymar. A segunda decomposição começou a ocorrer em 270 °C e teve a maior perda de massa em 300 °C, com perda de massa de 43,62% para quitosana sigma e para a quitosana Polymar começou a ocorrer a 260 °C teve seu pico de perda de massa a 290 °C, com perda de massa de 38,34%, referente a material carbonizado. No terceiro evento, ocorreu decomposição, referente à perda de material inorgânico, a temperaturas acima de 500 °C, com perda de 31,61% para quitosana Sigma e 30,54 % para quitosana Polymar.

Com relação à perda de massa referente à evaporação de água, a quitosana da marca Sigma-Aldrich apresentou moléculas de água mais fortemente agregadas do que a quitosana da marca Polymar. No segundo evento, perda de massa por perda de material orgânico, sugere-se que a quitosana da marca Sigma-Aldrich apresenta uma maior estabilidade energética já que a temperatura de pico foi maior do que a quitosana

da marca Polymar. Os eventos bem definidos são consistentes com os resultados apresentados por Andrade (2007) que trabalhou na otimização de quitosana e obteve quitosanas com variados graus de desacetilação e os eventos termogravimétricos também foram bem definidos e com taxas de perdas de massa aproximadas às aqui apresentadas.

#### 4.1.4. Teste de Viscosidade

A viscosimetria é um método simples e rápido para obtenção do peso molecular relativo de um polímero. A viscosidade da quitosana em dispersão é influenciada por muitos fatores, tais como: grau de desacetilação do polímero, peso molecular, concentração, força iônica, pH do meio e temperatura. Geralmente com o aumento da temperatura, a viscosidade da dispersão polimérica diminui. Contudo, a mudança do pH na dispersão polimérica pode levar a diferentes resultados, dependendo do tipo de ácido empregado. Com ácido acético, a viscosidade da quitosana tende a aumentar com a diminuição do pH, enquanto que, com ácido clorídrico, a viscosidade diminui (DAMIAN, BEIRÃO, *et al.*, 2005). O objetivo deste experimento foi avaliar a diferença entre as viscosidades relativas das duas marcas com relação ao pH.

Signini e Campana Filho (1998) descreveram um procedimento para análise de viscosidade intrínseca dependente do Grau de desacetilação e para determinar a massa molecular da quitosana. Os autores usaram como referência o pH 4,5 (solução tampão de ácido acético / acetato de sódio), para subsequente diluição seriada, ou seja, mantiveram o valor de pH e variaram a concentração de quitosana.

Diferentemente deste trabalho em que a concentração de quitosana se manteve fixa na razão de 1 mg de quitosana para 1 mL de solução de ácido acético e foram variados os valores de pH. Os pHs das soluções foram ajustados utilizando hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>. Tempos de escoamento diferentes foram obtidos e o cálculo de viscosidade relativa foi feito com relação à solução sem quitosana. Foram variados os valores de pHs desde pH=3,0 a pH=7,0, com variações de 0,5. A Equação (2), de viscosidade relativa, é apresentada abaixo:

$$\eta_{rel} = \frac{T_A}{T_B} \quad \text{Equação (2)}$$

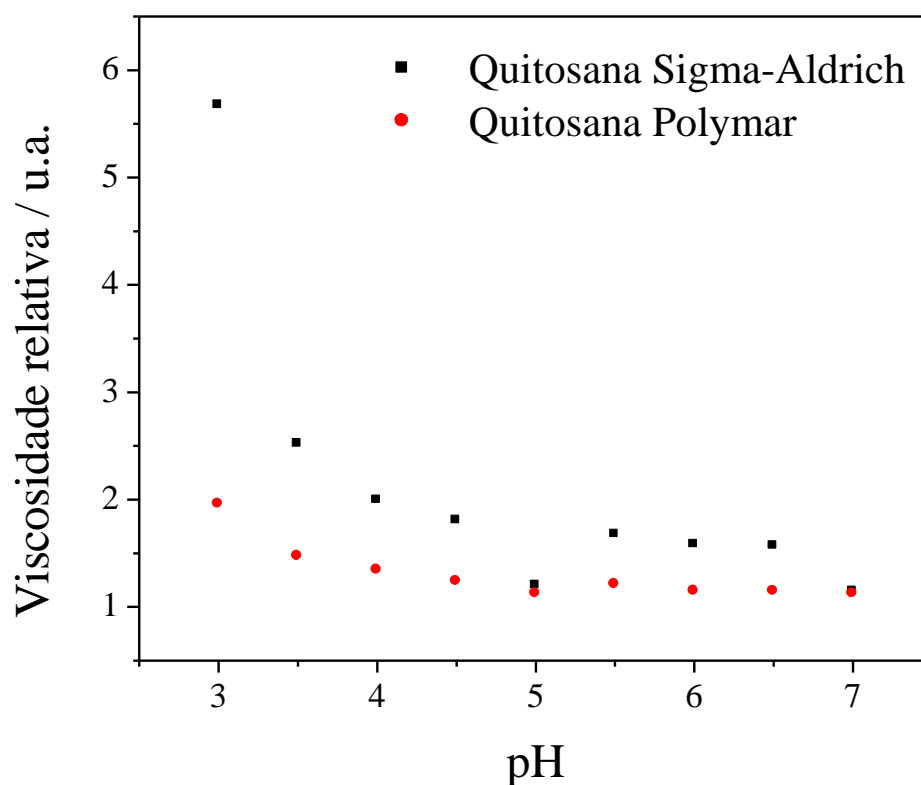
Em que  $\eta_{rel}$  é a viscosidade relativa, TA é o tempo de escoamento com da solução com quitosana e TB é o tempo de escoamento padrão, ou seja, da solução sem quitosana.

A tabela abaixo apresenta a média de três medidas dos tempos de escoamento da suspensão de quitosana e da solução sem quitosana como solvente para cálculo de viscosidade relativa. São apresentados também os valores de viscosidade relativa para ambas as marcas usando a Equação 2, citada acima.

**Tabela 2.** Tempos de escoamento médios das soluções contendo quitosana e sem quitosana e a viscosidade relativa das marcas Sigma-Aldrich e Polymar com relação ao pH.

	TA <sub>médio</sub> (s)		TB <sub>médio</sub> (s)	Viscosidade Relativa ( $\eta_{rel}$ )	
	Sigma	Polymar	Solução HAc 1%	Sigma	Polymar
<b>pH 3,0</b>	128,38	44,24	22,64	5,670495	1,954064
<b>pH 3,5</b>	56,41	32,94	22,41	2,517180	1,469880
<b>pH 4,0</b>	44,49	29,97	22,36	1,989714	1,340340
<b>pH 4,5</b>	39,87	27,28	22,12	1,802441	1,233273
<b>pH 5,0</b>	27,40	25,60	22,90	1,196507	1,117904
<b>pH 5,5</b>	38,36	27,70	22,94	1,672188	1,207498
<b>pH 6,0</b>	36,44	26,51	23,12	1,576125	1,146626
<b>pH 6,5</b>	35,45	25,89	22,67	1,563741	1,142038
<b>pH 7,0</b>	25,94	25,47	22,73	1,141223	1,120546

A Figura 10, a seguir, apresenta graficamente os valores mostrados na Tabela 2, com as viscosidades relativas em relação aos valores de pH das duas marcas de quitosana comercial.



**Figura 10.** Curvas de viscosidade relativa de diferentes marcas de quitosana com relação ao pH.

De acordo com a figura percebemos que ocorre um decréscimo da viscosidade quando o pH é elevado. No caso da quitosana Polymar a solução se mostrou menos viscosa para um mesmo valor de pH e com variações muito pequenas de viscosidade. Já a quitosana da marca Sigma-Aldrich apresentou grande variação, principalmente do pH 3,0 para 3,5, em que o tempo de escoamento foi reduzido quase em 50 %. Observa-se também que houve uma queda não esperada da viscosidade em pH 5,0 com subsequente elevação a pH 5,5.

Apesar do objetivo não ter sido o cálculo do peso molecular, a evidência da grande diferença entre as curvas das viscosidades relativas das diferentes marcas, leva a crer que seja devido ao grau de desacetilação e a disponibilidade de grupamentos amino na molécula, já que quanto mais grupamento amino ocorre uma maior protonação e maior solubilização da quitosana.

Franca e colaboradores (2008) fizeram estudos teóricos sobre caracterização da estrutura molecular da quitosana em solução aquosa. Seus cálculos mostraram que dependendo do pH do meio, a estrutura molecular da quitosana adquire diferentes

conformações no espaço. Essa diferença de conformação espacial permite interações eletrostáticas entre íons do meio, moléculas de quitosana vizinhas e água. Tornando possível em valores baixos de pH alta solubilidade e alta viscosidade.

#### 4.1.5. Testes de atividade antimicrobiana

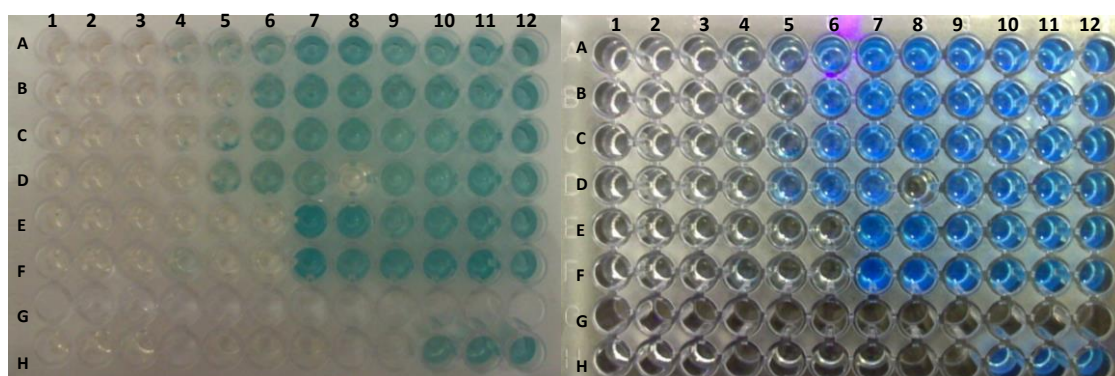
Experimentos iniciais foram realizados para comparar a ação antibacteriana da quitosana Polymar e quitosana Sigma-Aldrich (peso molecular médio) variando o pH da solução em que a quitosana estava solubilizada. A solução de ácido acético (HAc) 1% teve o pH ajustado com hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> desde o pH inicial 3,0 ao a 7,0 (variando em 0,5). Também foi avaliado se ocorre a ação do meio de solubilização da quitosana na inviabilidade de crescimento celular, caracterizando uma possível interferência no resultado ou na ação da quitosana frente a bactérias. Os ensaios foram feitos em duplicatas, com a quitosana da marca Sigma-Aldrich, da marca Polymar e o meio sem quitosana, com os controles dos solventes, reagentes e das bactérias com o caldo nutritivo na linha H. É importante salientar que controles contendo apenas bactérias sempre devem indicar crescimento microbiano, já os demais controles não.

A leitura foi feita visualmente já que o caldo nutritivo utilizado indica crescimento microbiano (*E. coli*) ocorre a fluorescência em luz negra, ou seja, há a diferenciação da coloração das células, em que as células viáveis liberam metabólitos que combinados ao caldo apresentam cor azulada em luz branca ambiente e fluorescência em luz negra. A Tabela 3, a seguir detalha o procedimento realizado nas placas de 96 poços.

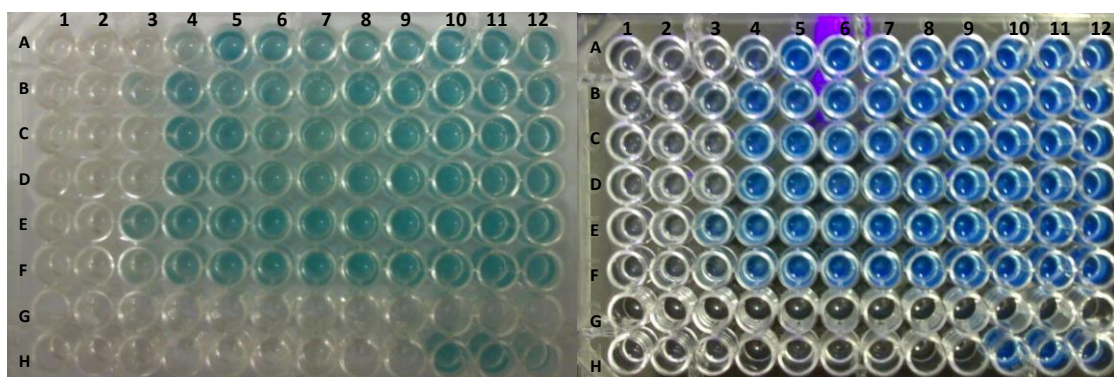
**Tabela 3.** Procedimento experimental avaliando a qualidade da quitosana e a inibição do crescimento microbiano em diferentes valores de pH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Quitosana Sigma-Aldrich solubilizada em HAc pH de 3,0 a 7,0 diluída horizontalmente + E. coli + caldo nutritivo											
B												
C	Quitosana Polymar solubilizada em HAc pH de 3,0 a 7,0 diluída horizontalmente + E. coli + caldo nutritivo											
D												
E	HAc 1% ajustado o pH de 3,0 a 7,0 com NaOH 0,5 mol L <sup>-1</sup> diluída horizontalmente + E. coli + caldo nutritivo											
F												
G												
H	Controle apenas água					Controle apenas caldo nutritivo					Controle apenas bactérias	

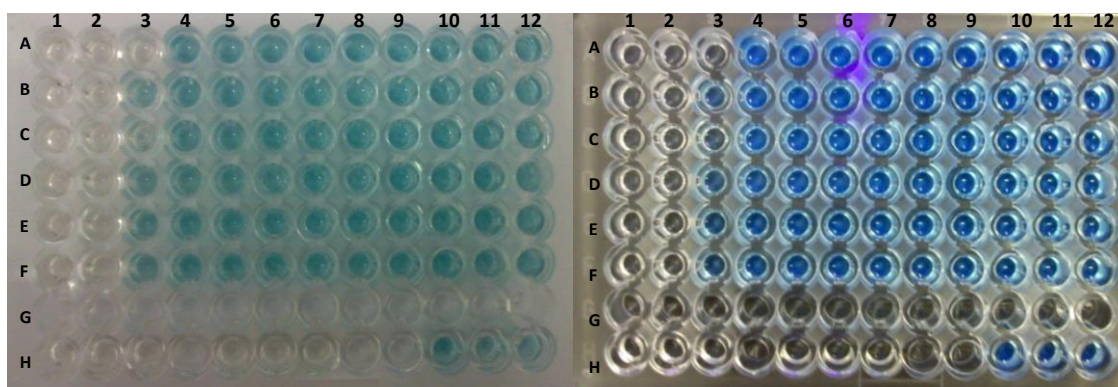
As Figuras 11 a 19 mostram as fotos dos resultados do ensaio de acordo com o procedimento experimental mostrado na Tabela 3 em diferentes valores de pH, observado em luz branca e luz negra.



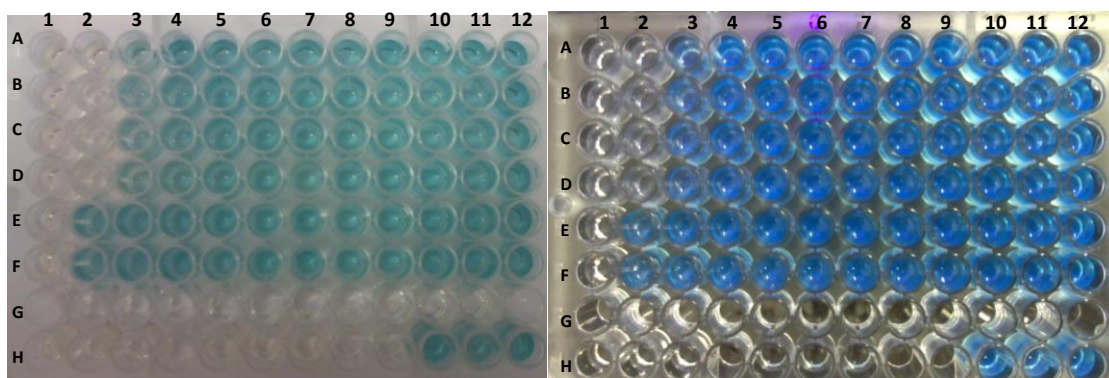
**Figura 11.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 3,0 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.



**Figura 12.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 3,5 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

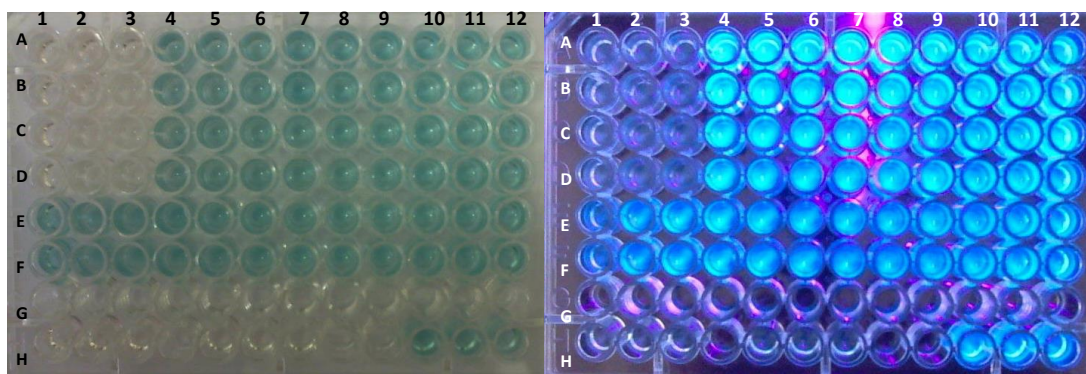


**Figura 13.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 4,0 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

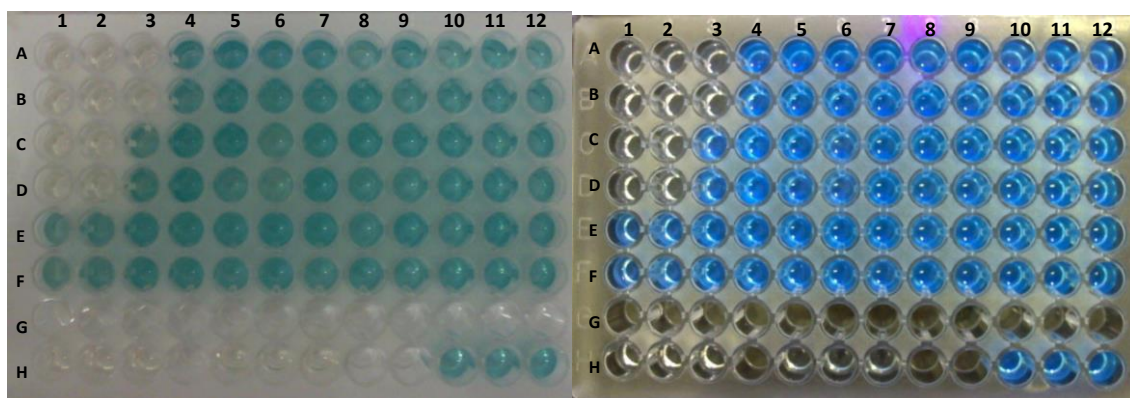


**Figura 14.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 4,5 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

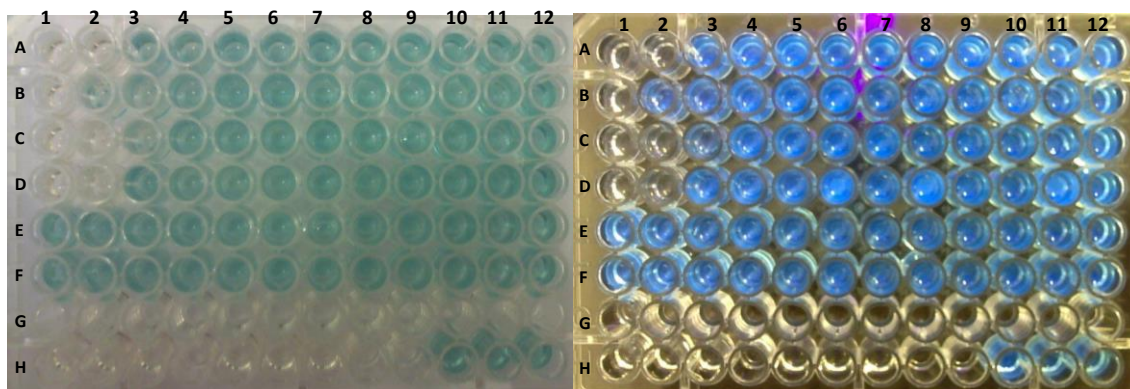




**Figura 15.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 5,0 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

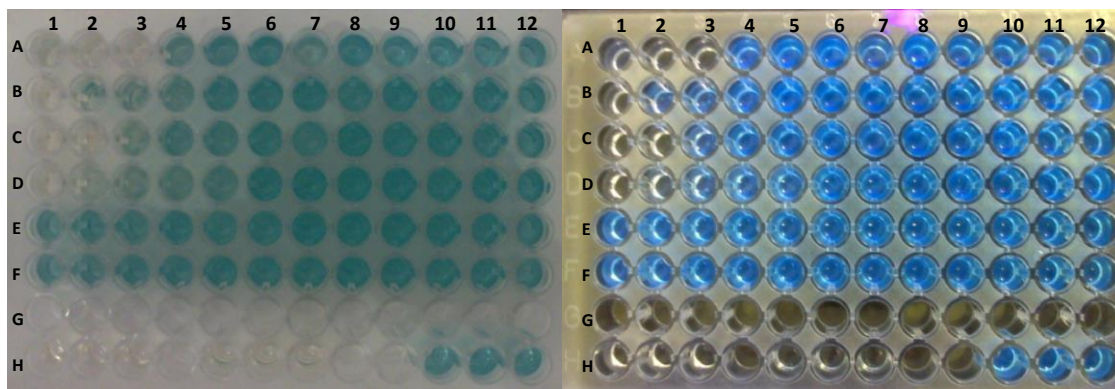


**Figura 16.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 5,5 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

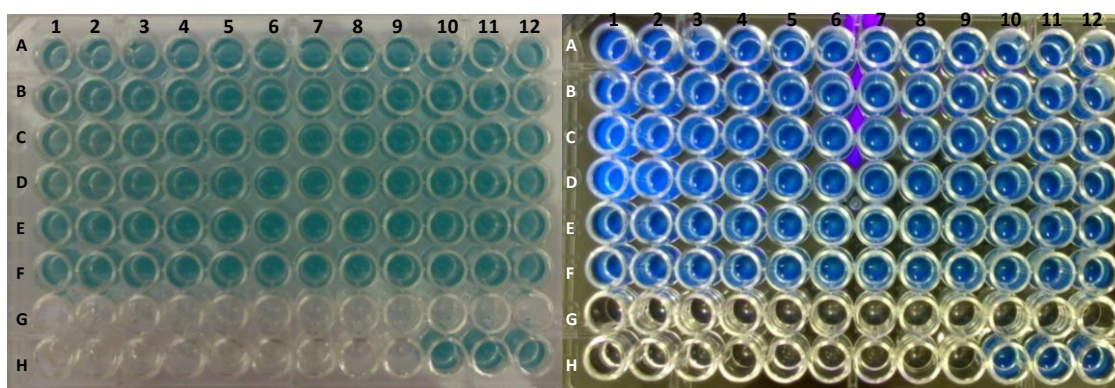


**Figura 17.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 6,0 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.





**Figura 18.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 6,5 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.



**Figura 19.** Resultado de inativação microbiana para a quitosana solubilizada em HAc 1% a pH ajustado para 7,0 visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.

As Figuras mostram uma tendência de deslocamento de viabilidade celular nas linhas E e F, do pH 3,0 (Fig. 11) ao pH 5,0 (Fig. 15), em que é possível perceber que o meio ácido de solubilização da quitosana atua na inibição do crescimento microbiano. A partir do pH 5,0 (Fig. 15) ao pH 6,5 (Fig. 18) é possível perceber que a quitosana tanto da marca Sigma-Aldrich quanto da Polymar apresentam a mesma faixa inibitória do crescimento de *E. coli* e já não há interferência da ação do meio ácido na inativação dos micro-organismos. Em pH neutro, fica evidente que a quitosana não atua mais como agente antibacteriano devido ao crescimento celular em toda a placa. O evento observado entre os pHs 5,0 e 6,5 é explicado pela presença do grupamento amino na molécula de quitosana e que em valores de pHs menores encontra-se protonado, sendo assim, há uma interação maior com a membrana plasmática da bactéria que possui carga

negativa. O mecanismo exato de morte celular das bactérias por ação da quitosana ou a inibição de seu crescimento não foi elucidado, mas acredita-se que seja causado pela interação eletrostática entre grupamentos  $\text{NH}_3^+$  da QTS e os grupos fosforil dos componentes de fosfolipídeos das membranas (LIU, DU, *et al.*, 2004).

As fotografias das placas também mostraram que a pH 5,0 a concentração mínima inibitória de quitosana para ser eficaz na inviabilidade celular de *E.coli* é de 0,25 mg de quitosana para 1 mL de solução ácida. E em pH 6,5 fica entre 0,25 ou 0,5 mg de quitosana para 1 mL de solução ácida.

Os resultados de inativação de micro-organismos se mostrou satisfatório para ambas as marcas. Porém, o grau de desacetilação ou a proporção de grupamentos aminos protonados maior é mais útil e eficaz com o propósito deste trabalho. Então diante do evidenciado nas técnicas de caracterização, a quitosana da marca Sigma-Aldrich é mais desacetilada e mais estável termicamente do que a quitosana da marca Polymar e por isso mais condizente com o propósito do trabalho desenvolvido. A quitosana da marca Polymar apresentou resultados promissores.

#### ***4.2. Testes de solubilidade da quitosana e viabilidade celular***

Os testes de solubilidade da quitosana em diversos meios foram realizados para avaliar a influência da solubilidade na inibição do crescimento microbiano. A quitosana usada neste teste foi da marca Sigma-Aldrich. A Tabela 4 apresenta o resultado relacionando os dois parâmetros.

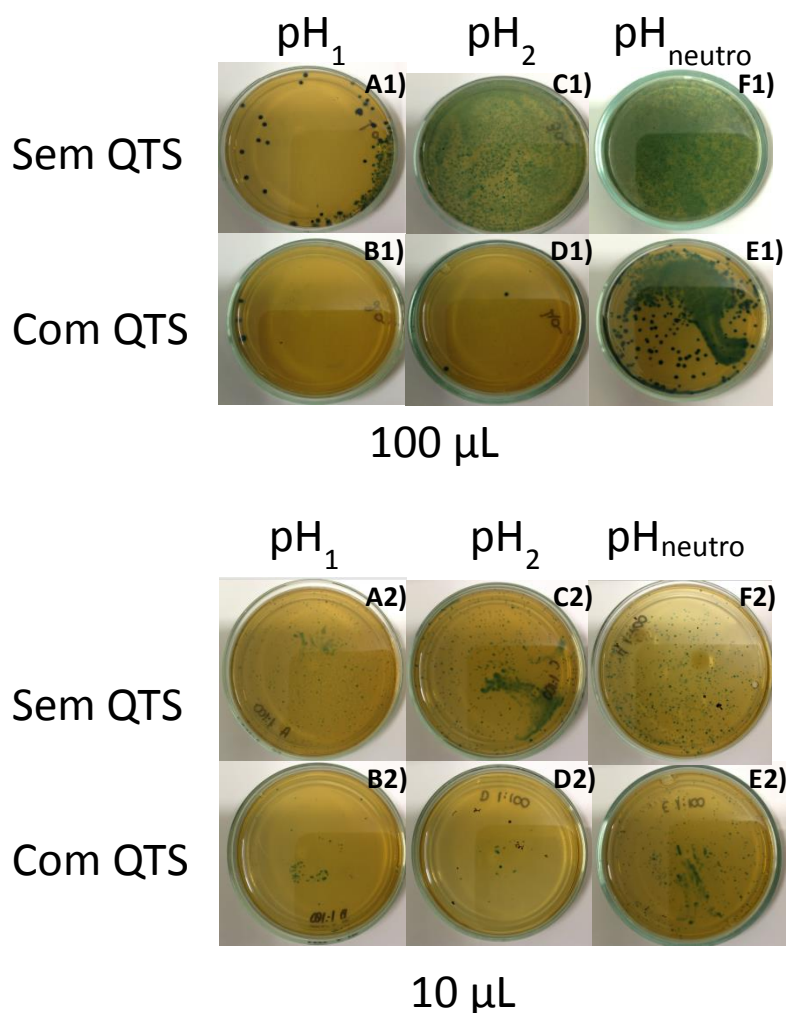
**Tabela 4.** Resultado dos testes de solubilidade e viabilidade celular da quitosana (concentração de 1 mg/1 mL) em diversos meios.

	Solubilidade após 1 hora Temp. amb.	Solubilidade após 1 hora Temp= 80 °C	Inibição do crescimento microbiano
HAc 1% pH = 3,0 + QTS	Solúvel	Solúvel	Ocorre
HAc 1% +NaOH 1M pH= 5,5 + QTS	Solúvel	Solúvel	Ocorre
HAc 1% +NaOH 1M pH= 6,5+ QTS	Solúvel	Solúvel	Ocorre
Água deionizada pH = 7,0+ QTS	Não Solúvel	Parcialmente Solúvel	Não Ocorre
Solução Salina pH=6,5+ QTS	Não Solúvel	Parcialmente Solúvel	Não Ocorre
NaOH 1molL <sup>-1</sup> pH=12,0+ QTS	Não Solúvel	Não Solúvel	Não Ocorre

Os testes de viabilidade celular também foram realizados com os controles, ou seja, as soluções sem quitosana para ser avaliado se ocorreria interferência do meio na inibição do crescimento microbiano. No caso do ácido acético a pH 3,0 ocorreu a inibição do crescimento microbiano, indicando que nessa faixa de pH a inviabilidade de crescimento celular bacteriano se dá pelo efeito do HAc 1% e não da quitosana protonada. As soluções de HAc 1% com o pH ajustado para 5,5 e 6,5 não foi observada a inativação de micro-organismos, na ausência de quitosana. Em água, solução salina e NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> não foi observada morte celular ou inibição do crescimento microbiano na presença de quitosana que é devido à não protonação dos grupos amino e precipitação da quitosana nestes meios.

O ensaio quantitativo (Contagem das Unidades Formadoras de Colônia – UFC) da ação antimicrobiana da quitosana foi realizado em placas petri com alíquotas do teste de solubilidade e adicionado meio de cultura. A Figura 20, ilustra com fotografias o resultado. No primeiro caso, foram retirados 100 µL de A1) e B1) HAc 1% a pH 5,5 sem quitosana e com quitosana, respectivamente; C1) e D1) HAc 1% a pH 6,5 sem quitosana e com quitosana, respectivamente; E1) quitosana em água destilada a pH

neutro com bactérias; F1) controle contendo apenas bactérias. O segundo caso, é igual ao primeiro o que diferencia é o volume da alíquota que foi 10 µL.



**Figura 20.** Imagem das placas após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C.

As fotos das placas apresentadas mostraram o resultado da inibição do crescimento microbiano do meio de solubilização da quitosana com e sem a quitosana a valores de pH 5,5 e 6,5, respectivamente, suspensão de quitosana em água destilada e o controle. Independente da ausência ou presença de quitosana ocorreu uma diminuição do crescimento microbiano em relação ao controle, provavelmente devido à ação do pH sobre as bactérias.

A partir desse ensaio foi observado que em pH 6,5 há uma menor inibição do crescimento microbiano quando a quitosana não está presente e uma maior inibição

microbiana quando a quitosana está presente, com relação aos resultados obtidos em pH 5,5. Neste pH, há uma maior porção protonada na cadeia da quitosana, o que gera uma desestabilidade também da membrana celular bacteriana porém não tão acentuada quanto do caso anterior.

#### ***4.3. Teste da interação da quitosana com corantes na fotoinativação de microrganismos***

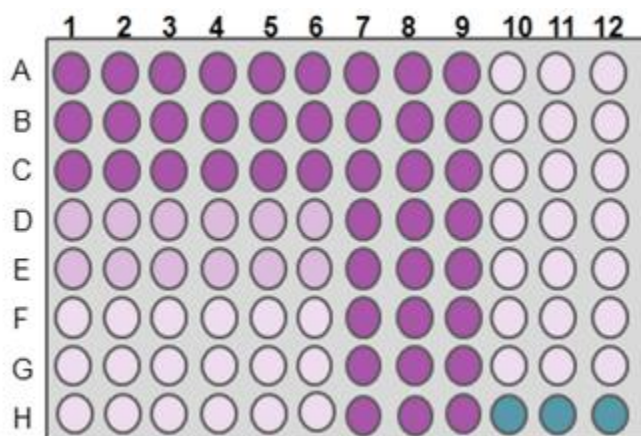
Baseado no teste anterior de atividade antimicrobiana e na ausente inibição do crescimento microbiano pela quitosana suspensa em água (pH neutro), este teste foi realizado para avaliar a interação ou se ocorre sinergia de ação entre quitosana e corantes fotossensíveis empregados em micro-organismos. A Tabela 5, abaixo, mostra de forma geral como foi realizado os experimentos com a quitosana e os fotossensibilizadores. Diferentemente dos ensaios anteriores em que a diluição seriada (fator de diluição igual a  $\frac{1}{2}$ ) era feita na horizontal, neste a diluição foi realizada na vertical. A suspensão bacteriana foi adicionada em todos os poços.

**Tabela 5.** Diagrama simplificado do experimento que avalia a interação de fotossensibilizadores e quitosana na fotoinativação de micro-organismos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APENAS FOTOSENS ITIZADOR DILUÍDO VERTICAL			FOTOSENSI TIZADOR DILUIDO VERTICAL E QUITOSANA FIXA			QUITOSANA DILUÍDA VERTICAL E FOTOSENSIT IZADOR FIXO			QUITOSANA DILUÍDA VERTICAL E FOTOSENSITIZADOR FIXO EM [ ] MENOR.		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H										CONTROLE		

#### 4.3.1. *Ftalocianina de Zinco (ZnPC)*

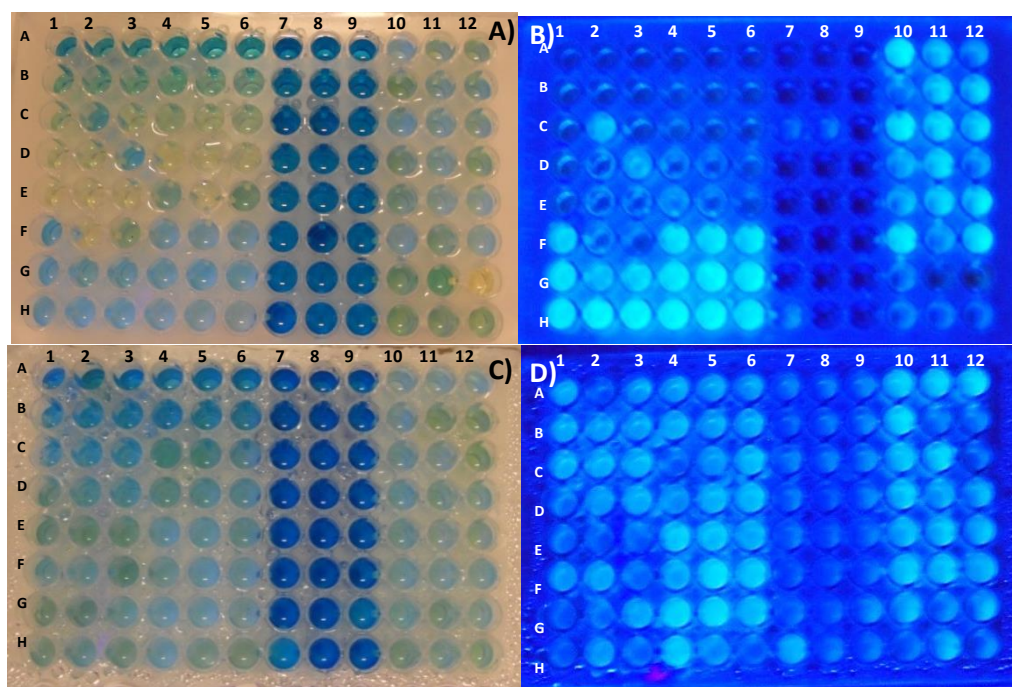
Neste teste o corante, Ftalocianina de Zinco – ZnPc (apolar), foi solubilizado em dimetilformamida. A ilustração deste ensaio pode ser visualizada na Figura 21, em que os poços na cor roxa indicam a presença do fotossensibilizador e em azul o controle contendo apenas bactérias. Nos poços 1 a 3 houve uma diluição vertical (sentido de A a H) contendo apenas o corante, em 4 a 6 houve uma diluição vertical de ZnPc e uma quantidade fixa adicionada de quitosana em suspensão aquosa, em 7 a 9 houve uma diluição vertical de suspensão aquosa de quitosana e adicionada uma quantidade fixa de fotossensibilizador e de 10 a 12 foi o mesmo procedimento da triplicata anterior, porém a ZnPc estava em uma concentração 10 vezes menor. E na linha H nos últimos 3 poços, o controle contendo apenas bactérias. Em todos os poços foi adicionado o caldo nutritivo RHBC e suspensão de bactérias em quantidade fixa. Os testes com fotossensibilizadores sempre são realizados em duas placas, uma é irradiada e outra é mantida no escuro. A Figura 21, abaixo, esquematiza o procedimento acima detalhado:



**Figura 21.** Placa de 96 poços ilustrando com cores o procedimento acima.

Na Figura 22, são apresentadas fotografias com os resultados obtidos no experimento. Tendo como resultado positivo de crescimento bacteriano os poços fluorescentes e a diferença de crescimento microbiano em placa submetida à irradiação de luz branca e a placa que permaneceu em ambiente escuro.



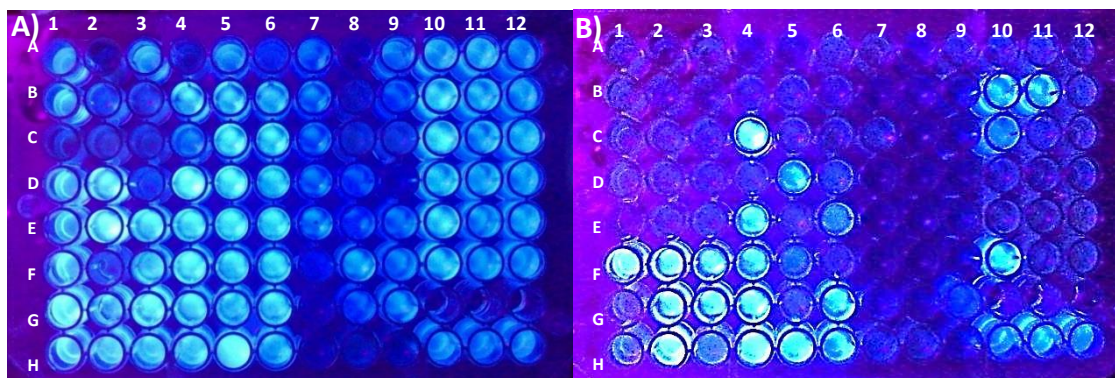


**Figura 22.** Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando ZnPc e quitosana suspensa em água, (A) e (B) irradiada (C) e (D) não irradiada, em luz branca e negra.

Baseado nos resultados das fotos das placas, acima, pode-se perceber que a placa não irradiada teve crescimento microbiano quase que total na placa, enquanto que a irradiada teve em sua maioria a inativação fotodinâmica dos micro-organismos. Neste teste não houve influência considerável da quitosana na inibição do crescimento das bactérias e sim a ação do fotossensibilizador. Os poços com concentração maior do corante inibiram o crescimento microbiano tanto na placa irradiada quanto na placa não irradiada, sugerindo que ZnPc seja um pouco citotóxico.

#### 4.3.2. Azul de Metileno (AM)

O procedimento experimental é o mesmo realizado para a ZnPc. Porém, neste caso o corante é o Azul de Metileno (AM). A diferença entre os corantes é que ZnPc era apolar e AM é polar, especificamente catiônico. Na Figura 23 são apresentadas as fotografias mostrando o resultado das placas não irradiada e irradiada, respectivamente para o corante AM.



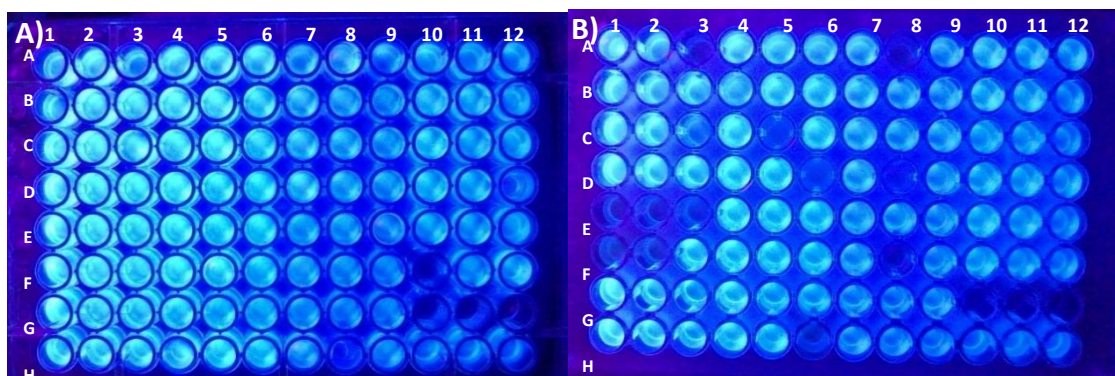
**Figura 23.** Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando AM e quitosana suspensa em água, (A) não irradiada (B) irradiada.

Ao analisar o resultado obtido através da fotografia (Figura 23(A) e (B)) das placas percebe-se que houve uma boa interação entre quitosana e azul de metileno na fotoinativação de micro-organismos, devida a melhoria do perfil de inibição do crescimento microbiano da placa não irradiada para a irradiada. Este resultado era esperado já que o AM é um dos fotossensibilizadores mais estudados. Por ser um corante catiônico há uma interação de cargas com a membrana celular bacteriana que é negativa, portanto, o AM é bastante eficaz na inativação fotodinâmica de bactérias gram-negativas.

#### 4.3.3. Rosa de Bengala (RB)

Este ensaio seguiu o mesmo procedimento já abordado nesta seção. A diferença se deu no corante fotossensível usado, rosa de bengala (RB), aniônico. Na Figura 24, são apresentadas as placas contendo o resultado do teste de viabilidade celular de micro-organismos frente a quitosana e RB.





**Figura 24.** Placas de 96 poços apresentando os resultados de fotoinativação de micro-organismos usando RB e quitosana suspensa em água, (A) não irradiada (B) irradiada.

A partir desses resultados, fica evidente que não houve um efeito sinérgico entre os materiais de modo a melhorar a inativação fotodinâmica das bactérias. Porém, não pode ser afirmado que não houve uma boa interação entre o corante e a quitosana. O que pode ter ocorrido foi a preferência de ligação ou agregação quitosana com o corante o que inviabilizou tanto a ação de um quanto de outro. Outra hipótese é a que a má interação entre quitosana e RB deve-se à não protonação dos grupamentos amino e não exista interação entre as cargas positivas do corante e a densidade de carga negativa proveniente dos oxigênios presentes na molécula.

#### ***4.4. Interação de quitosana com nanopartículas de ouro***

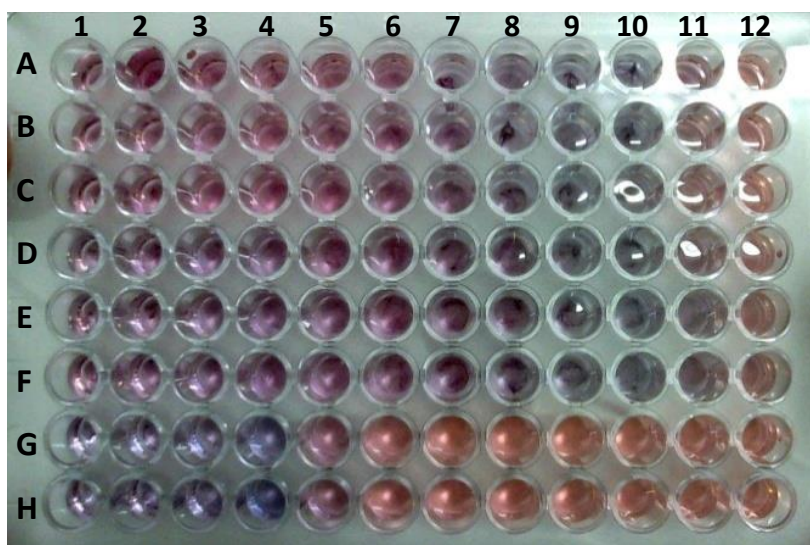
##### ***4.4.1. Teste de Agregação das nanopartículas de ouro(AuNP)***

O experimento teve como objetivo avaliar se havia interação e agregação de ouro coloidal pela quitosana em diferentes valores de pH. O procedimento do experimento é simples e rápido, praticamente instantâneo e é exemplificado na Tabela 6, a seguir.

**Tabela 6.** Procedimento esquematizado simplificado em 2 triplicatas e 1 duplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Diluição horizontal de QTS solubilizada em pH 5,5 com água destilada + quantidade fixa de ouro coloidal											
B												
C												
D	Diluição horizontal de QTS solubilizada em pH 6,5 com água destilada + quantidade fixa de ouro coloidal											
E												
F												
G	Diluição horizontal de QTS suspensa em água com água destilada + quantidade fixa de ouro coloidal											
H												

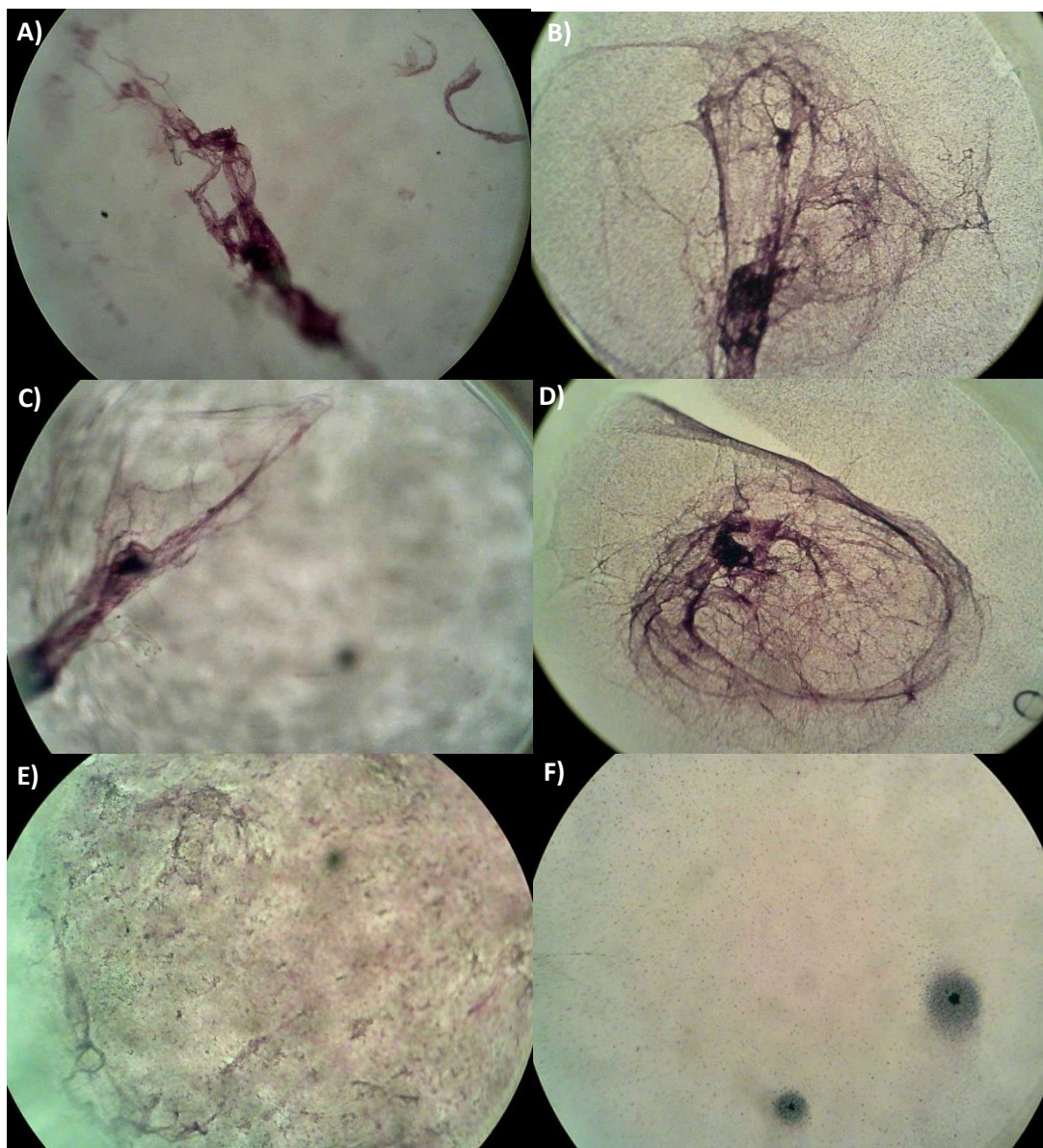
Após colocar a suspensão de nanopartículas de ouro em todos os poços aguardamos 40 minutos para observar os resultados do experimento. O resultado de agregação pode ser visualizado logo após a adição das AuNP é possível perceber a formação do agregado. Abaixo seguem algumas fotos ilustrativas do resultado.



**Figura 25.** Foto ilustrando o resultado após 40 minutos da interação e agregação de quitosana com nanopartículas de ouro.

A partir dos resultados apresentados na Figura 25, podemos perceber que a quitosana solubilizada em HAc e com o pH ajustado para valores mais próximos da neutralidade forma agregados visíveis com as nanopartículas de ouro e que quanto mais diluída a quitosana a coloração da suspensão resultante passa de tons róseos para roxos até chegar à coloração original da suspensão de ouro coloidal. Percebemos também que

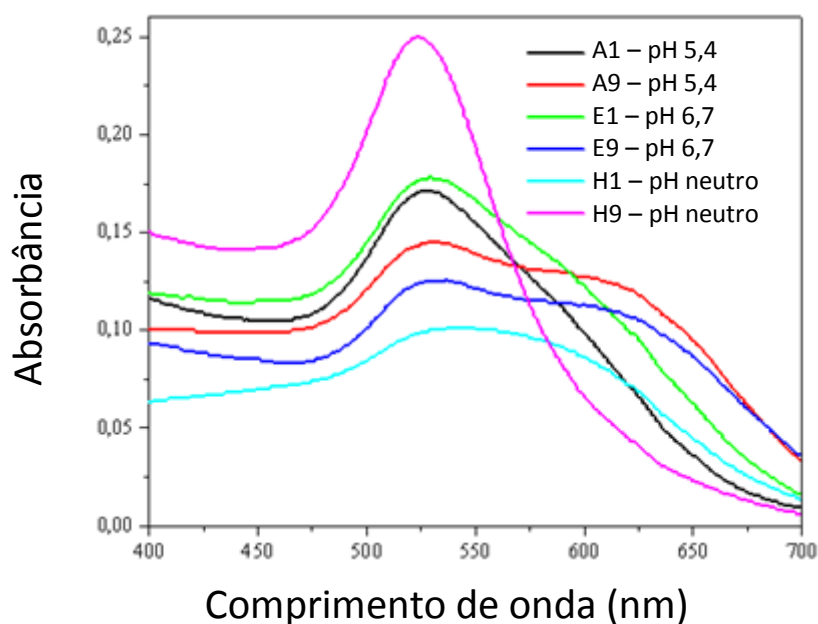
a quitosana suspensa em água não formou agregados enovelados como nos demais testes, mas ocorreu uma espécie de sedimentação do ouro. Fotografias obtidas por lupa com aproximação simples, dos poços que apresentaram agregação mais nítida.



**Figura 26.** Fotos com aproximação de 50 x dos poços representantes da quitosana solubilizada em pH 5,5 (A) e (B) dos poços A1 e A9, respectivamente; quitosana solubilizada em pH 6,5 (C) e (D) dos poços E1 e E9, respectivamente e quitosana suspensa em água (E) e (F) dos poços H1 e H9, respectivamente.



Através da observação desses resultados, percebe-se que a concentração de quitosana e seu pH influenciam diretamente no grau de agregação com as nanopartículas de ouro, apresentando perfis bastante agregados e enovelados quando a quitosana está concentrada e perfis de agregação mais espalhados quando a quitosana está diluída. Esse perfil também pode ser visualizado e comprovado através do espectro realizado (Fig. 27).

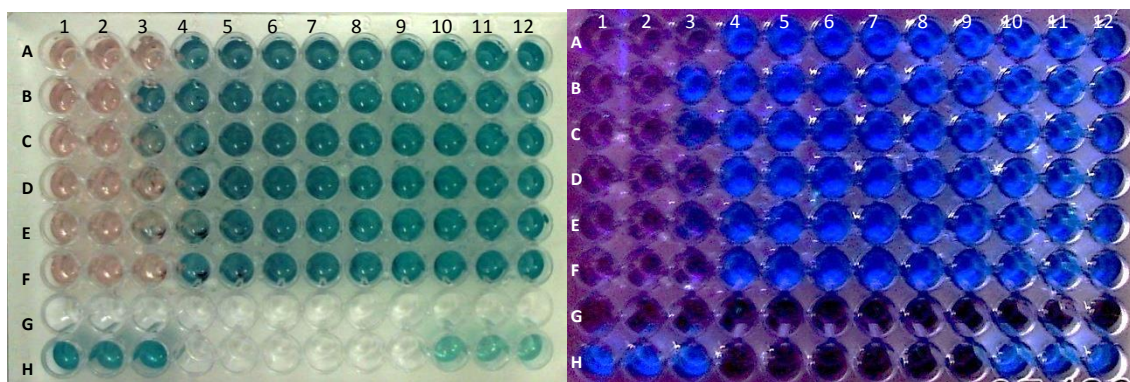


**Figura 27.** Espectros de absorção na faixa visível de diferentes suspensões de ouro coloidal.

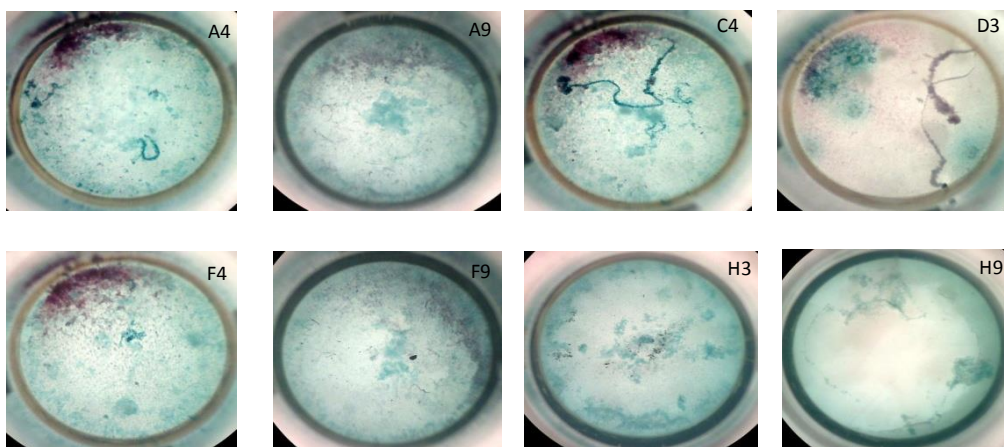
A agregação das nanopartículas muda a cor da suspensão de AuNP da cor rosa para o roxo um novo pico de agregado que pode ser observado entre 575 nm e 650 nm, o que reduz a intensidade da absorção em 525 nm. A agregação é mais fácil de ser identificada quando se observa a faixa de experimento H, em que a quitosana está em pH neutro e a diferença de agregação entre os poços 1 e 9 é significativa, sendo que tanto a absorção como a forma da banda são alterados visivelmente.

#### 4.4.2. Testes de viabilidade celular quitosana e nanopartículas de ouro

O objetivo deste ensaio foi avaliar a inativação de *E. coli* por quitosana agregada a nanopartículas de ouro. O procedimento foi realizado de acordo com o ensaio anterior, segundo a Tabela 4, porém não foi usada a quitosana suspensa em água, já que não houve agregação com as nanopartículas de ouro e a última linha da placa foi usada para controles. Ao procedimento foi adicionado uma quantidade fixa de suspensão de bactérias e caldo nutritivo Rapid HiColiform Broth (RHCB). O resultado foi observado após 24 horas em estufa a 37 °C. As Figuras 28 e 29 apresentaram os resultados na luz branca e negra das placas de 96 poços e de alguns poços que apresentaram um perfil interessante e diferenciado.



**Figura 28.** Fotografia ilustrativa do resultado do crescimento de *E. coli* após 24 horas em estufa visualizado em luz branca e luz negra, respectivamente.



**Figura 29.** Imagens de quitosana com nanopartículas de ouro vistas em microscópio com aumento de 50 x em diferentes valores de pH, 5,5, 6,5, respectivamente. As referências em cada imagem são dos poços correspondentes.

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram que formaram agregados, porém houve uma diminuição no enovelamento e uma segregação das porções de ouro coloidal e as bactérias indicando uma provável competição ou preferência de interação com a quitosana. Em valores de pH mais próximos da neutralidade (pH 6,5), observou-se uma maior segregação e crescimento microbiano pontual de forma concentrada e não homogênea no poço. Outro indício da provável competição entre bactérias e nanopartículas de ouro em interagir/agregar com a quitosana é a diminuição de agregados nítidos com a quitosana. No procedimento, após a diluição da quitosana, é adicionado o ouro coloidal que agrega quase que imediatamente, em seguida é adicionada a suspensão bacteriana e neste momento, o agregado é desfeito, sendo restabelecido em parte depois.

## 5. CONCLUSÕES

Em virtude do estudo de comparação das propriedades da quitosana de marcas diferentes através de caracterizações pôde-se entender melhor alguns eventos diferenciados entre as duas marcas, mostrando que a quitosana da marca Sigma-Aldrich tem um potencial maior para experimentos específicos devido a seu GD maior e diferença de peso molecular. Já a quitosana Polymar não teve sua eficiência comprometida por algumas propriedades inferiores à da outra marca, sendo útil para áreas em que certas propriedades não são necessárias, como por exemplo, tratamento e descontaminação de águas.

O teste antimicrobiano em relação à variação de valores de pH se mostrou bastante promissor tendo em vista que boa parte dos experimentos que seguiram vieram baseados nos parâmetros estipulados pelos mesmo. Neste experimento ficou clara a faixa de pH propícia a testes de inibição do crescimento microbiano pela quitosana, sem que houvesse ação do meio ácido de solubilização da quitosana, que é de pH 5,0 a 6,5, estando de acordo com a faixa indicada na literatura.

Na avaliação com os fotossensibilizadores ficou evidente que a quitosana não tem boa ação antimicrobiana com alguns dos fotossensibilizadores estudados. Este resultado mostra a necessidade de estudos mais detalhados e aprofundados.

A partir do ensaio investigativo das propriedades aglutinantes/agregantes da quitosana com nanopartículas de ouro pôde-se concluir que é rápido, simples e eficaz. Estes experimentos também mostraram uma provável competição entre ouro coloidal e bactérias em interagir com a quitosana, porém também foi constatada uma forte interação entre os materiais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N., REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *PhotochemPhotobiol*, 74, 5, 656-669, 2001.
- ANDRADE, N. A. Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundos da indústria pesqueira Paraibana. 2007. 89 p. Diss. Mestrado, João Pessoa. 2007.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A. et. al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de materiais e processos*, 2.3, 27-34, 2007.
- BATZRI, D. W., KORN, E. D. Interaction of phospholipid vesicles with cells. Endocytosis and fusion as alternate mechanisms for the uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. *J. Cell Biol*, 66, 621-634, 1975.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N. *et al.* Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop. Protection*, 25, 108-118, 2006.
- BERTOLONI, G., ROSSI, F., VALDUGA, G., JORI, G. e VANLIER, J. Photosensitizing activity of water and lipid soluble phthalocyanines on *E coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 71, 149-156, 1990.
- BERTOLONI, G., ROSSI, F., VALDUGA, G., JORI, G., ALI, H. e Van Lier, J. Photosensitizing activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Microbios*, 71, 33-46, 1992.
- BERTOLONI, G., SALVATO, B., DALT'ACQUA, M., VAZZOLER, M. E JORI, G. Hematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Streptococcus faecalis*. *J. Photochem. Photobiol*, 39, 811-816, 1984.
- BERTOLONI, G., VIEL, A., GROSSATO, A. E JORI, G. The photosensitizing activity of hematoporphyrin on mollicutes. *J. Gen. Microbiol*, 131, 2217-2223, 1985.
- BEZERRA, A. M. Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados de quitosana de alta e baixa massa molecular. 2011. 72 p. Diss. Mestrado, São Paulo. 2011.



- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nº7 p. 45-53, de 10 de janeiro de 2001. Seção 1.
- BUCHANAN, R.L.; KLAUITTER, L.A. The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* 0157:H7. *Food Microb*, 9, 185-196, 1992.
- COSTA SILVA, H. S. R.; dos SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quím. Nova*, 29, 4, 776-785, 2006.
- CUNHA, R. A. Caracterização molecular do mecanismo de interação de quitosanas com bicamadas lipídicas compostas de dipalmitoilfosfatidilcolina. 2013. 88 p. Diss. Mestrado, Uberlândia. 2013.
- CUNHA, R. A.; SOARES, T. A.; RUSU, V. H.; PONTES, F. J. S.; FRANCA, E. F.; LINS, R. D. The Molecular Structure and Conformational Dynamics of Chitosan Polymers: An Integrated Perspective from Experiments and Computational Simulations. In: KARUNARATNE, D. N. (Ed.). *The Complex World of Polysaccharides*: InTech, 2012. cap. 9, ISBN 978-953-51-0819-1.
- DAMIAN, C., BEIRÃO, L. H., FRANCISCO, A., ESPÍRITO SANTO, M. L. P., TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alim. Nutr. Araraquara*, 16, 2, 195-205, 2005. ISSN 0103-4235.
- DUTTA, P. K.; DUTTA, J., TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31, 2004.
- FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 11, 979-993, 1998.
- FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. *Quím. Nova*, 32, 3, 623-538, 2009.
- FRANCA, E. F., LINS, R. D., FREITAS, L. C. G. Chitosan Molecular Structure as a Function of N-Acetylation. *Biopolymers*, 95, 448-460, 2011.

- FRANCA, E. F.; LINS, R. D.; FREITAS, L. C. G.; STRAATSMA, T. P. Characterization of Chitin and Chitosan Molecular Structure in Aqueous Solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4, 2141-2149, 2008.
- GAL, D. Hunt for Singlet Oxygen under in Vivo Conditions. *Biochem.Biophys. Res. Commun*, 202, 10-16, 1994.
- GRIFFITHS, M. A., WREN, B.W. E WILSON, M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 873-876, 1997.
- HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235 – 244, 2001.
- HERNANDEZ-LAUZARDO, A. N.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; GUERRA-SANCHEZ, M. G. Current Status of Action Mode and Effect of Chitosan against Phytopathogens Fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 4243-4247, 2011.
- HOBBS, B.C; ROBERTS, D. 6ªed. Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos. São Paulo. Varela, 1999. 376 p.
- JAWORSKA, M., SAKURAI, K., GAUDON, P. e GUIBAL,E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polym Int*, 52, 198–205, 2003.
- JE, J. Y.; KIM, S. K. Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6629-6633, 2006.
- KIMURA, I. Y.; GONÇALVES JR, A. C.; STOLBERG, J. *et al.* Efeito do pH e do tempo de contato na adsorção de corantes reativos por microesferas de quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 51-57, Julho/Setembro. 1999.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126 – 139, 2004.
- KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; JANCZYK, A. Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on

- Chitosan Interactions with Membrane Lipids in Langmuir Films. *Biomacromolecules.*, 12, 4144-4152, 2011.
- KUMAR, M. B. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & functional Polymers*, 46, 1-27, 2000.
  - LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, Enteroinvasive, enterohemorrhagic e enteroadherent. *J. infec.Dis*, 155, 377-389, 1987.
  - LI, X.; FENG, X.; YANG, S. *et. al.* Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 79, 493-499, 2010.
  - LIU, W. G.; YAO, K. D. Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release*, 83, 1-11, 2002.
  - MA, G.; QIAN, B.; YANG, J.; HU, C.; NIE, J. Synthesis and properties of photosensitive chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 558-561, 2010.
  - MAISCH, T., BOSL, C., SZEIMIES, R.M., LEHN, N. E ABELS, C. Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4, 1542-1552, 2005.
  - MANG, T. S. Lasers and Light Sources for PDT: Past, Present and Future. *Photodiag. Photodyn. Therapy*, 1, 43-48, 2004.
  - MIRETZKY, P., CIRELLI, A. F. Hg (II) Removal from Water by Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 10-23, 2009.
  - NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª Ed. *Sarvier Ed.* 2002. ISBN 85-7378-125-4.
  - OLIVEIRA, C. A.; MACHADO, A. E. H.; PESSINE, F. B. T. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for the use in photodynamic therapy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 113, 69-78, 2005.
  - PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I. C.; JANSSEN, H. B.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; READ, N. D. *et al.* Chitosan permeabilizes the plasma

membrane and kills cells of *Neurosporacrassa* in an energy dependent manner. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 585-594, 2009.

- PAULA, L. F., SANTOS, R. O., MENEZES, H. D., OLIVEIRA, C. A. *et al.* A Comparative Study of Irradiation Systems for Photoinactivation of Microorganisms. *J. Braz. Chem. Soc*, 21, 4, 694-700, 2010.
- PELCZAR, J. R. M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceito e aplicações. *São Paulo-SP: McGraw-Hill*, 2, 30, 371-397, 1997.
- PENG, S. F., TSENG, M. T., HO, Y. C. *et al.* Mechanism of cellular uptake and intracellular trafficking with chitosan/DNA/poly(y-glutamic acid) complexes as a gene deliver vector. *Biomaterials*, 32, 239-248, 2011.
- RAAB, O. Über die Wirkung fluoro szierender Stoffe auf Infusorien. *Z Biol*, 39, 524-546, 1900.
- RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci*, 31, 603–632, 2006.
- SANTOS, J. E. dos; SOARES, J. P.; Dockal, E. R.; Campana Filho, S. P.; Cavaleiro, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros*, 13, 242-249, 2003.
- SHI, W.; NIE, D.; JIN, G.; CHEN, W.; XIA, L.; WU, X.; SU, X.; XU, X.; NI, L.; ZHANG, X.; CHEN, J. Bdnf Blended Chitosan Scaffolds for Human Umbilical Cord Msc Transplants in Traumatic Brain Injury Therapy. *Biomaterials*, 33, 3119-3126, 2012.
- SIGNINI, R; CAMPANA FILHO, S.P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros: Ciênc. Tecnol*, 4, 63-68, 1998.
- SOUKOS, N. S., XIMENES-FYVIE, L. A., HAMBLIN, M. R. Targed antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob. Chemother*, 42, 2595-2601, 1998.
- TARR, P.I. *Escherichia coli* 0157:H7: clinical, diagnóstico, end epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infec. Dis*, 20, 1-10, 1995.
- TCHEMTCHOUA, V. T.; ATASANOVA, G.; AQIL, A.; FILEE, P.; GARBACKI, N.; VANHOOTEGHEM, O.; DEROANNE, C.; NOEL, A.; JEROME, C.; NUSGENS, B.; POUMAY, Y.; COLIGE, A. Development of a

- Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules*, 12, 3194-3204, 2011.
- VARMAN, A.H.; EVANS, M.G. Foodborne pathogens. An illustrated text. *Marison publishing*. 1996, 501 p.
  - VON TAPPEINER, Jodlbauer A: H. Uber Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Disch. Arch Klin Med*, 80, 427-487, 1904.
  - WAINWRIGHT, M., PHOENIX, D. A., GASKELL, M., MARSHALL, B. Photobactericidal activity of methylene blue derivatives against vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *Jour Antimicrob. Chemther*, 44, 823-825, 1999.
  - WAN-NGAH, W. S.; TEONG, L. C.; HANAFIAH, M. A. K. M. Adsorption of Dyes and Heavy Metal Ions by Chitosan Composites: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1446-1456, 2011.
  - ZHANG, H.; LI, R.; LIU, W. Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of Fruits: A review. *Int. J. Mol. Sci*, 12, 917-934, 2012.
  - ZHENG HUANG, M. D. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat*, 4, 283–293, 2005.