

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

SABRINA STEFANNE BARBOZA

Bioatividade do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Cymbopogon martini*:
Antimicrobiano e citotoxicidade

Recife
2016

SABRINA STEFANNE BARBOZA

Bioatividade do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Cymbopogon martini*:
Antimicrobiano e citotoxicidade

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orietador (a): Prof^a Dr^a Thayza C. Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Horacinna M^a M.

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barboza, Sabrina Stefanne

Bioatividade do gel de quitosana associado com óleo essencial de Cymbopogon *martini*: antimicrobiano e citotoxicidade/ Sabrina Stefanne Barboza– Recife: O Autor, 2016.

58 folhas : il., fig., graf., tab.

Orientadora: Thayza C. Montenegro Stamford

Coorientadora: Horacina M. Medeiros Cavalcante

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia Industrial, 2016.

Inclui referências

- 1. Antibióticos 2. Testes de toxicidade 3. Biopolímeros I. Stamford, *Thayza C. Montenegro* (orientador) II. Cavalcante, *Horacina M. de Medeiros* (coorientadora) III. Título**

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-130

SABRINA STEFANNE BARBOZA

**Bioatividade do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Cymbopogon martini*:
Antimicrobiano e citotoxicidade**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orietador (a): Prof^a Dr^a Thayza C. Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Horacinna M^a M.

Aprovada em: 25 de Fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Professora Doutora Márcia Vanusa da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Professora Doutora Lúcia Raquel Ramos Berger
Universidade Federal da Paraíba

Professora Doutora Thayza C. Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Agradecimentos

A Deus que sempre esteve comigo.

A Professora Dr^a Thayza C. M. Stamford, por toda atenção, ensinamento, apesar de todas as dificuldades encontradas.

A Professora Dr^a Horacina M^a Medeiros Cavalcante, pelo aprendizado e paciência.

A Professora Dr^a Tânia Lúcia M. Stamford, por ceder o seu laboratório para realização da pesquisa, além de ótimos conselhos.

A professora Dr^a Thatiana M. Stamford Arnaud, pelo conhecimento transmitido e pela ajuda na execução do projeto.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos- UFPE, pelo companheirismo e ajuda, aos técnicos Vival e Camilo por todo apoio.

A toda turma de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, em especial a Katharina Diniz, Anderson Deodato, Iranildo José, Natalie Farias e Andrezza Lins por toda amizade.

Aos meus pais Mário e Mariê, por cada ensinamento e dedicação na minha educação, a vocês minha eterna gratidão.

A Caio César, meu namorado por estar ao meu lado auxiliando na realização de mais um sonho.

A CAPES pelo apoio financeiro oferecido a esta e outras pesquisas do grupo de pesquisa.

A todos que colaboraram de uma forma direta ou indireta para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

Tendo em vista o aumento da resistência bacteriana se busca alternativas terapêuticas, entre as quais se destaca o uso de produtos naturais. A quitosana é um biopolímero natural que apresenta biocompatibilidade e ação antimicrobiana, conhecida. Por outro lado, estudos estão sendo realizados utilizando óleos essenciais que são usados na medicina popular com uma aplicação bastante difundida. Os óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas como ação antimicrobiana, anti-inflamatória, regenerativa, hidratante, anti-helmíntica entre várias outras ações. *Cymbopogon martinii* (CMEO), é uma planta herbácea da família das gramíneas que dele é extraído o óleo popularmente conhecido como Palmarosa que apresenta ação antimicrobiana frente a diversos microrganismos. Neste contexto, a presente pesquisa objetivou avaliar o potencial antimicrobiano, citotóxico do gel de quitosana enriquecido com óleo essencial de *Cymbopogon martinii*. As quitosanas de alto e de baixo peso molar (QAB) adquiridas da Sigma® foram misturadas 1:1 e diluídas em ácido acético 1% para obtenção de um composto de quitosana (QAB) a 10mg/mL. O composto de quitosana obtido foi caracterizado quanto suas características estruturais, grau de desacetilação e peso molar, respectivamente, pelas técnicas de espectrofotometria de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e viscosidade. A quitosana apresentou grupos funcionais característicos do polímero, grau de desacetilação de 80,66% e peso molar de $6,03 \times 10^4$ g/mol. CMEO foi adquirido da Ferquima®, que disponibilizou sua composição química, o qual teve como composto predominante Geraniol (81,8%). A atividade antimicrobiana da QAB, do CMEO e da associação QAB+CMEO foi determinada através da técnica de microdiluição, obtendo-se as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM), frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os valores de CIM e de CBM frente à *S. aureus* foram iguais para QAB (4mg/mL) e para *E. coli* foram respectivamente de 2mg/mL e de 4mg/mL. Na determinação do CIM, utilizando o OEEM frente a *S. aureus* e *E. coli*, foram encontradas as concentrações de 13,5 mg/mL e 22,5 mg/mL respectivamente. Contudo, a CBM não foi encontrada para o OEEM, tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, demonstrando que OEEM apresentou apenas efeito bacteriostático frente as cepas testes. Os valores de CIM e de CBM frente à cepa de *S. aureus* para a associação QAB + OEEM 3mg/mL + 13,3mg/mL e de 5mg/mL + 22,5 mg/mL, respectivamente. Para *E. coli* exposta a QAB+OEEM as concentrações CIM e CBM foram de 1,5mg/mL + 6,75mg/mL e de 4mg/mL + 18,5mg/mL, respectivamente. A análise para presença de sinergismo entre OEEM e QAB foi realizada por planejamento fatorial 2^2 usando concentrações sub-CIM de ambas as drogas. Verificou-se que a associação foi classificada como indiferente. O potencial irritante das substâncias testes foi determinado através do teste da Membrana Corioalantoide do ovo de galinha (HET-CAM) fecundado e incubado por um período de 9-10 dias. Para determinar o grau de irritabilidade pelo HET-CAM, foram observadas a presença de lise, coagulação e hemorragia, até 5 minutos após a exposição às substâncias testes. Todas as substâncias testes foram não irritantes. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a quitosana não teve efeito de sinergismo esperado em associação com óleo, contudo a associação QAB + OEEM conferiu um efeito bactericida ao óleo essencial, antes não observada.

Palavras-chave: Biopolímero. Produtos bioativos. Citotoxicidade. Sinergismo.

ABSTRACT

In view of the increase in bacterial resistance, alternative therapies have been studied, among which stands out the use of natural products. Chitosan is a natural biopolymer that has biocompatibility and known antimicrobial action. Furthermore, studies are being carried out using essential oils that are used in folk medicine with a widespread application. Essential oils have various biological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory-regenerative, moisturizing, anthelmintic among many other actions. *Cymbopogon martinii* (CM) is a family of herbaceous grasses that it is extracted from the oil popularly known as Palmarosa which has antimicrobial activity against various microorganisms. In this context, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity and cytotoxicity of chitosan gel enriched with essential oil of *Cymbopogon martini*. The chitosan high and low molecular weight (CHL), purchased from Sigma®, were mixed 1: 1 and diluted in 1% acetic acid to obtain a solution of 10mg / ml of polymer. The chitosan obtained was characterized about the structural characteristics, deacetylation degree and molecular weight, respectively, by techniques of IR spectrophotometry, nuclear magnetic resonance of hydrogen and viscosity. Chitosan has the characteristic functional groups of the polymer, degree of deacetylation of 80.66% and molecular weight of 6.03×10^4 g / mol. Essential oil of *Cymbopogon martinii* was purchased from Ferquima®, which released its chemical composition, which has as the predominant compound Geraniol (81.8%). The antimicrobial activity of the CHL, the EOCM and CHL + EOCM association was determined by the microdilution technique, obtaining the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericia (MBC) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The values of MIC and MBC against *S. aureus* were the same for CHL (4mg/mL) and *E. coli* were respectively 2mg/mL and 4mg/mL. In the determination of MIC using EOCM against *S. aureus* and *E. coli* were found concentrations of 13.5 mg/mL and 22.5 mg/ml respectively. However, MBC was not found to EOCM for both *S. aureus* and *E. coli*, demonstrating that EOCM showed only bacteriostatic effect. The MIC and MBC values to *S. aureus* for CHL association EOCM were 3mg/mL + 13,3mg/mL and 5 mg/MI + 22.5 mg/mL, respectively. For *E. coli* exposed to CHL + EOCM the MIC and MBC concentrations were 1.5 mg/mL + 6,75mg/mL and 4mg/mL + 18,5mg/mL, respectively. The analysis to measure the synergy between EOCM and CHL was performed by factorial analysis using the sub-MIC concentrations for either drug and the association of drugs was classified as indifferent. It was also examined the cytotoxicity of the drugs by Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) fertilized and incubated for a period of 9-10 days. To determine the degree of irritability by the HET-CAM were observed the presence of lysis, coagulation and bleeding, up to 5 minutes after exposure to the test substances. All test substances were non-irritant. According to the results it can be concluded that the chitosan was not expected synergistic effect in combination with oil, yet the association CHL + EOCM gave a bactericidal effect to the essential oil, not previously observed.

Keywords: Biopolymer. Bioactive products. Citotoxicity. Synergism.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Estrutura química dos monômeros N-acetilglicosamina, D- glucosamina e da quitosana (Wiegand e Hipler, 2010).....	17
Figura 2 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopobon martinii</i> , A) Acetato de Geranil e B) Geraniol. Fonte: adaptada de (Smitha, Rana, 2015).....	24
Figura 3 - Espectro de absorção da região do infravermelho da quitosana QAB.....	34
Figura 4 - Esquema com a numeração dos prótons que aparecem no RMN ¹ H. Fonte: (Anjos, 2005).....	35
Figura 5 – Espectro RMN ¹ H da quitosana QAB.....	36
Figura 6 – Difratomogramas da (DR-X) das quitosanas, A) alto peso , B) baixo peso e C) Alto e baixo peso QAB.....	38
Gráfico 1 - Gráfico de pareto para as cepas de <i>E. coli</i>	43
Gráfico 2 - Gráfico de pareto para as cepas de <i>S. aureus</i>	43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1- Composição e densidade do OECM. Fonte: (Murbach et al., 2015).....	24
Tabela 2- Concentração do OECM e gel de quitosana QAB utilizada no planejamento fatorial.....	32
Tabela 3- Classificação do nível de irritação segundo teste HET-CAM.....	33
Tabela 4- Integração dos picos do espectro de RMN ¹ H do composto de quitosana (QAB), derivado da mistura entre quitosana de crustáceode alto e baixo peso molecular para o cálculo do graude desacetilação.....	36
Tabela 5- Valor do grau de desacetilação (GD%) da quitosana QAB por RMN ¹ H.....	37
Tabela 6- Valores da concentração da quitosana QAB estudada, tempo de escoamento medido pelo viscosímetro e média dos tempos para cada concentração de quitosana estudada.....	39
Tabela 7- Atividade antimicrobiana, com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração mínima bactericida (CBM) para o composto de quitosana de alto e baixo peso molar (QAB), do óleo essencial de <i>Cymbopogon martini</i> (OECM) e da associação entre QAB e OECM para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	42
Tabela 8- Determinação do potencial de irritação pela presença dos parâmetros lise, hemorragia e coagulação da quitosana de alto e médio peso molar (QAB), óleo essencial de <i>Cymbopogon martini</i> 1% (EOCM) e associação entre as substâncias QAB + EOCM 1% pelo teste da membrana corioalontóide do ovo. Controle positivo: lauril sulfato de sodio 1% (LSS1%).....	45

ABREVIATURAS

BHI	Brain heart infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
D₂O	Água Deuterada
DR-X	Difração de Raios-X
FDA-US	Food and Drug Administration, United States
FIC	<i>Fraction inhibitory concentration</i>
GD %	Grau de desacetilação
HCL	Ácido clorídrico
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane</i>
IV	Infravermelho
OEs	Óleos essenciais
OECM	Óleo essencial de <i>Cymbopogon martini</i>
QA	Quitosana de alto peso molecular
QAB	Quitosana de baixo + alto peso molecular
QB	Quitosana de baixo peso molar
RMN¹H	Ressonância Magnética nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 ANTIMICROBIANO NATURAL.....	15
3.2 QUITOSANA.....	17
3.2.1 Atividade antimicrobiana da quitosana	19
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon Martini</i> (PALMAROSA).....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 QUITOSANA.....	26
4.2 PREPARAÇÃO DO GEL DO COMPOSTO DE QUITOSANA.....	26
4.3 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon Martini</i> (OECM).....	26
4.4 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE CYMBOPOGON MARTINI (OECM)	27
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA (QAB)	27
4.5.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho (IV)	27
4.5.2 Grau de Desacetilação (GD%): Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
4.5.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X	28
4.5.4 Determinação do peso molar por Análise Viscosimétrica.....	29
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	30
4.6.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	30
4.6.2 Concentração bactericida mínima (CBM).....	31
4.6.3 Análise da Fração de Concentração Inibitoria ou <i>Fraction inhibitory concentration</i> (FIC)	31
4.6.4 Planejamento Fatorial 2 ²	32
4.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE: POTENCIAL DE IRRITABILIDADE	32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	34
5.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	34
5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear: Grau de desacetilação GD%	35
5.1.3 Cristalinidade por Difração de Raio-X.....	37
5.1.4 Massa Molar: Medida de Viscosidade	38
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	40
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² E ANÁLISE DA FRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITORIA (FIC)	42
5.4 TESTE DE IRRITABILIDADE – <i>HEN'S EGG TEST ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE</i> (HET-CAM).....	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7 REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A quitina é um biopolímero largamente utilizado na indústria e tem como fontes principais a carapaça e exoesqueleto de crustáceos e fungos principalmente da Ordem *Murcorales*. A quitina após ser extraída pode sofrer tratamento com solução alcalina concentrada e altas temperaturas para ser convertida, pela desacetilação termoquímica, ao polímero quitosana. É o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose, apresenta também estrutura parecida, apenas com uma modificação no carbono 2 que na quitina está o grupo acetoamida (ARANAZ et al., 2009).

Atualmente as produções de quitina e quitosana são realizadas através do tratamento de resíduos do processamento de crustáceos, matéria prima abundante em países como China, Japão, Índia e Brasil. A produção anual de quitosana em 2010 foi de 13,7 mil toneladas onde se estima um aumento para 21,4 mil toneladas no ano de 2015 (DEMINA et al., 2014)

As principais vantagens da quitosana são a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, o seu caráter hidrofílico, a presença de grupos polares (-OH e -NH₂) capazes de interagir com outros polímeros e a sua atividade antimicrobiana. Além disso, a quitosana é filmogênica, hidratante, bioadesiva, renovável, não-alérgica, imunoadjuvante, anticolesterolêmica e antitrombogênica. Com todas essas propriedades a quitosana tem sido fonte de vários estudos principalmente no ramo farmacêutico que visa aliar todo o potencial biológico da quitosana com outros produtos naturais como os óleos essenciais (RINAUDO, 2008).

A busca por alternativas mais viáveis economicamente para a obtenção de produtos naturais tem sido alvo de diversos estudos, que incluem o uso de plantas medicinais e compostos produzidos por processos biotecnológicos (RINAUDO, 2008). A utilização de polímeros como quitosana tem sido estudada como carreadora de substâncias naturais, estimuladora de fatores de crescimento, atividade antimicrobiana entre outras aplicações (ZARGAR, ASGHARI, DASHTI, 2015).

O óleo essencial de palmarosa é extraído da planta *Cymbopogon martini*, uma erva perene nativa da Índia e os seus principais componentes são o geraniol e o acetato de geraniol. Esse produto natural é amplamente utilizado na indústria farmacêutica por apresentar propriedades tais como ação antimicrobiana, antifúngica, repelente e grande valor comercial devido ao seu aroma (PRASHAR et al., 2003; KHAN et al., 2015).

O gel de quitosana associado ao óleo essencial de *Cymbopogon martini* pode ser uma opção promissora de tratamento contra bactérias, pois apresentam atividade antimicrobiana (ROLSTAD, BRYANT, NIX, 2012). Com base no exposto a presente pesquisa tem por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano, citotóxica do gel de quitosana enriquecido com óleo essencial de *Cymbopogon martini*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo tem como objetivo verificar a bioatividade do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Cymbopogon martini* através de testes antimicrobianos e citotóxicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar um composto proveniente da mistura entre quitosana de alto e de baixo peso molecular;
- Produzir solução com a mistura entre o gel do composto entre as quitosanas de alto e baixo peso molecular e o óleo essencial de *Cymbopogon martini*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade (potencial de irritabilidade) das substâncias testadas isoladas e da associação entre o gel do composto de quitosana e o óleo de *Cymbopogon martini*;
- Verificar a existência de efeito sinérgico entre o gel do composto de quitosana e o óleo de *Cymbopogon martini*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ANTIMICROBIANO NATURAL

Agentes antimicrobianos são substâncias capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos patógenos ou oportunistas. Possuem vários mecanismos de ação e tipos de compostos químicos naturais ou sintéticos que desempenham esse papel tão importante no controle de infecções. Cada vez mais o mundo tem se voltado para a natureza como fonte de novos produtos, uma prática que já era bastante conhecida em anos remotos com Hipócrates (460-337 a.C.), onde o mesmo recomendava a lavagem de ferimentos com vinhos para impedir a infecção (AGRA et al., 2007).

Com o passar dos anos, as bactérias vêm adquirindo cada vez mais resistência aos antimicrobianos usados na prática médica, devido ao uso indiscriminado destes. Em 1945, quando Fleming recebeu o Prêmio Nobel, ele advertiu sobre o uso inadequado dessas substâncias antimicrobianas que resultaria em resistência dos microrganismos. Com o objetivo de buscar alternativas naturais estão sendo cada vez mais pesquisados os óleos essenciais e produtos de origem natural para serem utilizados no combate de infecções (ANTUNES et al., 2006).

Os antimicrobianos naturais possuem vários mecanismos de ação, destacando os que agem alterando a parede celular e os que promovem alterações estruturais em proteínas e ácidos nucleicos ou na sua síntese. A presença de compostos com (-OH), principalmente compostos fenólicos que são gerados do metabolismo secundários de plantas e estão presentes nos óleos essenciais, agem na parede celular dos microrganismos alterando sua conformação e que leva a fuga de componentes intracelulares causando a morte celular (XUE, DAVIDSON, ZHONG, 2013).

Possuem várias formas de serem classificados de acordo com diferentes autores, Bresolin e Cechinel-Filho (2003), classificam em dois grandes grupos os específicos e os inespecíficos. Os específicos agem só no microrganismo alvo sem causar dano ao hospedeiro, já o inespecífico mata ou inibe *in vitro* microrganismos, são substâncias mais utilizadas em medicamentos de uso tópico. Podem ser também classificados pelo modo de ação, quando a substância mata o microrganismo alvo é chamado de bactericida (bactéria) ou fungicida

(fungos), quando impedem apenas o crescimento são chamados de bacteriostático (bactéria) ou fungistático (fungos).

Vários mecanismos de ação podem ser citados e de acordo com mecanismo eles apresentam uma ação diferente contra o microrganismo, existem substâncias que inibem a síntese de peptidoglicano presente na parede celular de bactérias, causam lesão da membrana citoplasmática, interrupção do fluxo de elétrons e do transporte ativo, interferência na síntese e replicação do DNA e RNA, inibição da RNA polimerase e inibição da síntese de metabólitos essenciais. Cada substância tem uma forma de ação e cada bactéria tem uma resposta diferente a cada antimicrobiano quando em contato com a mesma (KHAN et al., 2011; PACKER, LUZ, 2007).

O uso de produtos naturais, com óleos essenciais, biopolímeros como a quitosana, extratos de plantas entre outros, necessitam de teste *in vitro* que demonstrem essa atividade antimicrobiana. Vários testes podem ser realizados, as metodologias mais comuns são difusão em ágar, macrodiluição e microdiluição, ultimamente se tem utilizado mais o teste de microdiluição onde é utilizado um inóculo padrão em placa com 96 poços onde é colocada a substância a ser estudada e avaliada sua ação antimicrobiana (KOLODZIEJ et al., 2009).

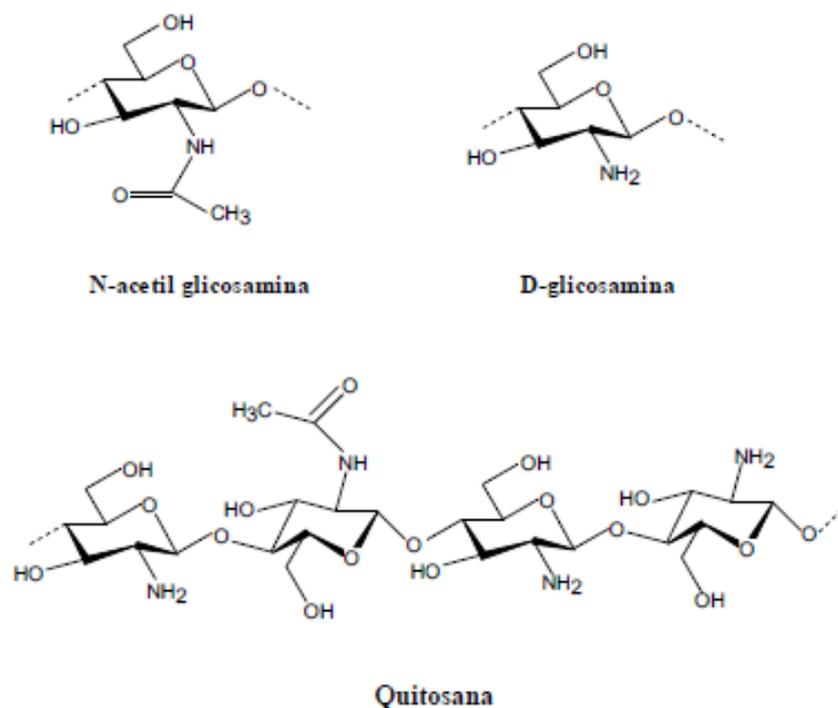
Quando já tem o conhecimento da sua ação, esses produtos naturais podem ter sua ação potencializada quando colocado em conjunto com outra substância para ação antimicrobiana. Essa junção pode acarretar em uma interação maior no qual o efeito combinado é significativamente maior que o seu efeito independente chamado de sinergismo, já o antagonismo é uma interação negativa onde os efeitos esperados são diminuídos e quando não ocorre interação significativa é chamado de indiferente (BASSOLÉ, JULIANI, 2012).

Compostos com propriedades biológicas, produzidos por diversas plantas, podem ser utilizados para síntese de novos medicamentos, ou mesmo, serem utilizados como substitutos de princípios ativos sintéticos, como os antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana. Assim vários produtos naturais podem ser utilizados em conjunto para melhorar a ação biológica como o acréscimo de óleos essenciais em polímeros naturais como a quitosana (DORMAN, DEANS, 2000; STOJKOVIC et al., 2013,).

3.2 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo obtido através da hidrólise alcalina da quitina, principal componente estrutural de artrópodes, parede celular de fungos, moluscos, crustáceos, insetos e algas, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza depois da celulose (HU et al., 2007). Descoberta em 1859 por Rouget, que ao aquecer a quitina em hidróxido de potássio obteve um produto que apresentou solubilidade em ácido (DUMETRIU, 2002). Em termos de aplicação a quitosana é o derivado mais importante da quitina. A produção de quitina e quitosana são realizadas através do tratamento de resíduos do processamento de crustáceos, matéria prima abundante em países como China, Japão, Índia e Brasil onde são utilizadas carapaças de caranguejo, cabeças de camarão, nas quais o conteúdo de quitina chega a 11% (SANFORD, 2003).

Figura 1- Estrutura química dos monômeros N- acetil glicosamina e D- glucosamina e da quitosana (Wiegand e Hipler, 2010).



Fonte: Wiegand; Hipler, (2010)

A quitosana é um heteropolímero composto por ligação β (1 \rightarrow 4) de N-acetil-Dglucosamina e D-glucosamina (Figura 1) e formada através da desacetilação parcial da quitina numa faixa de 40 a 98% e uma massa molar que varia de $5,0 \times 10^4$ e $2,0 \times 10^5$ g mol⁻¹ (MIYAGUTI,2008). Dependendo da fonte, a quitina pode ocorrer em duas formas, α e β . A forma α é a mais abundante, estando presente na parede celular de fungos, lagostas, carapaça de caranguejos, cascas de camarão e cutículas de insetos. Por sua vez, a forma β -quitina é mais rara, mais reativa que a α , sendo esta uma importante propriedade relacionada às transformações enzimáticas e químicas da quitina (RINAUDO, 2006).

As formas α e β da quitina têm microestrutura predominantemente cristalina, o que inviabiliza sua dissolução, na maioria dos solventes, sendo este um dos maiores problemas relacionado ao seu uso (YI et al., 2005). Já a quitosana possui estrutura menos cristalina que a quitina, pela perda do grupo acetil, apresentando assim maior solubilidade em meio aquoso, embora seja virtualmente insolúvel em valores de pH neutros e alcalinos (DASH et al., 2011; RAMOS et al., 2003).

O padrão para caracterizar a quitosana se baseia no grau de desacetilação (GD), parâmetro empregado para caracterizar o seu conteúdo de unidades N-acetil-D-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (AZEVEDO et al., 2007; RINAUDO, 2006; SINGLA, CHAWLA, 2001). Geralmente, é difícil de obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também se eleva (PHAECHAMUD et al., 2000).

O grau de desacetilação determina características como, as propriedades ácido básicas e solubilidade (WU et al., 2001). A protonação do grupamento amina da glucosamina cujo o pKa adquire valores entre 6,3 e 6,7, permite a dissolução em soluções ácidas diluídas (KARAKEÇILI et al., 2007). A massa molecular do polímero também influencia a viscosidade e solubilidade, afetando a acessibilidade e disponibilidade de sítios ativos. Uma característica peculiar adicional é a sua alta hidrofobicidade, devido a um grande número de grupos hidroxila no polímero (SARMENTO, NEVES, 2012). O grau de desacetilação e de polimerização relacionados diretamente com a massa molar são dois parâmetros que definem o uso da quitosana e suas várias aplicações (VOGLT *et. al*,2008).

A quitosana é considerada um polímero com características promissoras que favorecem a sua aplicação biotecnológica (ALMEIDA, 2009). A natureza catiônica, rara entre

polissacarídeos (geralmente ácidos ou neutros), permite a interação eletrostática com moléculas carregadas negativamente, principalmente a quitosana que assume a carga positiva em valores de pH menores que 6,7 (MUZZARELLI, 2009).

Com alta aplicabilidade a quitosana pode ser utilizada em diversas áreas, desde saúde, a agricultura, como: cultura de células, carreamento de fármacos (MADHUMATHI et al., 2010), cobertura anti-corrosão, filmes comestíveis antimicrobianos (ZHANG et al., 2013), engenharia de tecidos (ZARGAR, ASGHARI, DASHTI, 2015), imobilização de proteínas, adsorção de íons metálicos e corantes no tratamento da água (SOBAHI et al, 2014), na agricultura (MINET et al, 2013, QUIÑONES et al., 2013). A reconhecida biocompatibilidade e não-toxicidade da quitosana tornam possível seu uso em diversas aplicações biomédicas como preparação de membranas e géis para uso médico (SAHOO et al., 2009).

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago. Esta capacidade explica o papel do polímero na aceleração da cicatrização de lesões, assim como a biodegradabilidade desse polímero no organismo (JAYAKUMAR et al., 2010; SINGLA, CHAWLA, 2001). Quitosana, também, promove a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que este polímero podem prevenir infecções, se aplicado diretamente no local (KUMAR et al., 2004).

3.2.1 Atividade antimicrobiana da quitosana

A ação antimicrobiana da quitosana foi descoberta por Allan e Hadwiger (1979), quando observavam o efeito fungicida de biopolímeros contra fungos filamentosos. Neste contexto, vários estudos foram realizados utilizando quitina, quitosana e seus derivados contra vários grupos de microrganismos como bactérias, fungos, leveduras o que levou a busca por seus mecanismos de ação e seu uso na saúde (RAVI KUMAR, 2000).

A quitosana apresenta muitas atividades biológicas relacionadas às suas características físico-químicas. Existem muitas vertentes sobre a ação da quitosana frente a microrganismos como bactérias, fungos, algas, mas ainda não se tem um mecanismo de ação completamente elucidado (LEE, JE, 2013). Alguns autores relacionam a atividade antimicrobiana aos seus grupos amínicos, que em contato com fluidos fisiológicos provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos, resultando em aglutinação das células bacterianas e inibição do crescimento (KONG et. al, 2010). Outra vertente defende que ação bacteriana da quitosana

está relacionada com as propriedades químicas da quitosana e as características das membranas dos microrganismos (KHAN et al., 2011).

Em estudo realizado utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bactérias gram positivas e gram negativas respectivamente, através de microscopia eletrônica se observou que a ação é diferenciada de acordo com o tipo de bactéria. A ação no *S. aureus* foi na membrana tornando fragmentada, já a ação na *E.coli* foi no citoplasma deixando mais concentrado e aumentando o interstício celular (QI et al., 2004). A massa molecular da quitosana também interfere no modo de ação contra as bactérias, quanto maior for a massa molecular da quitosana maior é o seu efeito em bactérias gram positivas, por outro lado, nas bactérias gram negativas o efeito é potencializado quanto menor for o peso molecular da quitosana. A quitosana de alto peso molecular forma uma película que envolve as células de bactérias gram positivas e inibi a absorção de nutriente e as trocas realizadas através da membrana, a quitosana de baixo peso molecular penetra mais facilmente em bactérias gram negativas causando vários distúrbios no metabolismo destes microrganismos (CAMPOS, 2007).

A atividade antimicrobiana da quitosana sofre a influência de vários fatores como o peso melocular, grau de desacetilação (GD), densidade de cargas positivas, características hidrofílicas / hidrofóbicas, capacidade quelante, concentração e pH da solução da quitosana. Além de fatores ligados ao tipo de microrganismo, tipo de parede celular, metabolismo, interação com DNA e RNA entre outros fatores que podem definir o modo de ação da quitosana e como ela irá interagir com o microrganismo alvo (BADAWI, RABEA 2011; RABEA et al.,2003).

Outro mecanismo de ação da quitosana como agente antimicrobiano ocorre no deslocamento de íons, como Ca^{++} presente nos sítios aniônicos da membrana, o que causa um desequilíbrio no interior da célula afetando a função de organelas e a troca de íons através da membrana, ocasionando a morte celular (GOMES, 2007). Em estudo realizado por No *et. al*, (2002), foi constatado a ação da quitosana frente a vários tipos de bactérias, onde a inibição do crescimento foi verificada e teve relação direta com o peso molecular da quitosana e com a espécie de bactéria testadas.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos de plantas, seus constituintes principalmente os terpenóides e fenilpropanóides fornecem aromas e atividades biológicas (BURT, 2004). Os componentes dos óleos essenciais variam de acordo com o tipo de plantio, clima, períodos sazonais, estações do ano, assim com o tipo de extração utilizada para retirada do óleo também influencia na concentração e quantidade dos componentes (DJILANI, DICKO, 2012). Os compostos que fazem parte dos óleos essenciais são geralmente extraídos de folhas e flores variam de acordo com o tipo de planta e a parte de planta utilizada na extração, assim como o método de extração que geralmente são usadas técnicas de hidrodestilação, destilação a vapor e extração por solventes (COWAN, 1999).

Várias espécies de plantas produzem óleos essenciais já conhecidos e estudados, estima-se que cerca de 2000 espécies de plantas produzam cerca de 3000 tipos de óleos essenciais diferentes, sendo destes 300 de valor comercial agregado (DJILANI, DICKO, 2012). Na procura por novas fontes terapêuticas cada vez mais se tem utilizado óleos essenciais como fonte de moléculas que são testadas frente a microrganismos de interesse médico e que adquiriram resistências aos antimicrobianos comuns (CLARDY, WALSH, 2004). Geralmente a bioatividade está baseada em um ou dois componentes principais presentes na mistura, esses podem ser isolados e testados para verificar sua eficácia tanto na mistura quanto agindo sozinho (BAKKALI et al., 2008).

Com extensa variedade de óleos, alguns têm sido mais estudado e cada vez mais utilizado na medicina alternativa. A busca por tratamentos alternativos vem crescendo ao longo dos anos com o aumento de pessoas imunocomprometidas, uso indiscriminado de drogas, câncer entre outras doenças, assim como a limitação de antibióticos disponíveis para terapia (RAUT, KARPPAJIL, 2014).

Na natureza, os óleos desempenham diversos papéis importantes na proteção das plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, reduzindo o número de doenças ocasionadas por esses microrganismos presentes na natureza (BAKKALI et al., 2008). Além do fator de proteção eles podem atrair insetos e animais que ajudam na polinização e na dispersão das sementes da planta. São extraídos de plantas geralmente aromáticas presentes em zonas de clima temperado, por exemplo, em países tropicais e

mediterrâneos onde representam grande conhecimento da medicina popular local (BAKKALI et al., 2008).

Esses óleos são biossintetizados em estruturas histológicas especializadas, na planta denominados de glândulas secretoras. Svoboda e Greenaway (2003) confirmaram que existem dois tipos de glândulas que secretam óleos essenciais: as localizadas na superfície das plantas com secreção exógena e as glândulas localizadas no interior da planta com secreção endógena. Os extratos obtidos de óleos essenciais podem variar em quantidade, qualidade e na composição de acordo com o clima, componentes do solo, órgão produtor na planta, idade e a fase do ciclo vegetativo (ANGIONI *et al.*, 2006; MASOTTI *et al.*, 2003). Especialistas consideram o óleo essencial como sinais químicos que permitem a planta controlar e regular seu ambiente, por isso essa influência grande na produção de acordo com o ambiente (BRUNETON, 1993).

Os óleos essenciais são extraídos de diversas formas a partir dos vegetais, sendo os métodos de extração classificados em: os métodos clássicos/ convencionais e os métodos avançados / inovadores. Os métodos mais avançados utilizam técnicas mais modernas como a tecnologia de ultrassom e micro-ondas, que são processos mais avançados e eficientes onde o produto final apresenta maior qualidade e rendimento, além de diminuir o tempo de extração e os gastos com energia (WANG, WELLER, 2006). De acordo com o tipo de extração utilizada o óleo pode variar em componentes químicos, estereoquímica, podem ocorrer reações com solventes, evaporação de compostos, várias modificações podem ocorrer de acordo com a escolha e o tipo de extração utilizada, sendo assim um fator determinante na composição dos óleos (MASOTTI et al., 2003).

Cerca de 3.000 óleos essenciais já foram identificados, mas apenas 10% são aprovados para uso em diversas áreas como farmacêutica, alimentos, cosméticos entre outras (TRONGTOKIT et al., 2005). São reconhecidos como substâncias seguras para uso pela FDA (Food and Drug Administration, US). Como várias atividades já elucidadas os óleos essenciais tem sido tema de vários estudos em busca de novas drogas e novas atividades desses compostos. Já é conhecido que as atividades presentes nesses óleos estão relacionadas com compostos bioativos, grupos funcionais, estrutura e arranjo das moléculas (NERIO, OLIVERO-VERBEL, STASHENKO, 2010; REICHLING et al., 2009).

Na procura por drogas que possam substituir substâncias sintéticas para o tratamento de infecções bacterianas, os óleos essenciais são grande fonte de moléculas com ação

antibacteriana conhecida (EDRIS, 2007). Os óleos essenciais apresentam um grande potencial antibacteriano, contra um grande número de bactérias gram negativas e gram positivas (BURT, 2004). O modo de ação é baseado na capacidade do óleo em contato com bactérias perturbar a conformação da parede celular e membrana citoplasmática, levando a lise e extravasamento de compostos intracelulares (ROTA et al., 2004).

3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon Martini* (PALMAROSA)

O óleo essencial de palmarosa é extraído da planta, o gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 30 espécies de gramíneas perenes e aromáticas, sendo a maioria dessas nativas da região tropical e subtropical (KHANUJA et. al,2005; TRIPPLEBROOKFARM, 2003). É uma planta Liliopsida, pertencente à família Poaceae (GOMES, NEGRELLE, 2003), que representa uma das maiores famílias de plantas, englobando cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas (UNIVERSITY OF HAWAII, 2013).

A composição do óleo essencial de palmarosa é dividida basicamente entre dois componentes o geraniol e o acetato de geranil que são ácidos graxos encontrados em óleos essenciais. No óleo essencial de palmarosa, o geraniol constitui mais de 80%, sendo o acetato de geranil o segundo composto em maior percentagem 12%, que estão representados na figura 2 (SCHERER et al., 2009), concordando com Rao et al. (2005) onde foram encontrados teores de 78 - 85% de geraniol e 3,0 - 12% de acetato de geranil em diferentes amostras de óleo essencial de palmarosa. A composição química varia qualitativamente e quantitativamente dependendo da estação do ano, parte da planta utilizada na extração, tipo de extração e o genótipo da planta (PAPACHRISTOS et.al, 2004).

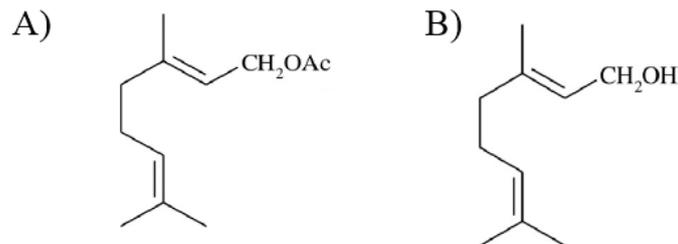
Segundo Murbach et al., (2015), a composição do óleo é bastante variável, o que pode afetar a quantidade de componentes majoritários e minoritários, o geraniol e o acetato de geranil são os componentes presentes em maior quantidade no OEEM. A densidade e os coponenetes foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), onde foram encontrados os seguintes componentes (Tabela 1). Essa variação que ocorre entre o acetato de geranil e o geraniol é devido a atividade da enzima geranil acetato esterase que realiza a conversão de acetato de geranil para o geraniol (SMITHA, RANA,2015).

Tabela 1- Composição e densidade do OEMC . Fonte: (Murbach et al., 2015).

Óleo essencial	Densidade (mg/mL)	Componentes %
<i>Cymbopogon martinii</i>	874	Geraniol (57.49), Geranyl acetate (13.56), Linalool (1.71), β -caryophyllene (1.07), Ocimene (0.27)

Fonte: (Murbach et al., 2015).

Figura 2 – Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon martinii*, A) Acetato de geranyl e B) Geraniol. Fonte: Adaptada de Smitha, Rana, 2015.



Fonte: Adaptada de Smitha, Rana, 2015.

Com amplo uso na Índia e Turquia, principalmente na aromaterapia e no uso de medicina local como regenerador da mucosa intestinal sendo eficaz contra bactérias patógenas do sistema gastrointestinal (BAKKALI et al., 2008; SÁ, ANDRADE, SOUZA, 2013). O óleo de palmarosa também apresenta atividade antioxidante que inibe os radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que são moléculas capazes de causar danos as células e interferir na síntese de DNA. Essa proteção oferecida pelo óleo essencial de palmarosa é essencial para prevenção de doenças crônicas e degenerativas para células do corpo humano (WANNES et al., 2010).

O óleo de palmarosa é muito conhecido pelo seu uso em tratamentos de pele. Ele tem efeito equilibrador sobre a pele e pode ajudar a hidratar a pele seca e balancear a secreção sebácea da pele oleosa. Além disso, ele auxilia a reduzir o tecido cicatricial e suas propriedades antissépticas são úteis no tratamento da acne e outras infecções menores. Esse óleo também participa na estimulação a regeneração celular e ajuda a reduzir as rugas e melhora a aparência da pele cansada e envelhecida (CURTIS,1996).

O óleo de *Cymbopogon martini* é utilizado como base para perfumaria fina e é valorizado por causa do seu teor de geraniol. Além do valor na perfumaria, o óleo tem um grande efeito na cicatrização de feridas (TAMULI, SAIKIA, BORUAH, 2012). Utilizado como condimento em alimentos, apresenta um grande valor agregado pois é um componente valioso para perfumaria e cosméticos além de ter ação contra vários microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (RAJESWARA et al., 2009).

Óleo essencial de Palmarosa apresenta atividade antimicrobiana e o seu uso tópico pode ser vantajoso em comparação com outras substâncias em formulações dermatológicas (TEIXEIRA et al., 2005). Em estudo realizado por Yonzon et. al, (2005), a atividade antimicrobiana de 35 óleos essenciais extraídos de plantas foram testadas frente a levedura *Candida albicans*, sendo que destes 35 óleos testados 13 apresentaram efeito contra esta levedura incluindo o óleo de Palmarosa.

Muitos óleos essenciais têm ação antimicrobiana relativamente rápida, apresentando potencial para causar a morte celular em concentrações equivalentes as CBM (Concentração Bactericida Mínima). Com amplo espectro de ação grande parte dos óleos essenciais possui a atividade antibactericida reconhecida (HAMMER, CARSON, 2011).

O modo de ação dos óleos essenciais ainda não foi totalmente elucidado, porém acredita-se que os óleos em contato com a superfície bacteriana agem por difusão passiva através da parede celular. Vários constituintes dos óleos tem a capacidade de atravessar a membrana citoplasmática, penetrando no interior da célula bacteriana e interagido com sítios intracelulares críticos (CRISTANI et.al, 2007). Cada vez mais se busca alternativas naturais que possam substituir produtos sintéticos e que apresentem efeitos parecidos o que torna a produção mais viável e renovável já que matéria-prima vem da natureza.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 QUITOSANA

A quitosana utilizada no presente estudo foi a quitosana extraída de crustáceo da empresa Sigma®. Foram utilizadas dois tipos de quitosana a de baixo peso molecular (QB) e a de alto peso molecular (QA). As quitosanas foram misturadas em uma proporção de 1:1 e diluídas em ácido acético 1% para obtenção do composto de quitosana- QA + QB a 20mg/mL. A solução do composto foi agitada por 12h e em seguida o composto de quitosana formado (QAB) foi precipitado com a adição de hidróxido de sódio 10N até obtenção de pH 9. Em seguida foi centrifugado a 4000rpm por 15min. O composto de quitosana precipitado foi lavado com água destilada até pH 7. A amostra final de quitosana, alto + baixo peso molar, foi liofilizada e caracterizada.

4.2 PREPARAÇÃO DO GEL DO COMPOSTO DE QUITOSANA

O composto de quitosana proveniente da mistura entre QA e QB foi pesada, e posteriormente diluída em ácido acético 1%, sob agitação por 12h. O pH do gel de quitosana foi ajustado para próximo de 6,0 com adição de hidróxido de sódio 2M.

Esse composto de quitosana foi preparado com o intuito de somar as propriedades biológicas conhecidas de ambas as quitosanas, de alto e baixo peso molar, como também melhorar a consistência do gel preparado e facilitar assim o seu manuseio.

4.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon Martinii* (OECM)

O óleo essencial foi obtido através da empresa Ferquima®, onde a mesma informou a composição do óleo de acordo com o lote utilizado. Para utilização do óleo o mesmo foi diluído em Tween 80 para uma concentração final de 75% sendo a solução mãe para as demais diluições utilizadas no estudo. Para realização dos testes *in vitro* foram feitas diluições com a solução mãe de 75% do OECM com água destilada estéril na proporção de 1:1(v/v). Na

preparação do gel foi utilizada a concentração inicial de 10% do OEEM e nos testes isolados com o OEEM foi testada a concentração de 5%.

4.4 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon Martini* (OEEM)

A preparação do gel do composto de quitosana associado ao OEEM foi realizada através da homogeneização de QAB a 20mg/mL com o óleo previamente diluído CMEO a 10% de acordo com os protocolos descritos acima na proporção de 1:1, para formação do gel.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA (QAB)

4.5.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho (IV)

A Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho permite observar e classificar bandas vibracionais relativas a características dos grupos funcionais que compõem a molécula de quitosana.

O IV foi obtido em um espectrofotômetro Bruker modelo IF66, na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. A região de análise compreendeu 400cm^{-1} e 4000cm^{-1} . Para 1,5 mg do composto de quitosana liofilizado foi adicionado 100mg de brometo de potássio (KBr), a mistura foi homogeneizada em almofariz de ágata e deixada na estufa a vácuo a 110°C durante 20 horas. O espectro do pó do composto de quitosana foi obtido utilizando pastilha de KBr como suporte (SANTOS et al 2003).

4.5.2 Grau de Desacetilação (GD%): Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O grau de desacetilação é definido como a relação do número de agrupamentos amina e grupamentos amida na cadeia polimérica da quitosana. Para determinar o GD%, podem ser utilizadas diversas metodologias, a metodologia abordada neste estudo foi a técnica de

ressonância magnética nuclear (RMN H^1). O GD% é determinado através da relação entre os picos referentes aos prótons do grupo acetoamido da quitina e outros prótons, exceto o próton do carbono anomérico (C1) da quitina/quitosana.

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 15mg de quitosana em 1mL de água deuterada (D_2O) contendo 1% HCl (37%), permanecendo 24 horas em agitação formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 5 mm de diâmetro para a realização da análise de acordo com os seguintes parâmetros programados no equipamento (Varian Unity Plus em 3000MHz): temperatura de 50 °C, tempo de relaxação de 6 segundos, aquisição dos espectros a 353K, com pulso de 90° (8,2 ms) e 16 pulsos de varredura (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

O grau de desacetilação foi calculado pela equação 1 proposta por Hirai et al. (1991), que utiliza os sinais dos prótons H^2 , H^3 , H^4 , H^5 , H^6 , H^6' (H^{2-6}) de ambos os monômeros e o pico referente aos núcleos do hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}).

$$GD(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} H^{ac} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

E pela equação 2 proposta por Signini et al. (2000), que utiliza a área do pico na região de 2ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}) e a área do pico em 3,4ppm referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico (H^2).

$$GD\% = \left(1 - \left(\frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

4.5.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X

A técnica de difração de Raio-X (DR-X) empregada ao composto de quitosana foi realizada no Laboratório Multiusuário do Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE), com radiação Cu-K α sendo $\lambda = 1,5418\text{\AA}$ em uma faixa de varredura entre 3° e 80° com taxa de 0,02° min⁻¹.

4.5.4 Determinação do peso molar por Análise Viscosimétrica

O peso molecular do composto de quitosana foi determinado por medida de viscosidade, segundo a metodologia proposta por Santos et al. (2003), utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske (dinterno= 1,01mm) termostaticado a $(25 \pm 0,01)^\circ\text{C}$, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte.

Para a determinação da viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foram preparadas soluções de quitosana em 25ml de solução de ácido clorídrico 1% sob agitação constante por 15h, com posterior aquecimento por 2 minutos a 80°C , para obtenção de soluções de concentração final variando de 0,1 a 1,0mg/mL. Alíquotas de 25ml de cada solução foram utilizadas nos capilares para medição do tempo de escoamento expresso em segundos, e estabelecido através da média dos valores obtidos em três repetições (SANTOS et al., 2003).

A razão do tempo de escoamento da solução do polímero pelo tempo de escoamento da solução do solvente é chamada de viscosidade relativa. As viscosidades específicas de cada quitosana foram calculadas aplicando a média dos tempos de escoamento na fórmula abaixo (Equação 3). Ambas as viscosidades são adimensionais.

$$\eta_{esp} = \left(\frac{t - t_0}{t_0} \right) \text{ (Eq. 3)}$$

Onde: η_{esp} = viscosidade específica da amostra, t = tempo de escoamento da solução no viscosímetro e t_0 = tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro.

Já a viscosidade reduzida foi encontrada através da divisão da viscosidade específica pela concentração e tem como dimensão o inverso da concentração (Equação 4).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \text{ (Eq. 4)}$$

Onde: η_{red} = viscosidade reduzida da amostra e C = concentração em gramas de polímero em 100 mL de solução.

As viscosidades intrínsecas das quitosanas foram encontradas pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação 5 de Huggins (1942).

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \text{ (Eq. 5)}$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houving (Eq. 6), proposta por Rinaudo et al. (2001). O valor da constante K e a dependem do polímero, do solvente e da temperatura. Nesta pesquisa o solvente utilizado foi o ácido clorídrico na temperatura de 25°C o qual apresenta os valores de $1,81 \times 10^{-5}$ e 0,93 para K e a , respectivamente.

$$[\eta] = K (\bar{M}_v)^a \quad (\text{Eq. 6})$$

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana, foram utilizadas as seguintes espécies de bactérias que comumente causam infecções e são as espécies mais usadas para testes como padrão de gram positiva e gram negativa. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC-15656) e *Escherichia coli* (ATCC-25922). As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram repicadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e armazenadas a 37°C por 24 horas, após este período, uma alíquota de cada cepa foi transferida para tubos de ensaio contendo caldo BHI para posterior medição da absorbância em espectrofotômetro em faixa de leitura 540nm. As cepas foram padronizadas para próximo de 10^8 UFC/mL. Os testes foram realizados com QAB, OECM e com gel da associação entre QAB e OECM.

4.6.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Através do teste de microdiluição em placa de 96 poços foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das substâncias testes- QAB, OECM e gel de QAB associado ao OECM. As microplacas foram preparadas de forma que cada compartimento apresenta-se um volume final de 100 µL, com proporções variadas de caldo BHI e das substâncias testes atingindo ao final, diferentes concentrações. Para o controle de esterilidade foram adicionados 100 µL do meio; para o controle de crescimento 80 µL do meio. A todos os orifícios foram adicionados 20 µL do inóculo microbiano, com exceção do controle de esterilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após período de incubação, para determinação do CIM,

foram adicionados 30 µL de resazurina 0,01% nos poços. Após 1 hora foi feita a análise da mudança de cor. O experimento foi realizado em triplicata.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resazurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO et al., 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano enquanto que as variações de rosa e roxo são indicadores da presença de células viáveis para crescimento.

4.6.2 Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram retiradas 10 µL, dos poços que não foram adicionados resazurina e transferidos para placas de Petri contendo meio agar BHI, posteriormente incubadas a 37°C por 48 horas. A CBM será considerada como sendo a menor concentração a partir da qual não seja observado crescimento microbiano após cultivo, na ausência das substâncias testes. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6.3 Análise da Fração de Concentração Inibitoria ou *Fraction inhibitory concentration* (FIC)

A análise da combinação entre a QAB e o OECM foi realizada através do índice FIC, que avalia a presença de ação sinérgica, antagônica ou indiferente na combinação entre os compostos. A FIC é avaliada levando em consideração os valores obtidos através do CIM. O cálculo foi obtido segundo equação 7 abaixo.

Eq. 7

Índice da amostra A	Índice da amostra B
FIC (I): $\frac{MIC\ A\ na\ combinação}{MIC\ A\ do\ composto\ isolado}$	FIC (II): $\frac{MIC\ B\ na\ combinação}{MIC\ B\ do\ composto\ isolado}$

O índice $FIC_{final} = FIC (I) + FIC (II)$. Quando $FIC < 0,5$ efeito sinérgico, $FIC 0,5-1,0$ efeito indiferente e $FIC > 4,0$ antagonismo.

4.6.4 Planejamento Fatorial 2^2

O planejamento fatorial 2^2 , consiste em avaliar todas as possíveis combinações entre o OECM e o gel de quitosana QAB. Diferentes concentrações do OECM e do gel de quitosana QAB foram empregadas neste estudo (Tabela 2). Este experimento foi realizado em duplicata e o conjunto estatístico foi avaliado pelo programa Statistica 7.

Tabela 2- Concentrações do OECM e do gel de quitosana QAB utilizados no planejamento fatorial.

Produtos testes	(-)	(0)	(+)
OECM	0,01 µl/mL	0,025 µL/mL	0,04 µL/mL
GEL QAB	0,2 mg/mL	0,6 mg/mL	1 mg/mL

4.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE: POTENCIAL DE IRRITABILIDADE

O teste de irritabilidade foi realizado utilizando o Teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha o HET- CAM (*Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane*) segundo Steiling et al., (1999), para a execução do teste foram utilizados ovos de galinha incubados durante 10 dias. Como substância controle irritante foi utilizado o lauril sulfato de sódio à 1%. No décimo dia de incubação, o reservatório acima do espaço aéreo do ovo foi removido, a membrana corioalantóide do ovo exposta e umedecida com salina fisiológica a 0,9%. A salina foi removida cuidadosamente com algodão, expondo a membrana corioalantóide. Uma alíquota de 200µl das substâncias testes- QAB, OECM e o gel de QAB associado ao OECM foram aplicados na membrana corioalantóide do ovo fertilizado. Durante 5 minutos foram avaliados os efeitos irritantes como: hemorragia, lise e coagulação. O tempo foi medido em segundos e aplicado à equação 8:

Eq.8

$$\frac{(301- \text{Hemorragia}) \times 5}{300} + \frac{(301- \text{Lise}) \times 7}{300} + \frac{(301- \text{Coagulação}) \times 9}{300}$$

Após a aplicação da fórmula os valores foram avaliados de acordo com a média e o desvio padrão da média e os valores classificados de acordo com a tabela 3.

Tabela 3- Classificação do nível de irritação segundo teste HET-CAM

Categoria de Irritação	Faixa de Pontuação
Não irritante	0-0,9
Ligeiramente Irritante	1-4,9
Irritante	5-8,9
Muito Irritante	9-21

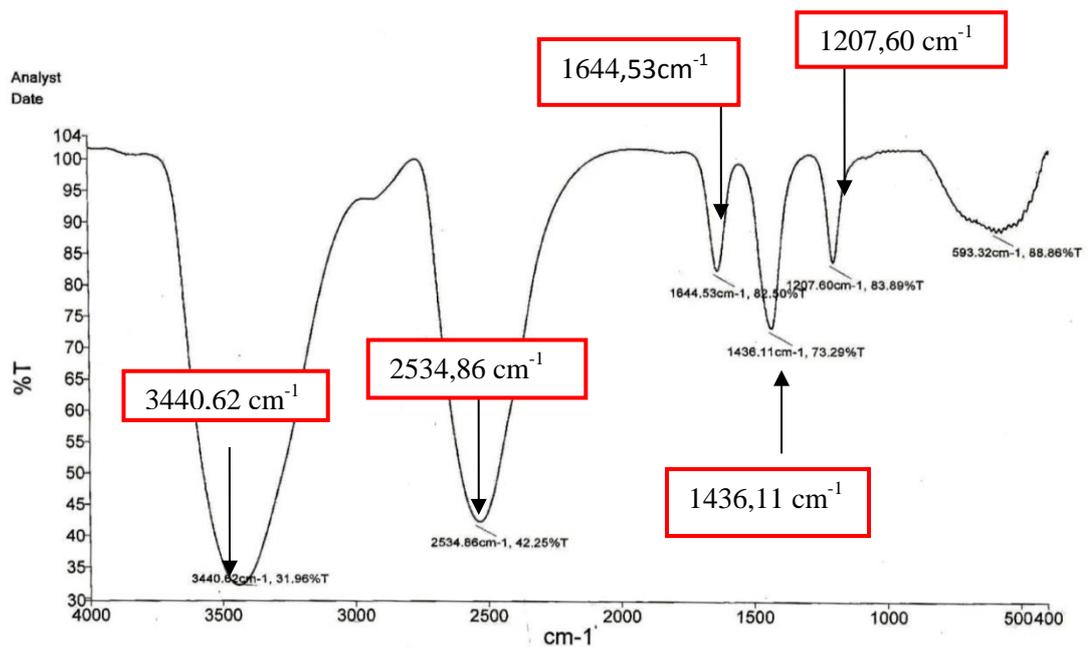
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

5.1.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) é baseada na vibração característica de grupos funcionais, bastante utilizada para caracterizar compostos naturais como os biopolímeros. A figura 3 mostra o espectro de absorção e as bandas características da quitosana.

Figura 3- Espectro de absorção da região do infravermelho IV da quitosana QAB



A banda característica larga e intensa presente na região $3440,62 \text{ cm}^{-1}$ é consequência dos estiramentos dos grupos -OH ligados à estrutura do polímero da quitosana bem como da água presente nos biopolímeros, é uma região importante para caracterização da quitina e da quitosana. A banda presente na região $2534,86 \text{ cm}^{-1}$, representa os estiramentos simétricos e assimétricos das vibrações das ligações C-H. A absorção na banda $1644,53 \text{ cm}^{-1}$ está relacionada a amida I, referente ao grupo funcional acetoamida que corresponde a amida

residual da quitosana, comprovando que a quitosana não está totalmente desacetilada (KUMA-KRISHNAN et al., 2015). A amida II, observada na banda $1436,11\text{ cm}^{-1}$ está relacionada com o grupo N-H no plano e o estiramento C-H, que demonstra a prevalência de amina livre NH_2 . Já a banda $1207,60\text{ cm}^{-1}$ representa o grupo C-O-C presente na estrutura e a vibração do grupo OH.

De acordo com os resultados encontrados na espectroscopia do IV (Infravermelho), o polímero é caracterizado como quitosana, pois apresenta os espectros de absorção nas bandas que padronizam a quitosana assim como resíduos de grupamentos amida que refletem o seu grau de desacetilação, corroborando com os resultados encontrados por Zawadzki e Kaczmarek, (2010).

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear: Grau de desacetilação GD%

O grau de desacetilação é definido como o número de grupamentos amina em relação ao número de grupamentos amida da cadeia polimérica, é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitina e da quitosana. Para determinar o grau de desacetilação da quitosana neste trabalho foi utilizada a técnica de ressonância nuclear magnética de hidrogênio- $\text{RMN } ^1\text{H}$. A ressonância magnética nuclear de ^1H é uma técnica que permite a quantificação de alto grau de desacetilação. Segundo Lavertu, et al. (2003) a determinação do grau de desacetilação por $\text{RMN } ^1\text{H}$ é feita utilizando uma relação entre os picos referentes aos prótons do grupo acetoamido da quitina e os outros prótons, exceto o próton do carbono anomérico (C_1) da quitosana/quitina (Figura 4)

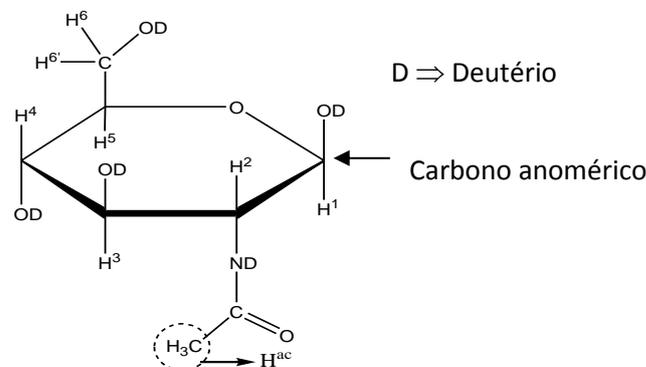


Figura 4- Esquema com a numeração dos prótons que aparecem no $\text{RMN } ^1\text{H}$. Fonte: Anjos (2005).

Nesta técnica, a amostra de quitosana é dissolvida em uma solução de ácido clorídrico deuterado resultando em uma solução viscosa, para impedir interações intermoleculares e intramoleculares, que modificam a integração dos picos, influenciando o valor do grau de desacetilação a medida é realizada a 50°C. Também é necessário que as medidas sejam realizadas rapidamente, para minimizar problemas causados pela hidrólise da quitosana, ou seja, a quebra das ligações glicosídicas que formam o biopolímero. A Figura 5 a seguir mostra os resultados do RMN ^1H , para quitosana desacetilada.

Figura 5 - Espectro de RMN ^1H do composto de quitosana (QAB), derivado da mistura entre quitosanas de crustáceo de alto e baixo peso molecular.

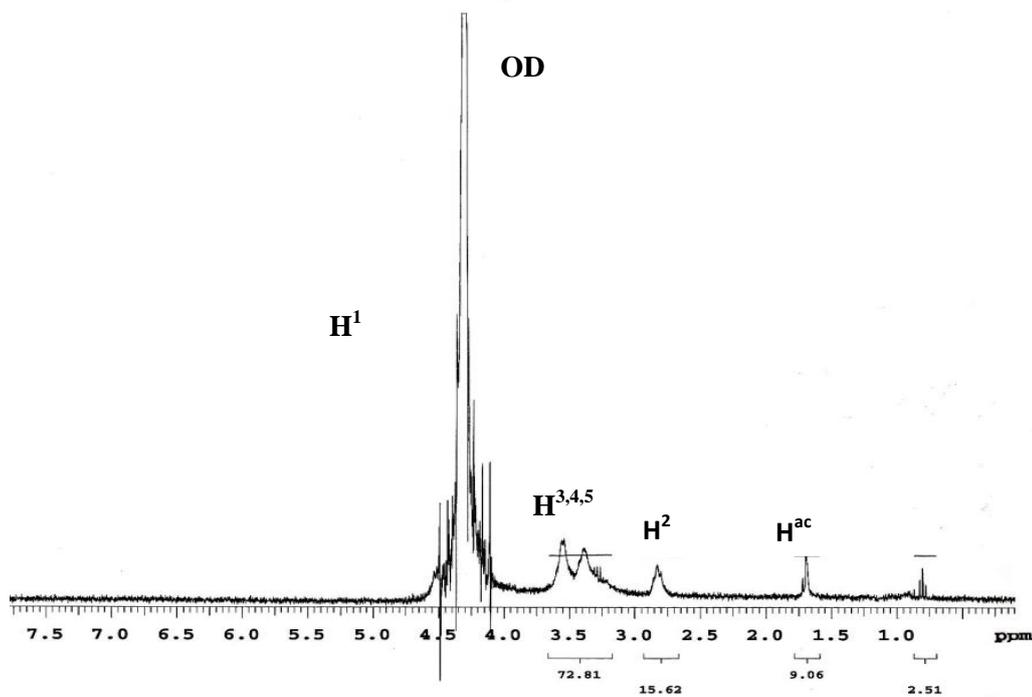


Tabela 4- Integração dos picos do espectro de RMN ^1H do composto de quitosana (QAB), derivado da mistura entre quitosanas de crustáceo de alto e baixo peso molecular para o cálculo do grau de desacetilação.

Hidrogênios	Integração dos Picos
H^{ac}	9,06
H^2	15,62
$\Sigma\text{H}^{2,3,4,5,6,6'}$	72,81

A equação 2 só considera os picos do grupo acetoamido (H^{ac}) e dos hidrogênios do carbono na posição 2 do anel glicopiranosídico (H^2). A integração dos picos encontra está na Tabela 4. A escolha desses dois picos se deve ao fato de que as áreas relativas aos núcleos dos grupos metila, presentes no grupo acetamido e ao núcleo na posição 2 do anel glicopiranosídico, estão relativamente livres das influências do pico de HOD.

Tabela 5- Valor do grau de desacetilação ($GD\%$) da quitosana QAB por RMN 1H .

Grau de desacetilação por RMN 1H	GD %
Quitosana QAB	80,66%

O valor obtido através do cálculo utilizando a equação Eq. 02 (Tabela 5), está de acordo com os resultados encontrados por outros autores como Foster et al., (2015), que avaliou o grau de desacetilação da quitosana com 55% e 80%, utilizando a mesma metodologia abordada nesse estudo.

5.1.3 Cristalinidade por Difração de Raio-X

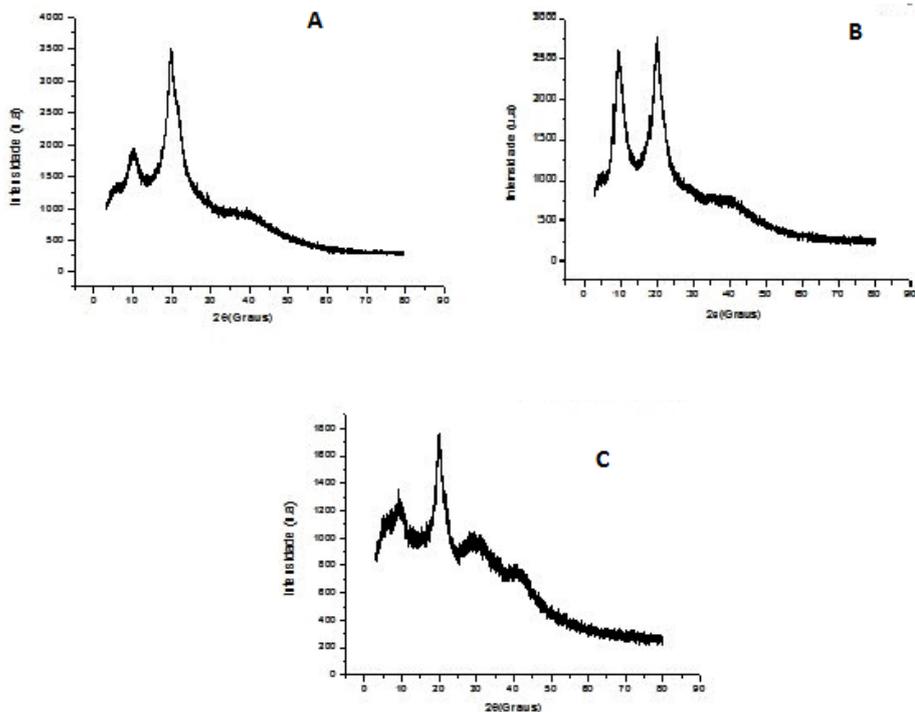
A estrutura cristalina está relacionada com a distância atômica e sua regularidade. Os polímeros como a quitosana nunca são 100% cristalinos, eles apresentam uma região amorfa e uma região cristalina que é característica da estrutura química da quitosana. A figura 6 apresenta os difratogramas das quitosanas de alto peso molecular (QA), de baixo peso molecular (QB) e o composto de quitosana (QAB).

A quitina apresenta dois picos de maiores intensidades um pico em torno de 20° e outro pico menor próximo 10° . Durante o processo de desacetilação da quitina para quitosana, esses picos se mantêm, mas o pico presente em 10° pode diminuir de acordo com o grau de desacetilação da quitosana. Estes picos são evidenciados nos difratogramas das 3 amostras de quitosana, na QA o pico 10° está menor em relação a QB e a mistura QAB, o que evidencia ser a amostra mais desacetilada. A cristalinidade está relacionada com o grau de desacetilação, quanto maior o $GD\%$ menos cristalina é a quitosana, mas também está

relacionada ao processo de produção da quitina, tratamento com hidróxido de sódio e temperaturas elevadas utilizadas no processo (DUAN et al., 2009).

A mistura entre as quitosana a QAB, apresenta os picos característicos da quitosana onde o pico em 10° está menos intenso e o pico em 20° representa a reflexão principal, o pico cristalino e o pico amorfo, respectivamente. Está é uma evidência da cristalinidade parcial da quitosana, sendo este resultado também encontrado por Duan et al., 2009 e Zawadzki, Kaczmarek, 2010.

Figura 6- Difratomogramas DRX das quitosana (A) Quitosana comercial alto peso; (B) Quitosana comercial baixo peso; (C) Quitosana comercial alto + baixo peso QAB.



5.1.4 Massa Molar: Medida de Viscosidade

Assim como o grau de desacetilação a massa molar da quitosana constitui um dos principais parâmetros determinantes para a sua aplicabilidade bioquímica e biofarmacológica, tendo em vista que ambos os fatores influenciam nas suas características, a exemplo da viscosidade (THARANATHAN, et al., 2012).

A viscosidade polímerica é a medida do volume hidrodinâmico do polímero em solução. Os tamanhos das moléculas presentes no polímero influenciam na sua viscosidade. Por apresentarem moléculas de maior tamanho que os solventes empregados para sua diluição, a viscosidade da solução é maior quando comparada com a do solvente puro. Com isso, o resultado da viscosidade polímerica é resultante de um comparativo entre o tempo de escoamento do solvente com o tempo de escoamento da solução polímerica, em concentração e temperatura determinada.

A massa molar da quitosana QAB foi determinada utilizando a viscosidade e os valores da viscosidade específica, reduzida e intrínseca. A viscosidade específica da amostra de quitosana QAB foi obtida através da aplicação da média dos tempos de escoamento descritos na Tabela 6 na equação 3.

Tabela 6- Valores da concentração da quitosana QAB estudada, tempo de escoamento medida pelo viscosímetro e média dos tempos para cada concentração da quitosana estudada.

CONCENTRAÇÃO QUITOSANA	T1	T2	T3	MÉDIA (T)
0,1	31,94	31,95	31,95	23,985
0,2	33,21	33,24	33,22	24,9675
0,3	34,57	34,56	34,54	25,9925
0,4	36,77	36,77	36,75	27,6725
0,5	38,62	38,61	38,58	29,0775
0,6	40,23	40,21	40,2	30,31
0,7	41,95	41,93	41,87	31,6125
0,8	43,47	43,48	43,47	32,805
0,9	46,12	46,06	46,09	34,7925
1	48,14	48,07	48,27	36,37
0	29,8	29,8	29,79	22,3475

A viscosidade reduzida foi obtida através da viscosidade específica dividida pela concentração, tendo como dimensão o inverso da concentração (Equação 4). Através da viscosidade reduzida pode-se plotar um gráfico, tendo como eixos viscosidade reduzida *versus* concentração (Equação 5). A viscosidade intrínseca está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houving (Equação 6).

Como resultado obtido, o composto de quitosana (QAB) no presente trabalho apresentou massa molar viscosimétrica de $6,03 \times 10^4$. Este valor é considerado de baixo peso molar, sendo compatível com os resultados encontrados na literatura, de acordo com peso

molar pode se definir vários parâmetros da caracterização da quitosana (SARMENTO, 2012). Quitosana com massa molecular menor é considerado um polímero mais maleável e de fácil manuseio para aplicação como antimicrobiano tópico (DASH et al., 2011).

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizada segundo a técnica de microdiluição, utilizando placa de 96 poços. O CIM foi determinado como a última concentração que não cresceu microrganismo com a revelação da resazurina. O CBM foi determinado pela última concentração que houve crescimento em placa contendo meio agar BHI, na ausência das substâncias testes, através do retrocultivo do poço acima do valor do CIM. Os resultados estão expressos na tabela 7 com as concentrações em (mg/mL) para a QAB, OECM e junção de QAB com OECM.

Os valores de CIM e de CBM frente à *S. aureus* foram iguais para QAB (4mg/mL) e para *E. coli* foram respectivamente de 2mg/mL e de 4mg/mL. A atividade antibacteriana da quitosana está intimamente ligada a sua natureza catiônica, que permite a interação entre os lipídeos carregados negativamente presentes nas membranas das bactérias expostas a quitosana, o que leva a um desequilíbrio de membrana e gera a perda de material intracelular assim como permite a penetração da quitosana causando ainda mais dano e levam a morte da célula bacteriana (KONG et al., 2010). A ação mais eficiente na bactéria *E. coli*, está ligada ao baixo peso molar da quitosana onde o estudo realizado por Younes et al., (2014), demonstrou que quanto menos o peso molecular da quitosana maior é o seu efeito antibactericida frente a bactérias gram negativas como a *E. coli*. Além disso, bactérias gram negativas apresentam uma hidrofobicidade maior do que as bactérias gram positivas o que confere uma sensibilidade maior a quitosana (CHUNG et al., 2004, DU et al., 2009).

Na determinação do CIM, utilizando o OECM frente a *S.aureus* e *E. coli*, foram encontradas as concentrações de 13,5 mg/mL e 22,5 mg/mL respectivamente. Contudo, a CBM não foi encontrada para o OECM, tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, demonstrando que o OECM apresentou apenas efeito bacteriostático frente as cepas testes. Segundo Okoh et al., (2010), os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias gram positivas e gram negativas, o que foi evidenciado pelo resultado do CIM mas o OECM teve sua ação mais efetiva em menor concentração contra a bactéria gram positiva testada o *S.aureus*. Doran et al.,(2009), sugeriu que os vapores formados por óleos essenciais podem

reduzir o nível de *S.aureus* resistente a metilina (MRSA) no ar e nas superfícies, mostrando ser eficaz no tratamento de infecções resistentes aos antibióticos convencionais.

A associação do óleo essencial OEEM e da quitosana QAB, foi testada para verificar se ocorria sinergismo, antagonismo ou indiferença quanto a combinação das duas substâncias. Os valores de CIM e de CBM frente à cepa de *S. aureus* para a associação QAB + OEEM 3mg/mL+ 13,3mg/mL e de 5mg/mL + 22,5 mg/mL, respectivamente. Para *E. coli* exposta a QAB+EOEM as concentrações CIM e CBM foram de 1,5mg/mL + 6,75mg/mL e de 4mg/mL + 18,5mg/mL, respectivamente. O resultado mais significativo ocorreu na *E. coli*, onde a concentração do OEEM diminuiu de 22,5 mg/mL para 6,75 mg/ mL em relação a CIM, como também ocorreu redução, mas em menor escala da concentração da quitosana de 2 mg/mL para 1,5 mg/mL. Através do resultado pode-se inferir que a quitosana teve um papel de carreador do OEEM, já que este polímero age na membrana do microrganismo modificando a permeabilidade e facilitando a entrada do OEEM.

Segundo Sokovic et al.,(2010), os OE podem ser utilizados para o tratamento clínico de infecções devido a sua atividade em baixas concentrações sem apresentarem toxicidade, sendo efetivo assim em doenças causadas pela infecção de *E. coli* e *Salmonella* entre outras bactérias patogênicas do trato gastrointestinal de animais e seres humanos. A ação em conjunto com a quitosana diminuiu a concentração do OEEM mantendo a efetividade contra *E. coli*, e confirmando a atividade da quitosana também frente a bactérias gram negativas (PARK et al., 2004).

O CBM para as amostras testadas frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, verificou-se que tanto o OEEM, quanto a QAB e a associação OEEM +QAB, foram bacteriostáticas com a confirmação do crescimento em placa de petri contendo meio BHI em todas as concentrações testadas.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana, com determinação da concentração mínima inibitória (CIM) e da concentração mínima bactericida (CBM) para o composto de quitosana de alto e baixo peso molar (QAB), do óleo essencial de *Cymbopogon martini* (OECM) e da associação entre QAB e OECM para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Microorganismos testes	CIM			CBM		
	QAB*	EOCM*	QAB/EOCM*	QAB*	EOCM*	QAB/EOCM*
<i>S. aureus</i>	4	13,5	3 /13,5	4	--	5 / 22,5
<i>E. coli</i>	2	22,5	1,5 /6,75	4	--	4 /18,5

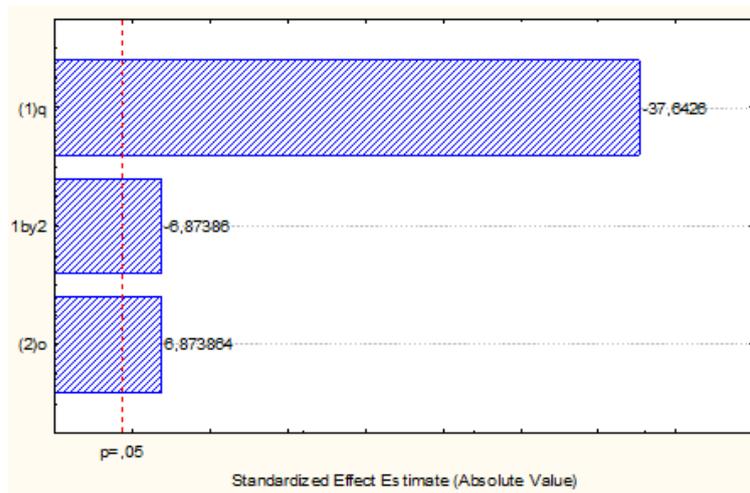
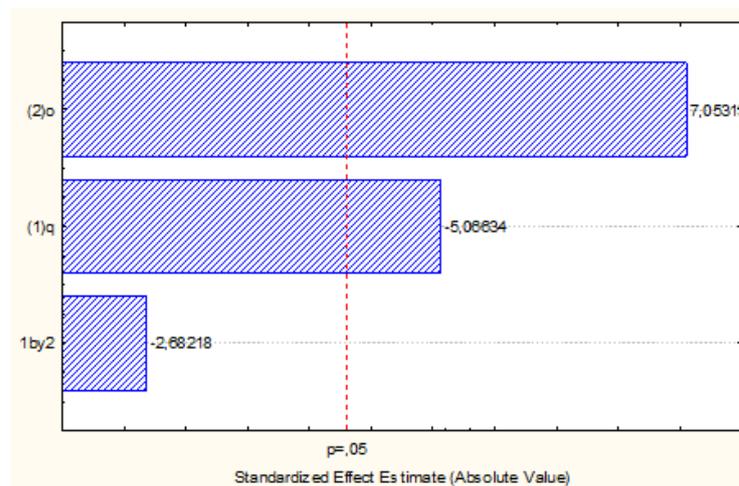
*Valores em mg/mL.

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2² E ANÁLISE DA FRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (FIC)

Os componentes dos OEs ao interagirem com outros compostos podem modificar ou apresentar modificações na sua atividade antimicrobiana, através de quatro tipos de efeitos: Sinergismo, antagonismo, aditivo ou indiferente (BASOLÉ, et al., 2012).

Para avaliar a associação dos componentes foi realizado o planejamento fatorial 2² e a análise da fração de concentração Inibitória (FIC). Observando primeiramente os gráficos de Pareto (Gráfico 1 e 2) obtido através do planejamento fatorial é possível observar que nas concentrações utilizadas da quitosana QAB apresentou influencia negativa no crescimento microbiano da *E. coli* e *S. aureus*. Analisando o OECM, o óleo apresentou influencia positiva no crescimento de *E. coli* assim como também apresentou significância estatística, mas apresentou influência positiva para *S. aureus*, nas concentrações utilizadas.

A associação entre ambos os componentes demonstraram influência negativa para *E. coli* e para as cepas de *S. aureus*, porém na cepa *S. aureus* não ocorreu significância estática como ocorreu para cepa de *E. coli*.

Gráfico 1- Gráfico de Pareto para cepas de *E.coli***Gráfico 2-** Gráfico de Pareto para cepas de *S.aureus*

Para os valores de FIC, obtidos a partir dos valores MIC foram obtidos de acordo com a equação descrita na metodologia. A associação entre os componentes apresentou índice FIC de 1,75 para cepas *S.aureus*. Em cepas de *E. coli* a combinação dos compostos apresentou FIC de 1,05. Na literatura é possível encontrar valores variáveis para determinar a faixa do FIC (BASOLÉ, et al., 2012). Entretanto neste trabalho foi considerado como valores padrões sendo, FIC < 0,5 efeito sinérgico, FIC 0,5-1,0 efeito indiferente e FIC > 4,0 antagonismo. Dessa forma, neste trabalho a associação demonstrou efeito indiferente na atividade dos compostos.

5.4 TESTE DE IRRITABILIDADE – *HEN'S EGG TEST ON THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE* (HET-CAM)

A membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado (CAM) compreende uma vasculatura funcional que apresenta similaridade com as mucosas de mamíferos, e devido a isso o HET-CAM tem sido proposto como um modelo para simular a resposta de tecidos vivos a uma substância teste, sem uso de animais (Bagley, Waters, Kong, 1994). Os efeitos agudos induzidos por uma droga nos vasos sanguíneos e nas proteínas constituintes da CAM simulam os efeitos induzidos pela mesma substância quando aplicado o teste de olho de coelho. HET-CAM apresenta vantagens, tais como aceitabilidade como teste não animal, simplicidade e rapidez em sua execução, sensibilidade e por ser relativamente barato (Luepke, 1985; Vargas et al, 2007).

Na Alemanha e na França, o método de HET-CAM foi oficialmente aceito como um ensaio *in vitro* válido, para predição de substâncias irritantes graves (Steiling et al 1999). As leis que regulam a experimentação animal permitem protocolos com embriões de galinha com até 10 dias de fecundados sem autorização dos comitês de experimentação animal. (Bagley, Waters, Kong, 1994; Luepke, 1985; Vargas et al, 2007).

As substâncias testes foram avaliadas separadamente quanto ao seu grau de irritabilidade. Para cada amostra foram realizadas cinco medições avaliando o surgimento, em segundos, dos parâmetros característicos de lise, hemorragia e coagulação, resultados expressos na Tabela 8. Os valores do tempo em segundos foram adicionados na equação 8 descrita na metodologia a fim de avaliar o potencial de irritação.

Tabela 8- Determinação do potencial de irritação pela presença dos parâmetros lise, hemorragia e coagulação da quitosana de alto e médio peso molar (QAB), óleo essencial de *Cymbopogon martini* 1% (EOCM) e associação entre as substâncias QAB + EOCM 1% pelo teste da membrana corioalontóide do ovo. Controle positivo: lauril sulfato de sodio 1% (LSS1%).

Parametros de Irritabilidade da CAM	Substâncias testes			
	EOCM 1%	QAB	Associação QAB + EOCM	LSS1%
Lise	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.0 ± 1.0
Hemorragia	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	48 ± 3.0
Coagulação	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	63 ± 3.0
Potencial de irritação	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	17.74 ± 0.4

Não-irritante: 0.0-0.9; pouco irritante: 1.0-4.9; Irritante: 5.0-8.9 e Severamente irritante: 9.0-21.0

O composto de quitosana (QAB) não apresentou quaisquer dos parâmetros de irritação, sendo considerado não irritante. A quitosana é um biopolímero de natureza hidrofílica capaz de apresentar degradação através de enzima humanas, dessa forma sendo considerado biocompatível e biodegradável (AHMADI et al., 2015). Estes resultados mostraram-se de acordo com os obtidos pelo grupo de estudo do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (STAMFORD et al., 2013).

O OECM a 1%, bem como a associação entre QAB + OECM 1% não apresentaram nenhum dos sinais de irritação estabelecidos pela metodologia do HET-CAM, sendo ambos considerados não irritantes. A incorporação de OEs a possíveis agente carreadores superam as limitações relacionadas a baixa solubilidade dos óleos em água, assim como aumenta a estabilidade física dos compostos e podem melhorar a bioatividade do óleo assim como a redução de possíveis reações indesejadas (SEVERINO, et al., 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, a mistura entre a quitosana de alto e de baixo peso molar, mostrou-se um composto com todas as características esperadas, sendo um polímero semi-cristalino, peso molar baixo e com grau de desacetilação de 80,66%, de fácil manipulação e uso. Essas características encontradas na QAB influenciam na sua ação antimicrobiana como também na interação com as moléculas do OEEM. Tanto a QAB como o OEEM não demonstraram potencial irritante através do teste HET-CAM, o mesmo foi demonstrado após a associação destas duas substâncias. Nos testes antimicrobianos o OEEM se mostrou mais eficaz contra *S. aureus*, contudo tendo apenas ação bacteriostática. O composto de quitosana se mostrou mais eficaz contra *E. coli*, na associação entre o QAB + OEEM, o resultado mais significativo ocorreu na *E. coli*, onde ocorreu redução da concentração inibitória mínima do OEEM. Contudo é importante salientar que a associação QAB + OEEM conferiu ao óleo um efeito cida, não observado com o mesmo puro. Através do FIC, a associação teve um papel indiferente. Diante do exposto, pesquisas deverão ser feitas para elucidar o mecanismo de ação da associação da QAB com o OEEM frente a bactérias gram negativas, assim como a toxicidade da QAB e do OEEM deve ser investigada mais detalhadamente.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AHMADI, F.,OVEISI, Z.,SAMANI, S. M.,AMOOZGAR, Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in pharmaceutical sciences*, v. 10, n. 1, p. 1, 2015.

ALLAN, C.R., HADWIGER, L.A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell composition. *Exp Mycol* 3:285–287, 1979.

ALMEIDA, T. L. “**Desenvolvimento de membrana composta de PVAI e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico**”; Dissertação de mestrado; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; Março de 2009.

ANGIONI, A., BARRA, A., CORONEO, V., DESSI, S., CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, 2006.

ANJOS, F.S.C. **Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de química fundamental, Recife, 2005, 93p.

ANTUNES, R. M. P., LIMA, E. O., PEREIRA, M. S., CAMARA, C. A., ARRUDA, T. A., CATÃO, R. M. R., SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 16, p. 517-524, 2006.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, v. 3, p. 203-230, 2009.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana, aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, v.203, n. 6, p. 1457-1465, 2011.

BADAWY, M.E.I.; RABEA,E. I.; TAKTAK, N. E.M. Antimicrobial and inhibitory enzyme activity of N-(benzyl) and quaternary N-(benzyl) chitosan derivatives on plant pathogens. *Carbohydrate polymers*, v. 111, p. 670-682, 2014.

BAGLEY, D.M., WATERS, D., KONG,B.M.Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the draize rabbit eye irritation test. *Fd Chem Toxic*;32:1155-1160, 1994

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BASSOLÉ, I. H.N.; JULIANI,H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BELLINI, M. Z. **Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele.**UNICAMP, Campinas, 2012.

BRESOLIN, T.M.B.,CECHINEL FILHO,V. **Ciências farmacêuticas**, Itajaí: ed. Univali. p.35-37, 2003

BRUNETON, J. **Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales.** 1993.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos.** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2007.

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

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules.**Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRISTANI, M., D'ARRIGO, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M. G., MICIELI, D., TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

CURTIS, S. *Neal's Yard Remedies: essential oils*. Aurum Press Ltd., 1996.

DASH, M., CHIPELLINI, F., OTTENBRITE, R. M., CHIPELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DEMINA, T. S.; GILMAN, A. B.; AKOPOVA, T. A.; ZELENETSKII, A. N. Modification of the chitosan structure and properties using high-energy chemistry methods. *High Energy Chemistry*, v. 48, n. 5, p. 293–302, 2014.

DJILANI, A.; DICKO, A. *The therapeutic benefits of essential oils*. INTECH Open Access Publisher, 2012.

DORAN, A. L., MORDEN, W. E., DUNN, K., EDWARDS-JONES, V. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. *Letters in applied microbiology*, v. 48, n. 4, p. 387-392, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DU, W. L., NIU, S. S., XU, Y. L., XU, Z. R., FAN, C. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, n. 3, p. 385-389, 2009.

DUAN, W., SHEN, C., FANG, H., LI, G. H. Synthesis of dehydroabietic acid-modified chitosan and its drug release behavior. *Carbohydrate research*, v. 344, n. 1, p. 9-13, 2009.

DUMITRIU, S. Polysaccharides as biomaterials. In: DUMITRIU, S. *Polymeric Biomaterials*. 2ª Edição, University of Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, New York, p.1-61, 2002.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research*, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

FOSTER, L.J.R., HO, S., HOOK, J., BASUKI, M., MARÇAL, H. Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties. *PloS one*, v. 10, n. 8, p. e0135153, 2015.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*. v. 4, p. 137-144, 2003.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para o uso na biodegradação de hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2007.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, p. 255-306, 2011.

HU, X., DU, Y., TANG, Y., WANG, Q., FENG, T., YANG, J., KENNEDY, J. F. Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, n. 4, p. 451-458, 2007.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., KUMAR, P. S., NAIR, S. V., TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology advances*, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

KARAKEÇILI, A. G.; SATRIANO, C.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; MARLETTA, G. Surface characteristics of ionically crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 3884-3888, 2007.

KHAN, A., AHMAD, A., AKHTAR, F., YOUSUF, S., XESS, I., KHAN, L. A., MANZOOR, N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS yeast research*, v. 11, n. 1, p. 114-122, 2011.

KHAN, A. F., MUJEEB, F., FAROOQI, A., FAROOQUI, A. Effect of plant growth regulators on growth and essential oil content in palmarosa (*Cymbopogon martinii*). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(2), 2015.

KHANUJA, S. P., SHASANY, A. K., PAWAR, A., LAL, R. K., DAROKAR, M. P., NAQVI, A. A., KUMAR, S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.*(Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 33, n. 2, p. 171-186, 2005.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTE, K. P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial of tannins and related compounds using the microdilution broth method. *Planta Medicinal*, v. 65, p. 444- 446, 2009.

KONG,M; CHEN,X.G.; XING,K.; PARK,H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of food microbiology*, v.144, p. 51-63, 2010.

KUMAR-KRISHNAN, S., PROKHOROV, E., HERNÁNDEZ-ITURRIAGA, M., MOTA-MORALES, J. D., VÁZQUEZ-LEPE, M., KOVALENKO, Y., LUNA-BÁRCENAS, G. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal*, v. 67, p. 242-251, 2015.

LAVERTU, M., XIA, Z., SERREQLI, A. N., BERRADA, M., RODRIGUES, A., WANG, D.,GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.

LEE, D.S., JE, J.Y. Gallic acid-grafted-chitosan inhibits foodborne pathogens by a membrane damage mechanism. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 61:6574–6579, 2013.

LUEPKE, N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxic*;v. 23: p.287-29, 1985.

MADHUMATHI, K., KUMAR, P. S., ABHILASH, S., SREEJA, V., TAMURA, H., MANZOOR, K., JAYAKUMAR, R. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, n. 2, p. 807-813, 2010.

MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIÈRE, J. M., VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n. 24, p. 7115-7121, 2003.

MINAGAWA, T.; OKAMURA, Y.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S.; OKAMOTO, Y. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 640-644, 2007.

MINET, E. P., O'CARROLL, C., ROONEY, D., BRESLIN, C., MCCARTHY, C. P., GALLAGHER, L., RICHARDS, K. G. Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan. *Chemosphere*, v. 93, n. 11, p. 2854-2858, 2013.

MIYAGUTI, R. M. **Remoção de Fenol de Soluções Aquosas através da Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada em Quitosana.** Monografia apresentada para conclusão do curso de Bacharelado em Biotecnologia – Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2008.

MURBACH, T. A. , NUNES BARBOSA, B. F. L., BÉRGAMO A., F. C., ALBANO, M., MORES RALL, V. L., SFORCIN, J. M., FERNANDES JÚNIOR, A. The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. *Journal of Essential Oil Research*, p. 1-7, 2015.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 167–182, 2009.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 372-378, 2010.

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

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, v. 120, n. 1, p. 308-312, 2010.

PACKER, J.F.; DA LUZ, M.M.S. Metodo para avaliacao e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacologia.*, v. 17, n.1, p. 102-107, 2007.

PALOMINO, J. C., MARTIN, A., CAMACHO, M., GUERRA, H., SWINGS, J., & PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAPACHRISTOS, D. P., KARAMANOLI, K. I., STAMOPOULOS, D. C., MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest management science*, v. 60, n. 5, p. 514-520, 2004.

PARK, S.I.; DAESCHEL, M. A.; ZHAO, Y. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, v. 69, n. 8, p. M215-M221, 2004.

PHAECHAMUD, T.; KOIZUMI, T.; RITTHIDEJ, G. C. Chitosan citrate as film former: compatibility with water-soluble anionic dyes and drug dissolution from coated tablet. *International journal of pharmaceutics*, v. 198, n. 1, p. 97-111, 2000.

PRASH, A., HILI, P., VENESS, R.G., EVANS, C.S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, v.63, n. 5, p. 569-575, 2003.

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004.

QUIÑONES, J. P., GOTHELF, K. V., KJEMS, J., YANG, C., CABALLERO, A. M. H., SCHMIDT, C., COVAS, C. P. Self-assembled nanoparticles of modified-chitosan conjugates for the sustained release of dl- α -tocophero. *Carbohydrate polymers*, v. 92, n. 1, p. 856-864, 2013.

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

RAJESWARA, R. B.; RAJPUT, D. K.; AND PATEL, R. P. Essential oil profiles of different parts of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). *Journal of Essential Oil Reseach*. 21:519 – 521, 2009.

RAMOS, V. M.; RODRIGUEZ, N. M.; DIAZ, M. F.; RODRIGUEZ, M. S.; HERAS, A.; AGULLO, E. N-methylene phosphonic chitosan. Effect of preparation methods on its properties. *Carbohydrate polymers*, 52(1), 39-46, 2003.

RAO, B. R.; KAUL, P. N.; SYAMASUNDAR, K. V; RAMESH, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. motia Burk.). *Industrial crops and products*, 21(1), 121-127, 2005.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250-264, 2014.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

REICHLING, J., SCHNITZLER, P., SUSCHKE, U., SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine*, v. 16, n. 2, p. 79-90, 2009.

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

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, p. 397–430, 2008.

ROLSTAD, B. S.; BRYANT, R. A.; NIX, D. P. Topical management. **Acute & Chronic Wounds: Current Management Concepts**. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier Mosby, p. 289-307, 2012.

ROTA, C., CARRAMINANA, J. J., BURILLO, J., HERRERA, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*®, v. 67, n. 6, p. 1252-1256, 2004.

SÁ, R.C.S., ANDRADE, L.N. , SOUSA, D.P., A review on antiinflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, n. 18, p.1227–1254, 2013.

SAHOO, D.; SAHOO, S.; MOHANTY, P.; SASMAL, S.; NAYAK, P. L. Chitosan: a new versatile bio-polymer for various applications. *Designed monomers and polymers*, 12(5), 377-404, 2009.

SANFORD, P.A. Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization. In: Varum KM, Domard A, Smidsrød O (eds) *Advances in Chitin Science*, vol 6. NTNU, Trondheim, pp 35–42, 2003.

SANTOS, J. E., DA SOARES, J., DOCKAL, E. R., FILHO, S. P. C.,CAVALHEIRO, É. T. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SARMENTO, B.; DAS NEVES, J.. **Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics**. John Wiley & Sons, 2012.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Rev Bras Plantas Med*, 11(4), 442-9, 2009.

SEVERINO, R., VU, K. D., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. *International journal of food microbiology*, v. 191, p. 82-88, 2014

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

SMITHA, G. R.; RANA, V. S. Variations in essential oil yield, geraniol and geranyl acetate contents in palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. Wats. var. *motia*) influenced by inflorescence development. *Industrial Crops and Products*, v. 66, p. 150-160, 2015.

SOBAHI,T.R.A.; ABDELAAL, M. Y.; MAKKI, M.S.I. Chemical modification of Chitosan for metal ion removal. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 7, n. 5, p. 741-746, 2014.

SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P.D., BRKIĆ, DL, VAN GRIENSVEN, J. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, v. 15, n. 11, p. 7532-7546, 2010.

STAMFORD, T. C. M., DE CAMPOS-TAKAKI, G. M., DE MEDEIROS CAVALCANTE, H. M., MACEDO, R. O., STAMFORD-ARNAUD, T. M. **Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent.** INTECH Open Access Publisher, 2013.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; SILVA, O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients, *Toxicology In Vitro*, v.13, p. 375-384, 1999.

STOJKOVIĆ, D., PETROVIĆ, J., SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., KUKIĆ-MARKOVIĆ, J., PETROVIĆ, S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 13, p. 3205-3208, 2013.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Lemon scented plants. *International Journal of Aromatherapy*, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

TAMULI, P.; SAIKIA, M.; BORUAH, P. Dynamics of essential oils of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. under rust disease indices. *E3 Journal of Medical Research*, v. 1, n. 3, p. 034-037, 2012.

TEIXEIRA, D. M.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V.L.; DELARMELINA, C. Anticandida activity of brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97:305 – 311, 2005.

TRIPPLEBROOKFARM, 2003, *Cymbopogon nardus. Citronela Grass.* Disponível em: <[http://www. Triplebrookfarm.com/splants/name search frameset.html](http://www.Triplebrookfarm.com/splants/name_search_frameset.html)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

TRONGTOKIT, Y., RONGSRIYAM, Y., KOMALAMISRA, N., APIWATHNASORN, C. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bite. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 4, p. 303-309, 2005.

UNIVERSITY of HAWAII, 2013. **Botany Department**. Poaceae (Gramineae). Disponível em: <<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/po.htm>>. Acesso em 20 fev. 2015.

VARGAS A, ZEISSER-LABOUÈBE M, LANGE N, GURNY R, DELIE F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv. Rev.* ;59:1162-1176, 2007

VOGT, J. C., BRANDES, G., KRÜGER, I., BEHRENS, P., NOLTE, I., LENARZ, T., STIEVE, M. A comparison of different nanostructured biomaterials in subcutaneous tissue. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 7, p. 2629–2636, Jan 2008.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WANNES, W. A., MHAMDI, B., SRITI, J., JEMIA, M. B., OUCHIKH, O., HAMDAOUI, G., MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and chemical toxicology*, v. 48, n. 5, p. 1362-1370, 2010.

WIEGAND, C.; HIPLER, U. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. In: *Macromolecular symposia*. WILEY-VCH Verlag, p. 1-13, 2010.

WU, FENG-CHIN; TSENG, RU-LING; JUANG, RUEY-SHIN. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. *Water Research*, v. 35, n. 3, p. 613-618, 2001.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 51, p. 12720-12726, 2013

YI, H., WU, L. Q., BENTLEY, W. E., GHODSSI, R., RUBLOFF, G. W., CULVER, J. N., PAYNE, G. F. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 6, p. 2881-2894, 2005.

YONZON, M., LEE, D. J., YOKOCHI, T., KAWANO, Y., NAKAHARA, T. Antimicrobial activities of essential oils of Nepal. *Journal of Essential Oil Research*, v. 17, n. 1, p. 107-111, 2005.

YOUNES, I., SELLIMI, S., RINAUDO, M., JELLOULI, K., NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International journal of food microbiology*, v. 185, p. 57-63, 2014.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A.. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, v. 2, n. 3, p. 204-226, 2015.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 2, p. 394-400, 2010

ZHANG, W., ZHANG, J., JIANG, Q., XIA, W. The hypolipidemic activity of chitosan nanopowder prepared by ultrafine milling. *Carbohydrate polymers*, v. 95, n. 1, p. 487-491, 2013.