

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

KATHARINA MARQUES DINIZ

Prospecção da Atividade Antimicrobiana e Citotóxica do Gel de Quitosana Associado com
Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia*

Recife
2016

KATHARINA MARQUES DINIZ

Prospecção da Atividade Antimicrobiana e Citotóxica do Gel de Quitosana Associado com Óleo Essencial de *Melaleuca alternitifolia*

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Dr^a Thayza C. Montenegro Stamford

Co-orientadora: Dr^a Rita Cássia Carvalho Maia

Recife
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Diniz, Katharina Marques

Prospecção da atividade antimicrobiana e citotóxica do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Katharina Marques Diniz– Recife: O Autor, 2016.

64 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Thayza C. Montenegro Stamford

Coorientadora: Rita Cássia Carvalho Maia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências

- 1. Antibióticos 2. Biopolímeros 3. Testes de toxicidade I. Stamford, Thayza C. Montenegro (orientadora) II. Maia, Cássia Carvalho (coorientadora) III. Título**

615.329

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-127

KATHARINA MARQUES DINIZ

Prospecção da Atividade Antimicrobiana e Citotóxica do Gel de Quitosana Associado com Óleo Essencial de *Melaleucalternitifolia*

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Dr^a Thayza C. Montenegro Stamford

Co-orientadora: Dr^a Rita Cássia Carvalho Maia

Aprovada em, 25 de Fevereiro de 2016.

BANCA AVALIADORA

Prof^a Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Janaina Viana de Melo
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

Prof^a Dra. Thayza C. M. Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

**À minha mãe, amigos e todos os envolvidos
na construção deste trabalho**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado e me auxiliado na construção de novos caminhos.

A minha querida Mãe que nunca deixou de acreditar que tudo daria certo independente dos resultados, se atingidos ou não.

Agradeço a professora Thayza Stamford por ter me ensinado o mais importante dos ensinamentos, o valor de um trabalho em grupo, a humildade e a determinação. Assim como todo o conhecimento teórico e prático que adquiri sendo sua aluna.

A professora Tânia Stamford por ceder o seu laboratório, permitindo que ali fosse criada uma nova família e futuros graduados, mestres e doutores.

Ao meus amigos e namorado que foram meus ouvintes e conselheiros. Sendo os meus melhores momentos de alegria e conforto.

Aos amigos que este mestrado me proporcionou, Sabrina Barboza, Iranildo José, Anderson Deodato, Andrezza Lins e Natalie Farias. Agradeço pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos que compartilharam comigo fazendo este projeto possível.

Ao departamento da Nutrição, assim, como aos técnicos Vivaldo e Camilo que foram anjos e professores, profissionais com muito conhecimento e humildade.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente, com palavras e gestos durante esses dois anos importantes.

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

RESUMO

A Resistência bacteriana aos antibióticos é considerada um alarmante problema de saúde pública. Visando o controle dessa situação a Organização Mundial de Saúde preconiza o uso consciente e controlado dos antibióticos. Além disso, a fim de combater cepas bacterianas resistentes é preciso que novos agentes biocidas sejam pesquisados e avaliados quanto a sua atividade antibacteriana. O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* ou *tea tree oil* (TTO) apresenta propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antiparasitária. O TTO é constituído por monoterpenos e alguns álcoois e cetonos, que podem desencadear reações irritantes. Dessa forma, estudos têm sido realizados a fim de incorporar o TTO a materiais que possam diminuir os efeitos adversos do óleo. Quitosana é um biopolímero atóxico, biodegradável, com atividade antimicrobiana de amplo espectro e que apresenta a capacidade de reduzir a toxicidade de certas substâncias quando associada às mesmas. Neste contexto, o presente estudo objetivou realizar a prospecção da atividade antimicrobiana e citotóxica do gel de quitosana associado ao TTO. As quitosanas de alto e de baixo peso molar (QAB) adquiridas da Sigma® foram misturadas nas proporções de 1:1 e diluídas em ácido acético 1% para obtenção de uma solução a 10mg/mL do polímero. A quitosana obtida foi caracterizada 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. O TTO foi adquirido da Ferquima®, que disponibilizou sua composição química, tendo como compostos predominantes terpineno-4-Ol e gamma-terpineno. A atividade antimicrobiana da QAB, do TTO e da associação QAB+TTO foi determinada através da técnica de microdiluição, obtendo-se as Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bacteriana Mínima (CBM), frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os valores encontrados para CIM e CBM para *S.aureus* foram, respectivamente, de 4mg/mL para QAB, 13,5mg/mL para TTO e 3mg/mL/13,5mg/mL e de 2mg/mL/9mg/mL para associação QAB+TTO. Em cepas *E.coli* os resultados de CIM e CBM foram, respectivamente, de 2mg/mL e 4 mg/mL para QAB, 22,5mg/mL e 9mg/mL para TTO e de 1,5mg/mL/6,75mg/mL e 3mg/mL/13,5mg/mL para associação QAB+TTO. A análise para presença de sinergismo entre TTO 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. O TTO1% apresentou-se altamente irritante, enquanto a QAB e a associação TTO/QAB não foram irritantes. Com isso pode-se concluir que mesmo não apresentando sinergismo entre os compostos a quitosana apresentou um importante efeito sobre o TTO, reduzindo o índice de irritabilidade assim como a concentração de TTO necessária para apresentar atividade bactericida frente aos microorganismos testes.

Palavras Chaves: Biopolímero. Produtos bioativos. Citotóxicidade. Sinergismo.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is considered an alarming public health problem. For the control of situation the World Health Organization recommends the conscious and controlled use of antibiotics. However, in order to fight resistant bacterial strains is necessary that the new biocidal agents are researched and evaluated for their antibacterial activity. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* or *tea tree oil* (TTO) has biological properties such as antimicrobial, anti-inflammatory and anti-parasitic. The TTO is composed of monoterpenes and some alcohols and cetonos, which can cause irritating reactions. Therefore, many studies are being performed to incorporate TTO to other materials to diminish its adverse effects. Chitosan is a polymer nontoxic, biodegradable, with a broad spectrum antimicrobial activity, which has the ability to reduce the toxicity of certain substances when associated therewith. The present work aimed to prospect the anti-microbial activity and cytotoxicity from the chitosan gel associated with TTO. 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. 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. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* (TTO) was purchased from Ferquima®, which released its chemical composition, which had as terpinene-4-ol and gamma-terpinene as predominant compounds. The antimicrobial activity of the CHL, the TTO and CHL + TTO association was determined by the microdilution technique, obtaining the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The values for MIC and MBC for *S. aureus* were, respectively, 4mg/mL for CHL, 13,5mg/mL for TTO and 3mg/mL/13,5mg/mL and 2mg/mL/9mg/mL for association CHL+ TTO. In *E.coli* strains the MIC and MBC results were, respectively, 2mg/mL and 4mg/mL for CHL, 22,5mg/mL and 9 mg/mL for TTO and 1.5mg/mL/6,75mg/mL and 3mg/mL/13,5mg/mL for CHL + TTO association. The analysis to measure the synergy between TTO and QAB 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. TTO 1% showed the highest degree of irritation, while CHL and the association of the compounds were considered non-irritating. Thus, although no synergy was observed between the compounds, the chitosan showed an important effect over the TTO by reducing the irritability rate as well as the final concentration of TTO needed to induce anti-bacterial activity against the tested microorganisms.

Key-words: Biopolymers. Bioactive products. Cytotoxicity. Synergism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do Isopreno.....	21
Figura 2 -	Estrutura química dos monoterpenos.....	21
Figura 3 -	Estrutura química dos Terpenoides.....	22
Figura 4 -	Estrutura química dos Compostos aromáticos.....	22
Figura 5 -	Estrutura química da quitina.....	27
Figura 6 -	Processo de desacetilação.....	28
Figura 7 -	Representação Esquemática da microplaca com 96 poços.....	38
Figura 8 -	Espectroscopia na região Infravermelho da quitosana QAB.....	42
Figura 9 -	Esquema da quitina com numeração de prótons visualizados no RMN ¹ H.....	44
Figura 10 -	Espectroscopia do RMN 1H da quitosana QAB.....	45
Figura 11 -	Difratograma da quitosana QAB.....	47
Gráfico 1 -	Gráfico de pareto para cepas <i>E. coli</i>	52
Gráfico 2 -	Gráfico de pareto para cepas <i>S. aureus</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Componentes presente no óleo essencial <i>Melaleuca alternitifolia</i>	24
Tabela 2 -	Constituintes químico do óleo essencial <i>Melaleuca alternitifolia</i>	33
Tabela 3 -	Concentração para o TTO e quitosana QAB utilizados no planejamento fatorial.....	40
Tabela 4 -	Classificação dos níveis de irritabilidade segundo metodologia do HET-CAM.....	41
Tabela 5 -	Associação entre os comprimentos de onda e os grupos funcionais.....	43
Tabela 6 -	Interação dos picos presente no espectro de RMN.....	45
Tabela 7 -	Valores da concentração de quitosana QAB, tempo de escoamento, e média dos tempos.....	48
Tabela 8 -	Valores referentes as constantes K e <i>a</i> utilizados na equação de Mark-Houwink.....	48
Tabela 9 -	Atividade antimicrobiana da quitosana de alto e baixo peso molar (QAB), do óleo essencial de melaleuca/ Tea Tree (TTO) e da associação entre QAB e TTO para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	50
Tabela 10-	Determinação do potencial de irritação pela presença dos parâmetros lise, hemorragia coagulação da quitosana de alto e médio peso molar (QAB), óleo essencial de <i>Melaleuca altertifolia</i> 1% (TTO) e associação entre as substâncias QAB + TTO 1% pelo teste da membrana corioalontóide do ovo. Controle positivo: lauril sulfato de sodio 1% (LSS1%).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C_(n)	Carbono
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cu	Cobre
Da	Dalton
D₂O	Água Deuterada
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR-X 7	Difração de Raio-X
FIC	Fração da Concentração Inibitória
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de desacetilação
H⁽ⁿ⁾	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HET-CAM	Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IL-1	Interleucina-1
IV	Infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
MHz	Megahertz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina-Resistente
OEs	Óleos essenciais
OER	Óleo Essencial <i>Rosemary</i>
QA	Quitosana de alto peso molar
QB	Quitosana de baixo peso molar
QAB	Quitosana de Alto mais Baixo peso molar
QA	Quitosana de alto peso molar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro

TTO

Tea tree oil

UFC

Unidades Formadoras de Colônia

WHO

World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 ANTIBIÓTICOS: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	17
3.2 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS	20
3.4 <i>Melaleuca alternitifolia</i>	23
3.5 ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM PRODUTOS BIODEGRADÁVEIS	26
3.6 QUITINA E QUITOSANA.....	26
3.6.1 Atividade Antimicrobiana	30
3.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	31
4 MATERIAIS E METÓDOS	32
4.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE QUITOSANA DE ALTO MAIS BAIXO PESO MOLAR	32
4.2 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternitifolia</i> (TTO).....	32
4.3 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA DE ALTO E BAIXO PESO MOLAR.....	33
4.4 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Melaleuca alternitifolia</i>	33
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA DE ALTO MAIS BAIXO PESO MOLAR ...	34
4.5.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho	34
4.5.2 Grau de Desacetilação: Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34
4.5.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X.....	36
4.6 DETERMINAÇÃO DO PESP MOLAR POR ANÁLISE VISCOSIMÉTRICA.....	36
4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	39
4.8 ANÁLISE DA FRAÇÃO INIBITÓRIA OU <i>FRACTION INHIBITORY CONCENTRATION</i> (FIC).....	39
4.9 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ²	39
4.10 TESTE DE IRRITABILIDADE – <i>Hen’sEgg Test on The Chorioallantoic Membrane</i> (HET-CAM)	40

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA DE ALTO + BAIXO PESO MOLAR	42
5.1.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho	42
5.1.2 Grau de Desacetilação: Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	44
5.1.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X.....	46
5.1.4 Massa Molar: Medida de Viscosidade	47
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	49
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² E ANÁLISE DA FRAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (FIC).....	52
5.4 TESTE DE IRRITABILIDADE – <i>Hen’s Egg Test on The Chorioallantoic Membrane</i> (HET-CAM)	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana têm sido considerada um dos mais graves problemas mundiais que atinge a saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 25 mil mortes registradas na União Européia são ocasionadas por quadros infecciosos relacionados a cepas resistentes a antibióticos (OMS, 2015). Devido ao novo quadro mundial de saúde, novas propostas terapêuticas têm sido pesquisadas afim de estabilizar e regredir a incidência de cepas resistentes a antibióticos.

A *Melaleuca albertifolia* também conhecida como “tea tree” é uma árvore de origem australiana. Historicamente as folhas da *M. albertifolia* eram comumente utilizadas pela população local com finalidades antissépticas, cicatrizante, contra micoses e picadas de insetos (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003). A obtenção do óleo essencial de melaleuca também conhecido por *tea tree oil* (TTO) foi primeiramente realizada em 1925, através do curandeiro Athur Penforld que também avaliou as possíveis propriedades do óleo. Muitos estudos utilizando o TTO estão relacionados com a sua atividade antimicrobiana, antiinflamatória, e anticancerígena (CALCABRIM et al., 2004). Atualmente o TTO é regulamentado através da *International Organization for Standardization* (ISO) 4730-2004.

Segundo a ISO os óleos essenciais (OEs) são definidos como óleos voláteis obtidos de plantas por processo de destilação. Quimicamente os OEs são constituídos por grupos terpenos, fenilpropanoides e compostos oxigenados, como álcoois, cetonas e aldeídos (MEDEIROS, 2013). Embora os OEs sejam conhecidos popularmente pelas suas ótimas atividades biológicas, alguns de seus constituintes podem estar relacionados a efeitos irritantes, como no caso do 1,8 cianole no TTO. Outro fator limitante dos OEs é seu caráter hidrofóbico e de alta volatilidade. Devidos a esses problemas, os OEs têm sido cada vez mais inseridos a matrizes poliméricas que possam minimizar essas adversidades.

A Quitosana é um dos mais importantes derivados da quitina, constituída por ligações glicosídicas β 1-4. A quitosana é obtido através de processos de desacetilação da quitina, comumente realizados em condições de meio alcalino, porém também sendo possível obtê-la através de reações enzimáticas como a quitina desacetilase. A quitosana é relatada como um biopolímero biodegradável, não tóxico e biocompatível apresentando aplicações no ramo médico e farmacêutico (DAMIAN et al., 2005; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). As propriedades da quitosana estão intimamente correlacionadas ao peso molecular, ao seu grau de desacetilação, assim, como a quitina de origem e seu processo de desacetilação.

Diversos estudos têm empregado a quitosana como meio carreador de diversas drogas, visando a diminuição das concentrações necessárias de algumas substâncias, assim como uma alternativa no combate a processos de resistências a antibióticos já existentes. Por não apresentar dados na literatura sobre a associação da quitosana ao TTO, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica da quitosana associada ao TTO.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a atividade antimicrobiana e citotóxica do gel de quitosana associado com óleo essencial de *Melaleuca alternitifolia*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular um gel de quitosana, contendo quitosana de alto peso molar e baixo peso molar;
- Caracterizar a associação entre quitosana de alto peso molar e baixo peso molar;
- Formular um gel contendo quitosana de alto e baixo peso molar e associa-lo ao óleo essencial de *Melaleuca alternitifolia*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da quitosana, do óleo essencial de *Melaleuca alternitifolia*, e da associação entre estes compostos;
- Avaliar do grau de irritabilidade da quitosana, do óleo essencial de *Melaleuca alternitifolia*, e da associação entre estes compostos;
- Verificar se há efeito sinérgico da quitosana e do óleo essencial de melaleuca por planejamento fatorial da atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIBIÓTICOS: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Em 1928 Alexander Fleming observou a inibição do crescimento microbiano em cepas de *Staphylococcus aureus* circundadas por um bolor, posteriormente identificado como *Penicillium notatum*. Este efeito de inibição entre microorganismos foi chamado de antibiose, conceito inicial para denominar o que hoje se conhece como antibióticos (TORTORA, FUNKE., CASE, 2009). Os antibióticos são substâncias, produzidas em pequenas quantidades por bactérias, fungos e actinobactérias, capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de outros microorganismos, como bactérias e fungos.

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados de acordo com sua classe (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos), geração (primeira, segunda, terceira geração) ou através da sua atividade, bactericida quando causa a morte do patógeno, ou bacteriostático, quando inibem o crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010; WALSH, et al., 2003).

Após a descoberta e implementação da penicilina em 1929, novas classes de antibióticos foram estudadas e empregadas no controle de inúmeras doenças infecciosas, época que ficou conhecida como a “Era do Ouro”, porém, apenas em 1940 os antibióticos passaram a ser produzidos comercialmente e consumidos. A crescente comercialização, de forma indiscriminada, desencadeou o surgimento de microorganismos resistentes às drogas comerciais (SCHEFFLER, et al., 2013, PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). Em 1961, foram reportados os primeiros relatos de cepas *Staphylococcus aureus* Meticilina resistente (MRSA) (DEBABOV, 2013).

A resistência antimicrobiana é considerada como a capacidade de um microorganismo em inibir a ação antibiótica, tornando assim o tratamento inefetivo, com a permanência da infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). O mecanismo de resistência pode ser dividido em dois principais fatores, intrínseco e extrínseco (SANCHEZ, 2015). A resistência intrínseca é um fator que independe da seleção de antibióticos, estando particularmente envolvida com a hidrofobicidade ao antibiótico e sendo mediada pelo arcabouço celular (CULYBA et al., 2015). Bactérias Gram-negativas apresentam em sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas externas, componentes que alteram a permeabilidade e a sensibilidade aos antibióticos, a exemplo da vancomicina (DEBABOV, 2013).

Transferências horizontais de plasmídeos, transposons e outros elementos genéticos que conferem resistência a antibióticos, induzem ao mecanismo de resistência extrínseca, ou seja, resistência desencadeada por mecanismos genéticos. Estudo em metagenômica e genômica avaliou que diferentes ecossistemas, como solo e a própria microbiota humana podem apresentar genes, conhecidos como *resistome*, responsáveis por induzir resistência a determinados antibióticos (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN., 2015). As aquisições e transferências genéticas conferem diversos mecanismos de proteção à célula microbiana, como modificação do sítio de ligação da droga (resistência a fluoroquinolonas), inativação enzimática (beta-lactamases), superexpressão das bombas de efluxo e formação de biofilmes.

Atualmente, o crescente aumento de cepas multirresistentes é um dos mais graves problemas de saúde pública enfrentado mundialmente, visto que é um dos principais fatores do aumento da mortalidade e da morbidade por doenças bacterianas comuns (FRANCI et al., 2015). De 60-89% dos casos de infecções nasocomiais estão correlacionadas a cepas MRSA, responsáveis por 19.000 mortes nos Estados Unidos (FAIR., TOR, 2014).

Entre o grupo *Enterobacteriaceae*, as cepas de *Escherichia coli* demonstraram maior suscetibilidade aos antimicrobianos, entretanto, a transferência horizontal de genes de resistência tem modificado este conceito. Em 2011, o sorotipo *E.coli* O104:H4 foi responsável pela infecção de mais de 3.800 pessoas, ocasionando a morte de 54 pacientes, em um surto ocorrido na Alemanha (FRANK et al., 2011; NORDMAN et al., 2011; POIREL et al., 2010)

Segundo a Organização Mundial de Saúde a resistência aos antibióticos é responsável por 25.000 mortes na União Europeia, com um custo na área hospitalar de, aproximadamente, US\$ 1,5 bilhões de dólares por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). O surgimento de cepas multirresistentes têm exigido medidas de monitoramento no uso de antibióticos, assim, como inovações terapêuticas a fim de melhorar a eficácia do tratamento e diminuir a incidências de novas cepas resistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Agentes com atividades antimicrobianas não convencionais, como materiais biológicos e fitoquímicos, tem despertado grande interesse na busca de novos tratamentos, contra cepas multirresistentes (FRANCI et al., 2015).

3.2 PRODUTOS NATURAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O termo antibiótico, desde a descoberta da penicilina, está correlacionado a substâncias químicas específicas derivadas de organismos vivos ou produzidos por eles, que apresentem atividade antimicrobiana (PELAEZ, 2006). Os antibióticos naturais podem ser adquiridos a partir de diferentes fontes, como plantas, algas, animais, bactérias, actinobactérias e fungos (GIAWALI., IBRAHIM., 2014), sendo estes dois últimos as principais fontes utilizadas na produção de antibióticos. O avanço na indústria farmacêutica permitiu a produção de antibióticos de origem semi-sintética e sintética que diferenciam-se quanto as suas propriedades químicas, espectro e mecanismo de ação, sendo classificados quimicamente como derivados de aminoácidos, açúcares, acetatos, propionatos, entre outros.

Embora o uso de microorganismo para aquisição de agentes antimicrobianos ainda seja amplamente aplicada, a literatura indica maiores pesquisas com a utilização de plantas e seus metabólitos como fontes seguras para obtenção de antimicrobianos (GIAWALI., IBRAHIM, 2014; HAYEK., GIAWALI., IBRAHIM, 2013; TAJKARIMIN et al., 2010). Em um total de aproximadamente 422.000 espécies de plantas, conhecidas ao redor do mundo, cerca de 72.000 espécies são conhecidas por apresentar algum efeito medicinal. Estima-se que 80% da população mundial faça uso de plantas medicinais em atenção primária a saúde (CHANDRA., RAWAT., 2015; OMS, 2008).

O crescente aumento de cepas resistentes aos antibióticos convencionais têm impulsionado pesquisas na descoberta e uso de novas fontes naturais com propriedades antimicrobianas (AUMEERUDDY-ELALFI., GURIBI-FAKIM., MAHOMOODALLY., 2015). Estudos com *Acorus calamuns*, *Hemidesmuns indicus*, *Delonix regia*, *Emblica officinalis*, *Terminalia belerica* plantas encontradas no continente Indiano, demonstraram apresentar atividade antibiótica frente a cepas MRSA (KALI, 2015).

A atividade antimicrobiana, encontrada em extratos de plantas deve-se em sua maioria a presença de compostos sintetizados por vias secundárias da planta, a exemplo dos OEs (HAYEK et al., 2013).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

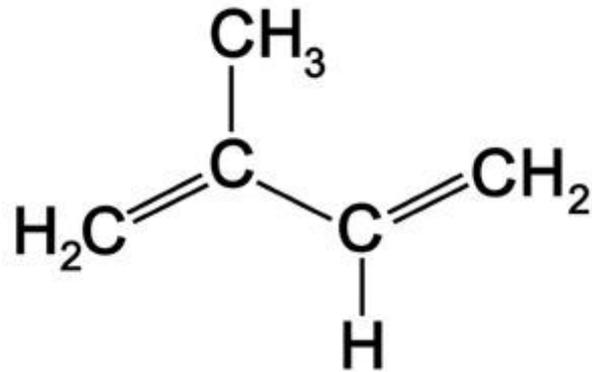
Os óleos essenciais (OEs) são líquidos voláteis, oleosos, constituído por um complexo de componentes de baixo peso molecular, aproximadamente abaixo de 500 Da (SHIZEMBU, 2015). Segundo a ISO, os óleos essenciais são definidos como óleos voláteis obtidos de plantas por processo de destilação. Entretanto, sua extração pode ser mediada por processos de destilação, hidrodestilação ou extração por solventes (RAUT., KARUPPAYIL, 2015).

Há séculos os OEs são utilizados na produção de cosméticos e perfumaria, assim, como para fins farmacológicos e medicinais. As atividades dos OEs abrangem ações bactericidas, fungicidas, inseticida, e fitoterápicas (BURT, 2004; VOON et al., 2012). Aproximadamente 3000 espécies de plantas aromáticas são produtoras de OEs, entretanto, apenas 10% dos OEs produzidos apresentam interesse e valor comercial (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Com características físico-químicas particulares os óleos essenciais têm despertado forte interesse na indústria médica e farmacêutica, por apresentarem efeitos bioativos particulares e por serem naturais e biodegradáveis geralmente, apresentando baixa toxicidade, atuando em diversas moléculas alvo, tornam-se substâncias de grande interesse científico e comercial (FIGUEIREDO, et al., 2008; PAVELA, 2015).

Quimicamente os OEs apresentam aproximadamente de 20-60 componentes diferentes sendo os terpenos e fenilpropanoides os principais encontrados (MEDEIROS, 2013; VICTORIA, 2010). Compostos oxigenados, como álcoois, cetonas e aldeídos também compreendem a composição dos OEs, em menores concentrações (MEDEIROS, 2013). Os componentes majoritários que representam de 20-70%, do total são na maioria, os principais responsáveis pela bioatividade do OE, embora quando isolados possam não demonstrar bioatividade relevante (PAVELA, 2015; BAKALLI et al. 2008). Este fato deve-se a uma atuação sinérgica entre os demais componentes presente nos OEs (RAUT; KARUPPAYIL, 2015; BASSOLÉ, 2012). Isman et al. (2008) avaliaram em seu estudo a atividade do óleo essencial de Rosemary (OER) frente a larvas *Lepdopteran larvae* e concluiu que o efeito do OER é resultado de sinergismo entre os constituintes químicos do OE.

Os Terpenos são os principais grupos de hidrocarbonetos que constituem quimicamente os OEs. Os terpenos são formados por combinações entre unidades de isoprenos, estrutura com cinco bases de carbono (C₅) (Figura 1).

Figura 1- Estrutura química do Isopreno

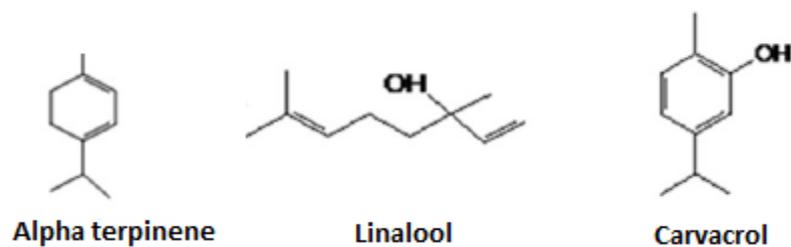


Fonte: David Darling

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos em sua estrutura em: monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$), diterpenos ($C_{20}H_{32}$) e tetraterpenos com oito unidades de isoprenos. Os monoterpenos são as principais classes de terpenos encontradas nos OEs, em uma taxa até 90% (Figura 2). Grupos de terpenos com a presença de O_2 em sua estrutura são denominados terpenóides.

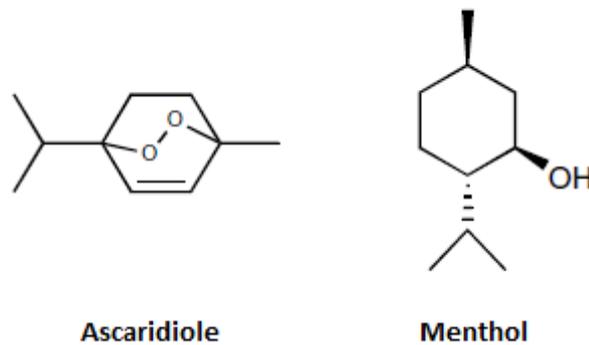
Os terpenóides são compostos derivados dos terpenos, diferenciado pela presença de algum grupo funcional, como álcool, cetona, aldeído (BAYALA., 2014) (Figura 3).

Figura 2- Estrutura química dos Monoterpenos



Fonte: Adaptado de Bayala et al, 2014.

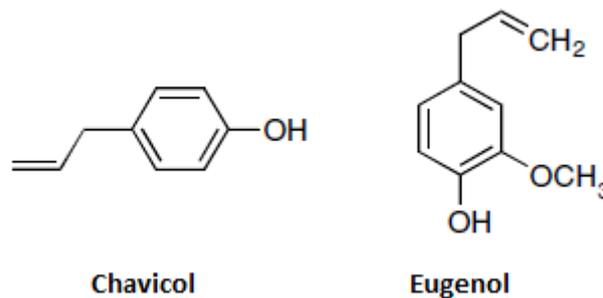
Figura 3- Estrutura química dos Terpenoides



Fonte: Adaptado de Bakkali, et al., 2008

Em menor frequência que os terpenos e terpenóides, os compostos aromáticos são derivados a partir do propil benzeno, através de mudanças em sua cadeia lateral (Figura 4). Sua biossíntese ocorre de maneira independente aos terpenos, porém sua síntese pode coexistir em algumas plantas. As principais famílias produtoras desses grupos são *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae* e *Rutaceae*.

Figura 4- Estrutura química dos compostos aromáticos



Fonte: Adaptado de Bakkali, et al., 2008

Produtos originados do metabolismo secundários de plantas podem exercer atividade potencializadora da atividade antimicrobiana ou como atenuantes da virulência, adequando à resposta do sistema imune do hospedeiro a infecção (GONZALES-LAMOTHE, et al., 2008).

Caracterizações químicas dos OEs demonstraram que os terpenos e seus derivados apresentam-se em níveis mais elevados, sendo estes os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada nos OEs (SOLOZÁNOS-SANTOS, MIRANDA-NOVALES, 2011). O funcionamento e integridade da membrana celular é comprometido através da

atuação dos monoterpenos que induzem mudanças no potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória (GRAY., HAMMER., 2011). Entretanto a atuação do OE sobre a membrana celular pode não induzir a sua lise celular, mas pode comprometer a espessura da parede celular e homogeneidade do conteúdo citoplasmático (GUINOISEU et al., 2010).

Embora as atuações isoladas de alguns compostos dos OE demonstrem algum efeito bioativo, estudos indicam que a maior parte dessas moléculas apresenta efeito reduzido quando isoladas. Sendo melhor empregados em associações de moléculas ou associadas a antibióticos, modificando a permeabilidade da célula bacteriana frente a determinadas drogas (SIMÕES et al., 2009).

3.4 *Melaleuca alternitifolia*

Melaleuca alternitifolia, planta de origem Australiana, é conhecida comercialmente como *tea tree* ou árvore de chá. O óleo essencial de melaleuca ou *Tea tree oil* é o principal produto de interesse científico e comercial. (WANG, et al., 2015; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). O TTO foi primeiramente isolado em 1925, devido à sua atividade antibacterina e antifúngica (BISCHOFF., GUALE., 1998).

O TTO apresenta na sua composição mais de 100 componentes sendo os principais formados por monoterpenos, como terpinen-4-ol, linalool e alfa-terpinen, além de alguns álcoois. O terpinen-4-ol está presente entre 40%-60% em comparação aos demais compostos (GUSTAFSON, et al., 2001; SAGAVE, et al., 2015; WANG, et al., 2015). A composição do TTO, é regulamentada pelo comitê Australiano, *International Organization for Standardization* (ISO 4730-2004), onde se encontram os valores máximos e mínimos de aproximadamente 15 componentes do TTO (Tabela 1) (HART et al., 2000; MANTIL; DALY; AVIS, 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Devido às suas conhecidas propriedades bioativas, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória e cicatrizante, o TTO vêm sendo amplamente incorporado em produtos e formulações tópicos, como sabões, gel ou creme de tratamentos e máscaras (HAMMER, 2014).

Tabela 1 - Componentes presentes no óleo essencial *Melaleuca alternifolia*

Componente	Composição (%)	
	ISO 4730	Composição típica
Terpinen-4-ol	=30	40,1
γ -Terpineno	10-28	23,0
α -Terpineno	5-13	10,4
1,8-Cineole	=15	5,1
Terpinoleno	1,5-5	3,1
ρ -Cymene	0,5-12	2,9
α -Pinene	1-6	2,6
α -Terpineol	1,5-8	2,4
Aromadendrene	Mínimo-7	1,5
δ -Cadinene	Mínimo-8	1,3
Limoneno	0,5-4	1,0
Sabineno	Mínimo-3,5	0,2
Globulol	Mínimo-3	0,2
Viridiflorol	Mínimo-1,5	0,1

Fonte: Adaptado ISO 4730- 2004

Atualmente, uma das maiores perguntas condutoras realizadas a respeito do TTO é sobre seu nível de irritação e toxicidade quando aplicado na pele humana. Segundo dados apresentados pela literatura as reações irritantes em voluntários submetidos ao tratamento com TTO decresce em formulações tópicas com níveis de $TTO < 25\%$ (CROSS., RUSSEL., 2008). Presença em níveis elevados do componente p-cymene está intimamente correlacionado com a taxa de foto-oxidação do óleo, reação responsável pelo surgimento de quadros irritantes. Entretanto, esta capacidade de oxidação pode ser diminuída na presença de maiores níveis de alfa-terpineno, terpinoleno e gama-terpineno (CROSS., RUSSEL., 2008). Estudos conduzidos por Aspres e Freeman (2003) avaliaram reações em pacientes submetidos a cremes, pomadas e géis com diferentes concentrações de TTO, 5%, 25% e 100% no qual demonstraram que a maior taxa de irritação esta relacionada ao uso de TTO puro (100%) (HAMMER et al., 2006).

O TTO vêm sendo aplicado em inúmeras formulações tópicas em gel, creme, pomadas e semi-sólido, geralmente em faixas de concentrações de 1-10%. Essa aplicabilidade está se tornando cada vez mais crescente na tentativa de obtenção de novas alternativas terapêuticas (MANTIL; DALY; AVIS, 2014).

O TTO apresenta elevadas concentrações de monoterpenos, com presença de compostos oxigenados e hidrocarbonetos. A presença de altos níveis de monoterpenos confere ao TTO uma atividade antimicrobiana de amplo espectro, atribuída principalmente a atividade do terpinen-4-ol. Estudos prévios avaliando microscopicamente cepas de *E. coli* submetidas ao TTO indicaram perdas de constituinte celular e coagulação de constituintes citoplasmáticos, perdas de íons potássio, assim, como inibição da respiração celular (CARSON et al., 2006; COX et al., 2000; HAMMER et al., 2011). Avaliações em cepas de *S. aureus* levantam hipóteses a respeito da ação do TTO levando em consideração múltiplas ações ao invés de uma ação isolada na parede celular. Porém sabe-se que a atividade do TTO está atribuída, principalmente a processos de desnaturação proteica alterando a estrutura e função da membrana celular (FALCI et al., 2015).

Os valores encontrados nos constituintes dos óleos essenciais podem variar segundo alguns fatores, como órgão de extração da planta, localização geográfica e diferenças entre espécies de uma mesma família (HAJDARI et al., 2015). Em um estudo realizado por Falci et al. (2015) a extração do óleo essencial de *Melaleuca* sp., originária do território Brasileiro apresentou uma maior presença do componente 1,8 cinaol, enquanto amostras de *M. alternifolia* com origem na Austrália, apresenta como constituinte principal o terpinen-4-ol com média de 40% enquanto o 1,8 cianole aparece em menor taxa, de aproximadamente 2%. Essas características são fundamentais para a determinação das atividades do óleo e seus componentes.

O terpinen-4-ol compreende 30-40% da composição do TTO, principal responsável pela atividade antimicrobiana atuando diretamente na membrana celular, alterando a integridade e fisiologia bacteriana (CARSON et al., 2006; HART et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011). Assim como o terpineno, alguns autores acreditam que a atividade antimicrobiana do TTO, também está correlacionada com a presença do componente 1,8-cianol, que indiretamente atua aumentando a permeabilidade da membrana ao TTO, facilitando a ação de outros agentes antimicrobianos (CARSON et al., 2002; HAMER et al., 2003; HART et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

Segundo normas regulamentadas pelo comitê Australiano o TTO por apresentar atividade antisséptica deve compreender valores de terpinen-4-ol e 1,8-cianol, acima de 30% e abaixo de 15%, respectivamente (INTERNATIONAL ORGANISATION STANDARDISATION, 2004).

3.5 ASSOCIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM PRODUTOS BIODEGRADÁVEIS

O aumento da preocupação com o meio ambiente tem impulsionado pesquisas para uma melhor utilização e reaproveitamento de fontes naturais para aquisição de produtos biodegradáveis (MORADI, 2012). A Utilização de biopolímeros a base de polissacarídeos e até proteínas têm aumentando devido a sua grande abundância na natureza, sustentabilidade e capacidade de formar uma matriz contínua (GONTARD., GUILBERT, 1993). Celulose, amido e quitosana são exemplos de polissacarídeos lineares que formam filmes resistentes, flexíveis e transparentes.

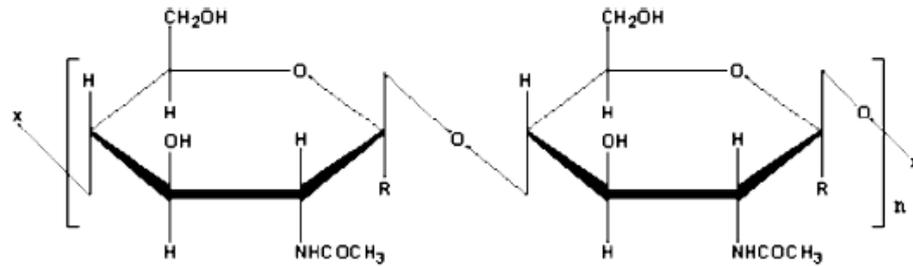
Componentes hidrofóbicos, como os OEs têm sido inseridos em matrizes hidrofílicas, a fim de melhorar a barreira de água ou potencializar a atividade antimicrobiana (SANCHEZ-GONZALEZ et al., 2010). A associação de OE à matriz polimérica pode favorecer a redução da difusão do OE, pois este passa a interagir com a estrutura química do polímero. A liberação do agente antimicrobiano, a exemplo dos OEs, dependerá de fatores, como a interação eletrostática entre o óleo e o polímero, osmose, alterações estruturais e condições do meio externo (AVILA-ROSA et al., 2012).

Na indústria alimentícia, a aplicação de biopolímeros, como quitosana, associados a óleos essenciais vêm sendo utilizadas como maneiras alternativas e rentáveis para estender a vida útil pós-colheita de frutos, hortaliças e peixes (GÓMEZ-ESTACA et al., 2010; XING et al., 2011). Estudos já demonstraram que a associação de óleos essenciais à quitosana tem sua atividade antimicrobiana aumentada (VU et al., 2011).

3.6 QUITINA E QUITOSANA

Com semelhança estrutural da celulose, a quitina é um polissacarídeo linear constituído por ligações (1-4)-N-acetil-glucosamina (Figura 5), diferenciada pela presença do grupo acetamina (-NHCOCH₃) no carbono-2 (ZAGAR, 2015). A quitina desempenha um importante papel na uniformização e proteção das paredes de alguns crustáceos, insetos e alguns fungos (DUMITRIU et al., 1996).

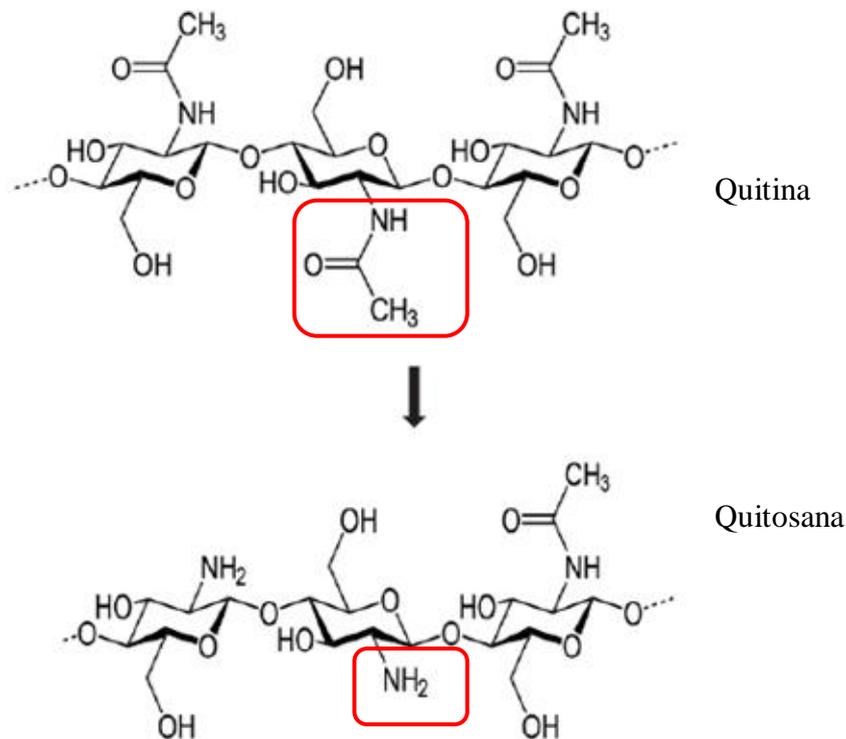
Figura 5 - Estrutura química da quitina



Fonte: Xing et al., 2014

Em crustáceos a quitina é encontrada em proporções variáveis entre 20-30%, dependendo da espécie e estação do ano (BADWAN et al., 2015; SILVA., SANTOS., FERREIRA, 2006). Naturalmente a quitina não se apresenta pura, pois está associada a algumas proteínas, minerais e pigmentos lipídicos, como carotenóides (AZUMA et al., 2015; RINAUDO et al., 2006). Por apresentar uma estrutura semi-cristalina com extensas pontes de hidrogênio, a quitina é altamente hidrofóbica (ZARGAR., ASGHARI., DASHTI, 2015). Em condições altamente alcalinas ou através de ações enzimáticas a quitina sofre desacetilação, ou seja, perda dos grupamentos -NHCOCH_3 (EL-SHERBINY., EL-BAZ et al., 2015) (Figura 6). Nessas condições específicas a estrutura química da quitina apresenta redução dos índices do grupamento amida $<50\%$ com simultâneo aumento na concentração do grupamento amina $(\text{-NH}) >50\%$, resultando na obtenção do copolímero de quitosana (LIU, et al., 2011; ZARGAR., ASGHARI., DASHTI, 2015).

Figura 6 - Processo de desacetilação da quitina



Fonte: Zagar., Asghari., Dashti, 2015

A estrutura química da quitosana apresenta variações entre resíduos N-acetilglucosamina e unidades D-glucosamina (EL-SHERBINY., EL-BAZ, et al., 2015). A presença de unidades ainda acetiladas na estrutura da quitosana sugere uma desacetilação parcial da quitina, que ocorre devido a interrupção do processo de deacetilação. Enquanto a quitina apresenta características por ser insolúvel a quitosana é altamente solúvel em soluções ácidas devido a presença de grupamentos amina livres com valor de pKa em 6,3 (KUMIRSKA et al., 2011). Em condições ácidas o grupamento amina torna-se protonado permitindo a solubilidade da quitosana, entretanto em situações com pH elevado as aminas adquirem carga negativa tornando a quitosana insolúvel (ZARGAR., ASGHARI., DASHTI, 2015). Além da faixa de pH, a solubilidade da quitosana está intimamente ligada a distribuição do grupamento acetil ao longo da cadeia determinado pelo grau de acetilação (GA), assim, como pelo peso molecular da quitosana (SARMENTO., DASNEVES, 2012). Comercialmente, a quitosana é definida pelo seu grau de desacetilação (GD) e pelo seu peso molecular, fatores correlacionados com as propriedades biológicas da quitosana (DASH, et al., 2011).

O GD é uma das características mais importantes da quitosana, influenciando principalmente na sua solubilidade (DAMIAN, et al., 2005; SANTOS., CIRILO., NUNES,

2011). O GD determina a quantidade de grupo amino presente no biopolímero (KUMAR, 2004). A partir do grau de desacetilação pode-se obter quitosana com características variáveis, propriedades físico-químicas diferentes, solubilidade, viscosidade, biodegradabilidade, atividade imunológica (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), assim como, propriedades mecânicas, formação de géis e filmes (ASSIS; SILVA, 2003). Quitosanas que apresentam maior GD apresentam maior taxa de compatibilidade, devido a presença de maiores concentrações de grupamento amina livre, responsável pela interação da quitosana com as células (ZHOU et al., 2011).

O estudo do grau de desacetilação pode ser realizado através de alguns métodos já protocolados, a exemplo da ressonância magnética nuclear (RMN) (MELO et al., 2006). Entretanto outras metodologias podem ser aplicadas na determinação do GD, como espectroscopia vibracional da região do infravermelho (IV), RMN ^{13}C e análise elementar.

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem não somente do grau de desacetilação, mas também da sua massa molar média. A viscosidade de soluções de quitosana aumenta segundo o aumento da concentração da amostra, diminuição da temperatura e aumento do grau de desacetilação (BEZERRA, 2011). Entretanto, a medida da viscosidade é um método não absoluto, mas muito utilizado para estimar a massa molar média de polímeros.

Segundo a massa molecular a quitosana pode ser classificada em baixo (100.000 g/mol), médio (500.000 g/mol) e alto peso molecular (1.000.000 g/mol) (DEE; RHODE; WACHTER, 2001). A viscosidade pode ser medida através da razão entre o tempo de escoamento da solução no viscosímetro e pelo tempo do escoamento do solvente puro pelo viscosímetro.

A quitosana apresenta três sítios ativos na sua estrutura molecular. O Primeiro, na região que compreende o grupamento amina, e mais dois grupos hidroxilas livres presente no resíduo glicosídico. O grupamento amina é responsável pela natureza catiônica da quitosana que fornece diferentes propriedades físico-químicas, assim como biológicas (EL-SHERBINY, et al., 2015), como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana, anticancerígena, e atividade imunológica (XING et al., 2014; KIM, et al., 2011; TOSHKOVA, et al., 2010).

A produção de quitosana vem aumentando gradativamente, devido a sua aplicação em diferentes ramos, como alimentos, quelação de metais e produção de membranas simétricas para separação de gases (DAMIAN et al., 2005). No Japão já é possível encontrar disponível comercialmente pele artificial de quitina, que pode ser aplicado em casos de queimaduras

superficiais, profundas ou de terceiro grau, além de outros tipos de lesões traumáticas, promovendo hemostasia, analgesia, e aceleração na cicatrização (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

3.6.1 Atividade Antimicrobiana

Dentre as inúmeras atividades biológicas que a quitina e quitosana apresentam a que mais se destaca é a sua atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de microorganismos como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, assim como capacidade de inibição e redução na produção de biofilmes característicos de algumas bactérias.

O mecanismo de inibição do crescimento ainda não é bem elucidado. Entretanto, estudos mais recentes propõem que a atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente ligada a sua característica catiônica, onde a presença de grupamentos amina de natureza catiônica interage com as cargas negativas presentes na membrana celular microbiana (JUNTER., THÉBAULT., LEBRUN, 2016; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). Em muitos estudos a quitosana é definida como tendo atividade bacteriostática ou bactericida, sem ser definida qual de fato é seu papel (GOT et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado que a atividade anti-biofilme da quitosana inclui inibição e redução de biofilmes já produzidos.

Zheng e Zhu (2003) demonstraram que para bactérias Gram-negativas a quitosana apresenta maior atividade antimicrobiana quando seu peso molecular é menor, um vez que a mesma apresenta um maior influxo nas células bacterianas, podendo associar-se a molécula de DNA e inibindo a síntese proteica dessas bactérias. Ainda segundo os autores para bactérias Gram-positivas quitosana de alto peso molar promove a formação de filmes ao redor das células bacterianas inibindo o aporte nutricional dessas células.

Na tentativa de esclarecer a ação antimicrobiana da quitosana foram propostas três teorias. A primeira teoria, e atualmente a mais aceita, baseia-se na interação iônica na superfície da célula bacteriana. Acredita-se que ocorra uma interação entre a molécula de quitosana, carregada positivamente, e as cargas negativas da célula. Esta interação, promove alterações na permeabilidade da parede celular promovendo distúrbios osmóticos ou a hidrólise de peptidoglicanos da membrana plasmática (KONG et al., 2010).

A segunda teoria atualmente aceita é a inibição da síntese de RNAm, onde ocorre a interação do biopolímero quitosana de baixo peso com o DNA que inibe a síntese proteica (PEDRO et al., 2009).

Em sua constituição molecular o grupamento amino da quitosana é o responsável pela quelação de metais. Dessa forma, acredita-se que a quitosana atue como barreira entre o microorganismo e o meio externo, atuando como agente quelante, removendo metais e diminuindo o aporte nutricional essencial para o crescimento microbiano (WANG et al., 2009), sendo esta a terceira teoria proposta para elucidar a atividade antimicrobiana do polímero quitosana. Segundo Goy et al. (2009), é possível que os três mecanismos possam estar envolvidos simultaneamente, entretanto em intensidades diferentes.

3.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

A associação de antibióticos no auxílio terapêutico se tornou uma prática comum na clínica médica e farmacêutica, com o intuito de favorecer alguns mecanismos como aumento do espectro de ação do antimicrobiano, redução da resistência, diminuição da toxicidade e promoção de sinergismo (ELIOPOLUS., ELIOPOLUS, 1998).

Os medicamentos podem interagir durante o preparo; no momento da absorção, eliminação ou durante a ligação com receptores específicos. Tendo em vista esses diferentes momentos, o mecanismo envolvido durante a interação das substâncias pode ser classificado em farmacêuticas, farmacocinética e farmacodinâmica (SECOLI, 2001).

As interações farmacêuticas ocorrem quando dois ou mais medicamentos são associados em uma mesma solução, ocorrendo interações do tipo físico-químicas acarretando alterações farmacológicas sendo essas, sinérgicas, indiferentes ou antagônicas.

O sinergismo ocorre quando um medicamento é capaz de intensificar a ação de outro, neste caso pode ocorrer uma potencialização do efeito medicamentoso, onde é possível coexistir efeitos de ambos os componentes. Interações medicamentosas indiferentes ocorre quando associação entre um ou mais compostos não resulta positivamente nem negativamente. Por outro lado, há associações entre medicamentos capazes de diminuir ou bloquear os efeitos de um ou mais compostos empregados na fórmula, neste caso há uma inibição ou um antagonismo entre os medicamentos aplicados (OLIVEIRA, 1986).

Nos momentos atuais de resistência antibiótica, pesquisas a respeito de produtos naturais com atividade antibiótica e suas possíveis associações têm sido uma interessante alternativa (MEDEIROS, 2012).

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 OBTENÇÃO DA MISTURA DE QUITOSANA DE ALTO MAIS BAIXO PESO MOLAR

Neste estudo foram utilizadas quitosana de crustáceos de alto peso molar e quitosana de baixo peso molar, ambas obtidas através da empresa Sigma®. As quitosana foram misturadas em uma proporção de 1:1 e diluídas em ácido acético 1% para obtenção de quitosana a 20mg/mL. A solução da mistura foi agitada por 12h e em seguida a quitosana formada foi precipitada com a adição de hidróxido de sódio 10N até atingir de pH 9. Em seguida a solução foi centrifugada a 4000rpm por 15min a quitosana precipitada foi lavada com água destilada e o pH estabilizado em 7. A amostra final de quitosana alto + baixo peso molar (Quitosana QAB), foi liofilizada e caracterizada.

4.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternitifolia* (TTO)

O óleo essencial de *Melaleuca alternitifolia*, adquirido pela empresa Ferquima® foi avaliado pela empresa para as exigências descritas na ISSO 4730-2004. A análise cromatográfica do TTO demonstrou 10 picos característicos do óleo essencial de melaleuca, obtendo como componentes majoritários o terpinen-4-ol (42,10%), alpha-terpinene (10,40%) e 1,8 cianole (1,60%). Os resultados foram comparados com os descritos na literatura (Tabela 2).

Para melhor aplicabilidade e manuseio do TTO, o óleo foi primeiramente diluído em Tween 80, obtendo uma concentração inicial de 75% do óleo TTO onde foi utilizado em posteriores diluições. Para os ensaios *in vitro* novas diluições foram realizadas a partir do TTO em Tween 80 a 75%, empregando água destilada para a obtenção de novas concentrações, 10% e 5%, em um volume final de 4mL.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO	LITERATURA
ALPHA-PINENO	2,7%	3% ¹
SABINENO	0,26%	0,4% ²
ALPHA-TERPINENO	10,40%	9,85% ¹
PARA-CYMENO	1,60%	2,2% ³
LIMONENO	1,90%	0,8% ²
1.8-CINEOLE	1,60%	2,7% ⁴
GAMMA-TERPINENO	22,40%	20,15% ¹
TERPINOLENO	3,40%	3,4% ⁴
TERPINENO-4-OL	42,10%	41,98% ¹
ALPHA-TRPINEOL	4,50%	8,95% ³

(1) D'arriago, M. et al., (2010); (2) Cuaron, J. et al., (2014); (3) Falti, S. et al., (2015); Thomsen, N. (2014)

4.3 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA DE ALTO E BAIXO PESO MOLAR

A quitosana QAB liofilizada obtida no tópico 4.1 foi pesada e posteriormente diluída em ácido acético 1%, sob agitação média *overnight*. O pH do gel de quitosana foi ajustado para próximo de 6,0 com adição de hidróxido de sódio 2N.

As amostras foram preparadas para uma concentração final de 20mg/mL. Para o estudo da atividade antimicrobiana a quitosana QAB foi novamete diluída para um concentração de 10 mg/mL, sendo esta a concentração inicia para o estudo.

4.4 PREPARAÇÃO DO GEL DE QUITOSANA ASSOCIADO AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternitifolia*

A preparação do gel de quitosana QAB associado ao TTO foi realizada através da homogeneização da quitosana QAB 20mg/mL com o TTO previamente diluído para 10%, na proporção de 1:1. Dessa forma obtendo na formulação concentrações finais de 10 mg/mL e 5% para a quitosana e TTO, respectivamente.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA DE ALTO MAIS BAIXO PESO MOLAR

A caracterização estrutural da quitosana QAB foi realizada por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV). Também foi determinado o grau de desacetilação utilizando técnica de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H). A cristalinidade foi observada através da difração de raio-X (DR-X). O peso molar da quitosana foi determinado por viscosidade.

4.5.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho

Para determinação das características estruturais da quitosana, de alto e de baixo peso molar obtida, foi realizada a técnica da Espectroscopia vibracional na região do infravermelho, segundo a metodologia de Santos et al. (2003) em um espectrofotômetro BRUKER Mod.IFS 66, na região entre 4000cm^{-1} e 400cm^{-1} .

A quitosana (1,5 mg) foi seca em estufa a vácuo durante 15 horas a 60°C . Depois, 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 da quitosana foi obtido utilizando pastilha de KBr como suporte. A medida foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.5.2 Grau de Desacetilação: Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Um importante parâmetro para a caracterização da quitina e quitosana é o seu grau de desacetilação (GD), sendo definido como sendo o número de grupo amina (quitosana) em relação ao número de grupo amida (quitina). Diversos métodos já foram descritos para obtenção do GD, como espectrometria no infravermelho, ultravioleta, análise elementar, ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e RMN ^{13}C . A obtenção do GD a partir dos espectros do infravermelho apenas é possível com o cálculo correto das linhas de base, podendo sofrer divergências quando não interpretada corretamente (RINAUDO, 2006; YOUNES et al., 2015). Sendo atualmente a técnica RMN ^1H mais aplicada para obtenção da GD de amostras solúveis.

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por Ressonância Magnética Nuclear, na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, segundo metodologia descrita por Signini et al. (2000).

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 40 °C, tempo de relaxação de 6 segundos, aquisição dos espectros a 353K, com pulso de 90° (8,2 ms) e 16 pulsos de varredura.

O GD 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}).

(Eq. 1)

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

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).

(Eq.2)

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

4.5.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X

A técnica de difração de Raio-X (DR-X) das amostras de quitosana foi realizada no Laboratório Multiusuário do Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE), obedecendo os parâmetros: 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.

4.6 DETERMINAÇÃO DO PESP MOLAR POR ANÁLISE VISCOSIMÉTRICA

O peso molecular da 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) termostatizado a (25± 0,01)°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.

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

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).

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

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).

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

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.

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

4.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 29213. Foram avaliados o gel de quitosana, o TTO e a composição quitosana associada ao TTO, frentes a esses microorganismos através do teste de microdiluição.

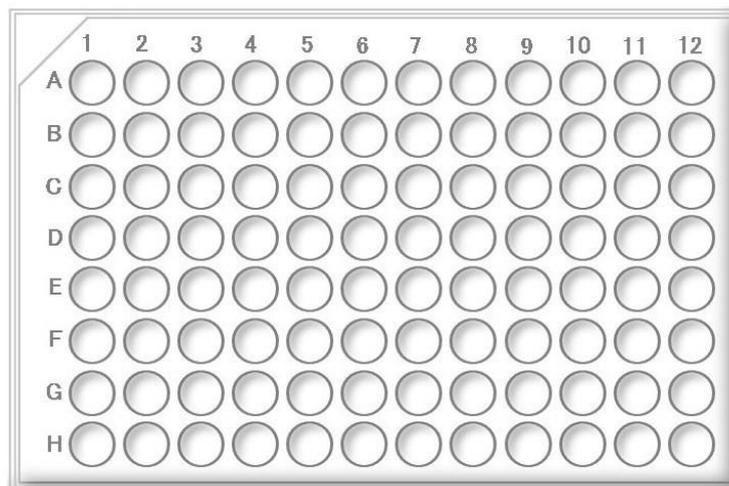
As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram repicadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e armazenadas a 37°C por 24 horas. Após este período, uma alíquota de cada cepa foi transferida para tubos de ensaio contendo BHI para posterior medição da absorbância em

espectrofotômetro com faixa de leitura 540nm. As cepas foram padronizadas para próximo de 10^6 UFC.

4.7.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Através do teste de microdiluição em placa de 96 poços (Figura 7) foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas das substâncias testes, gel de quitosana QAB, TTO e gel de quitosana QAB associado ao TTO. As microplacas foram preparadas de forma que cada compartimento apresentava um volume final de 100 μ L, com proporções variadas do meio de cultura BHI e das substâncias testes. As concentrações do TTO e da quitosana QAB, após adição aos poços marcados de A a H, variaram entre atingindo ao final diferentes 27 mg/mL a 2,25 mg/mL para o TTO e para a quitosana QAB em 6mg/mL a 0,5 mg/mL.

Figura 7- Representação esquemática de uma microplaca com 96 poços.



Para o controle de esterilidade foram adicionados 100 μ L do meio; para o controle de crescimento 80 μ L do meio. A todos os poços foram adicionados 20 μ L do inoculo microbiano, com exceção do controle de esterilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram armazenadas em estufas, para crescimento em temperatura de 37°C por 24h. Após período de incubação, para determinação do CIM, foram adicionados 30 μ L de resazurina 0,01% nos poços ímpares. Após 1 hora foi feita a análise da mudança de cor.

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 resofurina, 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.

4.7.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

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

4.8 ANÁLISE DA FRAÇÃO INIBITÓRIA OU *FRACTION INHIBITORY CONCENTRATION* (FIC)

A análise da combinação entre a quitosana e o TTO 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 MIC. O cálculo foi obtido segundo equação abaixo (Equação 7).

	Índice da amostra Quitosana QAB	Índice da amostra TTO
(Eq. 7)	$\text{FIC (I): } \frac{\text{MIC A na combinação}}{\text{MIC A do composto isolado}}$	$\text{FIC (II): } \frac{\text{MIC B na combinação}}{\text{MIC B do composto isolado}}$

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

4.9 PLANEJAMENTO FATORIAL 2²

O planejamento fatorial 2², consiste em avaliar todas as possíveis combinações entre o TTO e o gel de quitosana QAB. Foi empregado neste estudo três concentrações abaixo do CBM, para o TTO e gel de quitosana QAB (Tabela 3). Este experimento foi realizado em duplicada e o conjunto estatístico foi avaliado pelo programa Statistica 7.

Tabela 3- Concentrações do TTO e do gel de quitosana QAB utilizados no planejamento fatorial

	(-)	(0)	(+)
TTO	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

4.10 TESTE DE IRRITABILIDADE – *Hen'sEgg Test on The Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM)

Para avaliar o grau de irritabilidade das substâncias testes foi empregado a metodologia de HET-CAM descrita segundo Steiling et al (1999). Uma vez que a membrana corioalantoide do ovo de galinha fecundado compreende uma vasculatura funcional, o teste 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 substância teste sobre os vasos sanguíneos e as proteínas presentes na CAM são similares aos efeitos induzidos pela mesma substância no teste de olho de coelho, enquanto que oferece as vantagens de uma forma universalmente mais aceitável como um teste não-animal e pode ser concluída mais rapidamente. HET-CAM tem várias vantagens, incluindo a sua simplicidade, rapidez, sensibilidade, facilidade de execução e ser relativamente barata (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, pelo menos, para a predição de substâncias irritantes graves (STEILING et al, 1999). As leis que regulam a experimentação animal permitem protocolos com embriões de galinha sem autorização dos comites de experimentação animal, no entanto, no Reino Unido, a lei britânica Animal Welfare (1986) afirma que a idade de ovos com embriões deve ser de no máximo 10 dias de gestação para ser usado como um teste não animal barato (BAGLEY., WATERS., KONG, 1994; LUEPKE, 1985; VARGAS et al, 2007).

Para execução do teste foram utilizados ovos de galinha fecundados e incubados por 10 dias. No décimo dia de incubação a membrana corioalantóide do ovo foi exposta e umedecida com solução salina a 0,9%, facilitando a visualização dos vasos sanguíneos. Alíquotas de 200 µL de cada substância teste, TTO, gel de quitosana QAB e gel de quitosana QAB associado ao TTO, foram aplicados, separadamente, sobre a membrana corioalantóide

do ovo fertilizado, sendo o procedimento repetido cinco vezes por amostras. Durante 5 minutos foram avaliados possíveis efeitos irritantes, como: Hemorragia, lise e coagulação com o tempo de surgimento observado em segundos. De acordo com a equação 8 foi possível obter o grau de irritação de cada amostra, sendo calculada a média e desvio padrão das amostras.

$$(Eq\ 8) \quad \frac{(301 - \text{Hemorragia}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{Lise}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{Coagulação}) \times 9}{300}$$

As amostras foram classificadas como não irritante, ligeiramente irritante, irritante e muito irritante, de acordo como mostra a tabela 4.

Tabela 4- Classificação dos níveis de irritabilidade segundo metodologia do 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 DE ALTO + BAIXO PESO MOLAR

5.1.1 Caracterização Estrutural: Espectroscopia vibracional da região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho possibilita a identificação de compostos através da identificação de picos de absorção, técnica comumente aplicada na análise qualitativa de compostos orgânicos (LOPES., FASCIO, 2008). As bandas presentes no espectrograma são relativas às vibrações características de grupos funcionais presentes na molécula. A figura 8 representa o espectro de infravermelho da associação entre quitosana Sigma® de alto + baixo peso molar. A tabela 5 mostra as bandas observadas e suas correlações.

Figura 8- Espectroscopia na região do infravermelho da amostra quitosana QAB

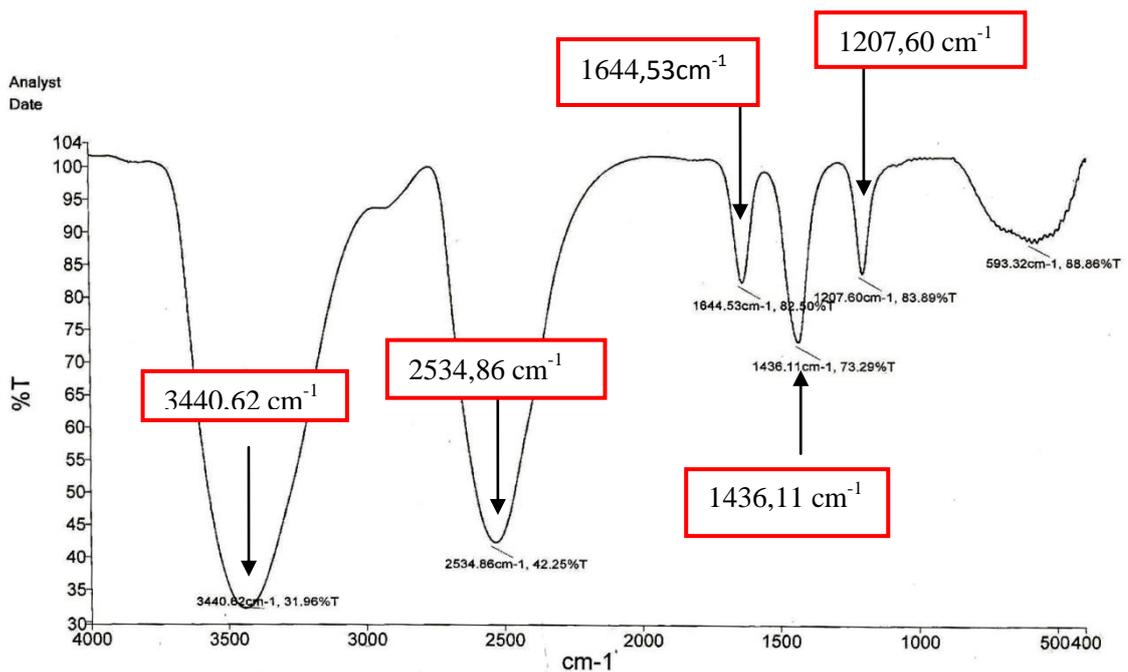


Tabela 5- Associação entre o comprimento de onda e os grupos funcionais

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tentativas de Atribuições
3490-3400	Estiramento O-H
3200-2500	$\nu_{\text{O-H}}$ (amina) δ_{NH}
1644	(amida I) $\nu_{\text{C=O}}$
1400-1660	(Amida) $\nu_{\text{C-N}}$
900-1380	$(-\text{CH}_2-\text{OH})_{\text{C-O}}$
594	Deformação da estrutura do anel aromático

Fonte: Adaptado de Jin & Lin (2002).

O espectro da associação entre quitosana de alto mais baixo peso molar (QAB), foi obtido na região espectral de 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} . A quitosana QAB apresentou pico característico na faixa de $3000-3500\text{cm}^{-1}$ atribuído ao estiramento O-H, sobreposta a deformação axial do grupo N-H, como também observado por RAGHAVENDRA, et al., 2016. Segundo Kumar-Krishanan et al. (2015) a presença do grupamento C=O da amida I é observada pelo número de onda 1643cm^{-1} valor semelhante ao encontrado na amostra de quitosana QAB que foi de 1644cm^{-1} . A presença do pico referente à amida I indica que a amostra de quitosana ainda apresenta anéis piranosídicos acetilados, não estando totalmente desacetilada (STAMFORD et al, 2013; XIAO et al., 2015).

O pico 1436cm^{-1} representa o modo vibracional da ligação C-N (amida), na literatura os valores encontrados para a deformação axial da amida é de aproximadamente 1425cm^{-1} . O estiramento do grupo alcoólico primário $(-\text{CH}_2-\text{OH})_{\text{C-O}}$ identificado através da região vibracional 1207cm^{-1} , pode apresentar número de onda variável, entre $1320-100\text{cm}^{-1}$. A banda larga em 594cm^{-1} está relacionado com a deformação estrutural do anel aromático. (SANTOS et al., 2003).

A absorção forte na região 2534cm^{-1} é resultante da superposição das bandas de deformação axial de O-H e NH_3^+ . Não foi observado, ainda, na literatura a presença dessa banda nos estudos de caracterização da quitina e quitosana. A associação entre quitosanas de alto e baixo peso molar pode ter induzido um rearranjo molecular na estrutura da quitosana. A existência de grupos aminas livres (NH_2^+) no carbono 2 da D-glucosamina, assim, como o elevado número de grupos hidroxilas (OH-) permitem reações específicas intermoleculares

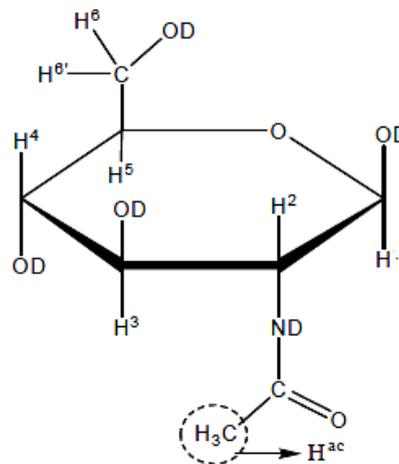
como pontes de hidrogênio, quando em condições homogêneas (YONG et al., 2015; YOUNES et al., 2015).

O IV é uma técnica útil para comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila presentes na quitina, onde se pode observar uma redução da região da amida I e um aumento na deformação axial do grupamento amina.

5.1.2 Grau de Desacetilação: Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear se baseia no valor de *spin* presente em cada núcleo atômico, podendo ser hidrogênio, carbono (AMATHIEU et al., 2015). Para o estudo e análise do GD das amostras de quitosana alta mais quitosana de baixo peso molar foi empregado a metodologia do RMN ^1H . A obtenção do GD por RMN ^1H , relaciona os valores do deslocamento químico dos diferentes prótons presente na estrutura da quitina ou quitosana (Figura 9).

Figura 9- Esquema da quitina com numeração de prótons visualizados no RMN ^1H



Fonte: Anjos, 2005

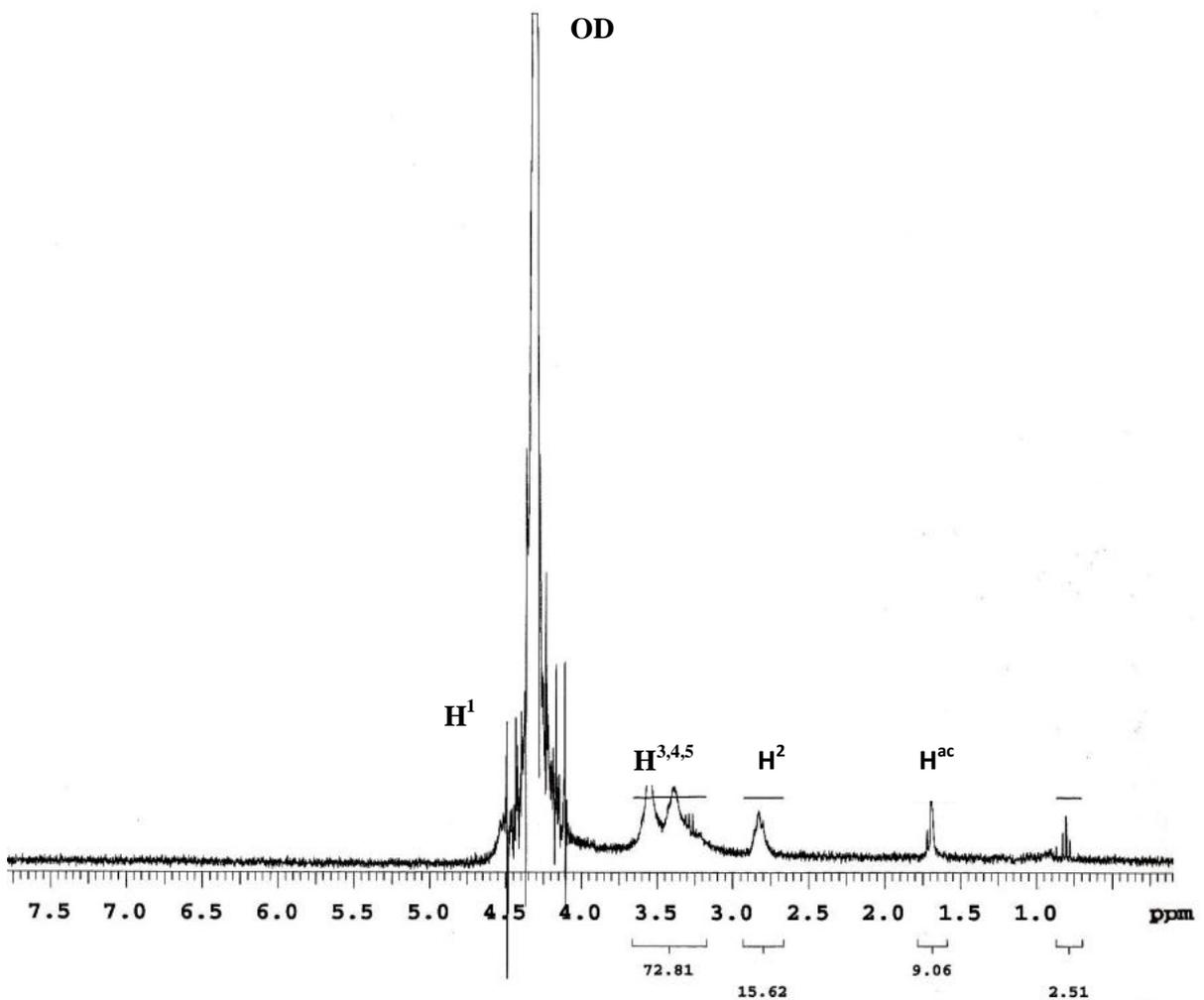
A utilização de uma solução de ácido clorídrico deuterada faz-se necessário, bem como que a amostra seja analisada a uma temperatura de 50°C , entretanto neste trabalho a leitura foi realizada a uma temperatura de 40°C não sendo observada nenhuma alteração. A figura 9 mostra os espectros de RMN ^1H da associação entre as quitosanas (QAB). Na tabela 5 estão representando os principais picos com suas respectivas atribuições.

O GD (%) da amostra QAB foi obtido através da equação proposta por Signini et al. (2000) (Equação 9), que utiliza as áreas do pico referente aos núcleos de hidrogênio do grupo acetoamida (H^{ac}) e a área do pico referente ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicopiranosídico (H^2).

Tabela 6- Interação dos picos do espectro de RMN¹H

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

Figura 10- Espectroscopia do RMN H quitosana QAB



$$\text{(Eq. 9)} \quad \text{GD (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{\text{Hac}}{3 \text{ Hz}} \right) \right\} \times 100$$

Os núcleos dos prótons de hidrogênio do grupo acetamina (H^{ac}) e do carbono 2 do anel glicopiranosídicos (H^2), estão com pouca interferência do pico do deutério (OD). O GD (%) para a QAB em estudo foi de 80,66%.

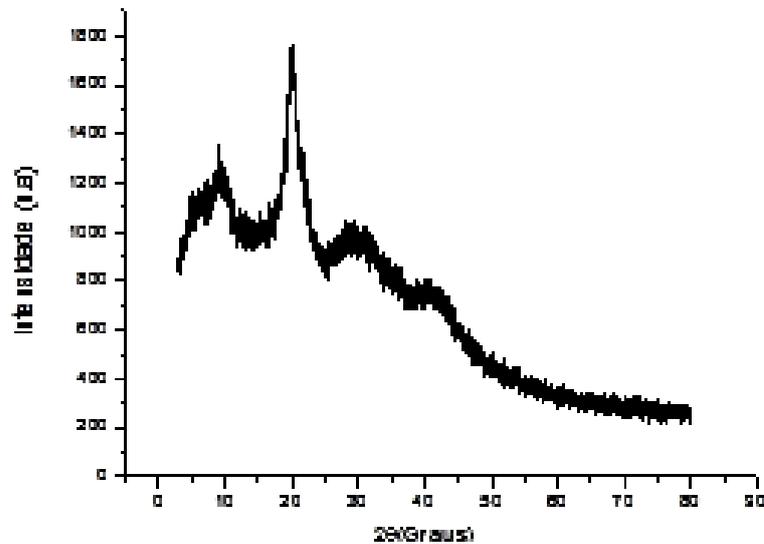
As propriedades químicas e físicas presente na quitosana estão intimamente correlacionadas com o peso molecular e seu grau de desacetilação (YOUNG et al., 2015). Segundo Foster et al. (2015) o grau de desacetilação está correlacionado com a biocompatibilidade do material, onde quitosanas com GD (%) entre 72 – 73% apresentaram baixa atividade mitocondrial e baixa atividade de crescimento celular em culturas de células, quando comparadas a quitosanas com GD(%) 75- 85%.

5.1.3 Cristalinidade: Difração de Raio-X

A figura 10 representa o difratograma de raios-X da quitosana QAB. É possível observar duas regiões, uma menor $2\Theta = 10^\circ$ atribuída a região amorfa, e outra região em $2\Theta = 20^\circ$ mais intenso e predominante, atribuído à região cristalina (KUMIRSKA et al., 2011;). Segundo Kaczmarek et al. (2010), a presença característica de ambas as regiões evidenciam uma cristalinidade parcial da amostra de quitosana. Fortes interações inter e intramolecular, formadas entre os grupos aminos, hidroxila e amida, promovem uma organização de caráter cristalino (SILVA et al., 2014).

A difração de raios-X, é uma técnica também empregada para determinar o grau de desacetilação, entretanto não é considerada a técnica mais adequada. Segundo Gámiz-Gonzales et al. (2015) a cristalinidade do polímero quitosana pode ser modificada através de diferentes concentrações de grupo acetil, reorganizando a estrutura cristalina da quitosana. Interações de moléculas de água também apresentam importantes influências na estrutura cristalina da quitosana. De acordo com Okuyama et al. (1997) o pico presente em 10° , geralmente, está atribuído a interações da molécula de água a estrutura cristalina da molécula.

Figura 11- Difratoograma da Quitosana 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 podem influenciar nas suas características, a exemplo da viscosidade (THARANATHAN et al., 2003).

A viscosidade polimérica é a medida do volume hidrodinâmico do polímero em solução. O tamanho das moléculas presentes no polímero influencia 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 polimérica é resultante de um comparativo entre o tempo de escoamento do solvente com o tempo de escoamento da solução polimérica, em concentração e temperatura determinada.

A determinação da massa molar da quitosana QAB utilizando a viscosidade tem como princípio a utilização dos 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 (Tabela 7) na equação 3 representada no tópico 4.6, página 34.

Tabela 7- Valores da concentração da quitosana QAB estuda, tempo de escoamento, e média dos tempos (minutos) para cada concentração da quitosana QAB 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 intrínseca está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, através da equação de Mark-Houwink (Equação 10). Os valores das constantes K e a empregados na equação VII (Tabela 8), dependem do polímero e do solvente empregado. O valor de b presente na equação é derivado da equação linear acima (Equação VI), obtida através da viscosidade relativa.

$$\text{(Eq 10)} \quad MV: (b/K)^{1/a}$$

Tabela 8- Valores referentes constantes K e a utilizadas na equação de Mark- Houwink

Valores	K	a
ácido clorídrico	$1,81 \times 10^{-5}$	0,93

Como resultado obtido, a quitosana QAB no presente trabalho apresentou massa molar viscosimétrica de $6,03 \times 10^4$, sendo considerada de baixo peso molar. Segundo alguns autores a atividade antimicrobiana da quitosana está correlacionada com o peso molecular da mesma (CAO., SUN, 2009; GANAN et al., 2009; LIU et al., 2006; TAYEL et al., 2010). Quitosanas de baixo peso molar apresenta uma maior concentração de derivados com maior solubilidade, apresentando uma maior atividade bacteriostática. Goy et al. (2009), sugerem que o polímero quitosana de menor massa molar apresenta uma maior facilidade para atravessar a parede

celular de algumas bactérias e fungos, alterando componentes vitais e conseqüentemente a atividade fisiológica das células.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

No presente estudo o CIM para as cepas *S.aureus* e *E. coli* foram obtidos através do método de microdiluição iniciando o teste com concentrações iniciais, para TTO e quitosana QAB de 27 mg/mL e 6mg/mL (Tabela 9), respectivamente. Essas concentrações iniciais também foram empregadas na associação quitosana QAB+TTO. A placa de 96 poços foi dividida para as duas cepas, permanecendo os poços de 1 a 6 para *S.aureus* e 7 a 12 para *E.coli*.

No presente estudo o TTO apresentou variação de CIM entre 13,5 mg/mL a 22,5 mg/mL, frente as cepas estudadas, quando não associado a quitosana QAB. É possível encontrar na literatura variações de CIM para o TTO entre os 0,125 a 2% (HAMER et al., 2011). Em valores de titulação o TTO apresentou, neste trabalho, CIM entre 1% a 2,5%, estando na faixa de atividade afirmada por Hammer, et al. (2011), como os melhores resultados frente a cepas de *S. aureus*.

Segundo Okoh et al. (2010), os óleos essenciais apresentam melhores atividades antimicrobianas frente a cepas gram-positivas e gram-negativas. A parede celular de bactérias gram-positivas apresentam regiões lipofílicas localizadas nas porções terminais dos ácidos lipoteicóicos, esta estrutura membranar facilita a interação dos componentes hidrofóbicos presentes nos óleos essenciais (COX et al., 2000). Por outro lado, a membrana externa presente na estrutura da parede celular de bactérias gram-negativas é constituída por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos, cujas estruturas possibilitam uma menor taxa de difusão dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais (BURT et al., 2004; TONGNUANCHAN et al., 2014), resultando em uma menor taxa de atividade dos OEs.

No presente trabalho os valores de CIM apresentados pelo TTO, frente as cepas estudadas, foram superiores aos encontrados por Scazzocchio et al. (2015) que obteve MIC de 6,25 mg/mL para cepas *S. aureus* e *E. coli*. Segundo Seow et al. (2015) alguns fatores, como agentes emulsificantes empregados na diluição do óleo podem influenciar nos teste de atividade antimicrobiana por microdiluição.

Tabela 9- Atividade antimicrobiana da quitosana de alto e baixo peso molar (QAB), do óleo essencial de melaleuca/ Tea Tree (TTO) e da associação entre QAB e TTO para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Cepas testes	CIM			CBM		
	QAB*	TTO*	QAB*/ TTO*	QAB*	TTO*	QAB*/ TTO*
<i>S. aureus</i>	4	13,5	3 / 13,5	4	13,5	2 / 9
<i>E. coli</i>	2	22,5	1,5 / 6,75	2	9	3 / 13,5

*Valores descritos em mg/mL

O TTO em sua composição apresenta um elevado número de constituintes com caráter hidrofóbico, sendo o 1,8 cianole o mais solúvel em água, porém presente em menor taxa. Devido as essas características é fundamental o uso de agentes emulsificantes ou solventes que possam permitir melhor solubilidade em água, como exemplo o DMSO, Tween 80 e Tween 20 (SEOW et al., 2015). Entretanto, a adição desses componentes aos óleos essenciais podem modificar as características químicas e físicas do óleo (CHALOVA et al., 2010). Segundo Hammer, et al. (1999) o Tween 80 ao ser associado ao TTO promove uma ação aditiva na atividade antimicrobiana do óleo. Por outro lado, alguns estudos indicam uma ação antagonica do Tween 80 a atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais (CHALOVA et al., 2010). Esta teoria é justificada pela ação emulsificante que o Tween 80 apresenta, formando micelas ao redor de moléculas lipofílicas, que comprometem a exposição e ação dos componentes bioativos presente nos óleos (SEOW, et al., 2013), diminuindo, assim, a atividade antimicrobiana do OEs frente alguns microorganismos.

O CIM para a quitosana QAB sem estar associado ao TTO foi de 4mg/mL e 2 mg/mL para cepas *S.aureus* e *E. coli*, respectivamente. A Quitosana é um copolímero da quitina, obtido por processos de desacetilação química da quitina ou através de extração da parede celular de alguns fungos porém com menor taxa de extração. A quitosana já é amplamente conhecida por apresentar atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos (KANNAT et al., 2013). Entretanto, o processo de atuação ainda não é amplamente conhecido. A atividade antimicrobiana da quitosana pode ser explicada através da interação dos grupamentos amina, presente no Carbono 2 do anel glicopiranosídico, com a superfície celular bacteriana, naturalmente eletronegativa, provocando alterações na permeabilidade celular que induzem a perda de eletrólitos e constituintes proteicos essenciais (SEVERINO, et al., 2014). Outra

hipótese é a depleção de Ca^{++} nos sítios aniônicos nas membranas (SENEL, et al., 2000; STAMFORD, et al., 2013).

Segundo Kong, et al. (2010) a atividade antimicrobiana da quitosana está associada a alguns fatores, divididos em quatro categorias, sendo (1) fatores microbianos- espécie de microorganismos e fator idade da célula, (2) fatores intrínsecos da quitosana – GD, peso molar, características hidrofílicas e hidrofóbicas, (3) estado físico da quitosana, e (4) fatores ambientais, pH, temperatura, e tempo.

O grau de desacetilação é um dos principais fatores capaz de modificar a atividade antimicrobiana, uma vez que sua definição está relacionada a uma maior presença de grupos aminas. Quitosanas com alto grau de desacetilação, aproximadamente, 97% conferem maior atividade antimicrobiana do que quitosanas com GD de 83%, contra cepas *S. aureus*, segundo um estudo realizado por KONG, et al. 2008. Outro fator também diretamente relacionado com a atividade antimicrobiana da quitosana é o peso molecular que alteram a estrutura conformacional da quitosana, uma vez que as unidades *N*-acetilglucosamina é modificada.

Alguns autores, relacionam o peso molecular da quitosana as características antibacterianas (STAMFORD, 2013). Em um estudo guiado por Chung et al. (2007) a quitosana apresenta melhor atividade em cepas gram-negativas, o mesmo foi observado no presente trabalho para cepas de *E. coli* com CIM de 2 mg/mL. De acordo com o autor, quitosanas de baixo peso molecular apresentam melhor influxo em cepas gram-negativas causando alterações no metabolismo bacteriano. Por outro lado, em bactérias gram-positivas como *S. aureus* quitosanas com alto peso molecular impedem a absorção de nutrientes pela célula bacteriana, formando um filme ao redor da célula (KONG, et al., 2010; STAMFORD, et al., 2013).

A associação entre as substâncias testes apresentaram CIMs diferentes aos obtidos quando isolados. O CIM para o TTO em cepas *S. aureus* permaneceu inalterado, estabilizando em 13,5 mg/mL, no entanto o CIM para a quitosana QAB decaiu para 3 mg/mL. Para as cepas *E. coli* o CIM de ambas as substâncias teste tiveram seus valores reduzidos para 6,75 mg/mL e 1,5 mg/mL, para o TTO e quitosana QAB, respectivamente. Neste estudo a associação entre TTO e quitosana QAB demonstrou significativa redução dos níveis de TTO necessários para causar a morte de cepas *E. coli*, sendo requerido uma dose 5 vezes menor quando comparado a sua ação isolada para mesma cepa. Segundo Shen & Kaden (2010), a associação entre quitosana e óleos essenciais promovem fortes interações moleculares, por apresentar características de médio a baixo peso molar. A quitosana QAB pode ter atuado como veículo carreador do TTO, facilitando o influxo do óleo através da membrana externa da *E. coli*. Uma

vez que o TTO não associado a quitosana não conseguiria transpor esta barreira hidrofílica, em baixas concentrações.

Os valores para o CBM, representados na Tabela 9, foram obtidos a partir da leitura em placa de *petri* e seu resultado foi semelhante aos obtidos pelo CIM, onde o TTO e a quitosana QAB apresentaram atividade bactericida para ambas as cepas, enquanto a associação entre os compostos apresentou atividade bacteriostática e bactericida para *E. coli* e *S. aureus*.

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 foram realizadas 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 não houve influência no crescimento microbiano de *E. coli* e *S. aureus*. Analisando o TTO, o óleo não apresentou influência no crescimento para *E. coli* mas apresentou influência positiva para *S. aureus*, nas concentrações utilizadas.

A associação entre ambos os componentes demonstrou influência negativa para *E. coli* e influência positiva para as cepas de *S. aureus*, porém em menor taxa do que os componentes isolados.

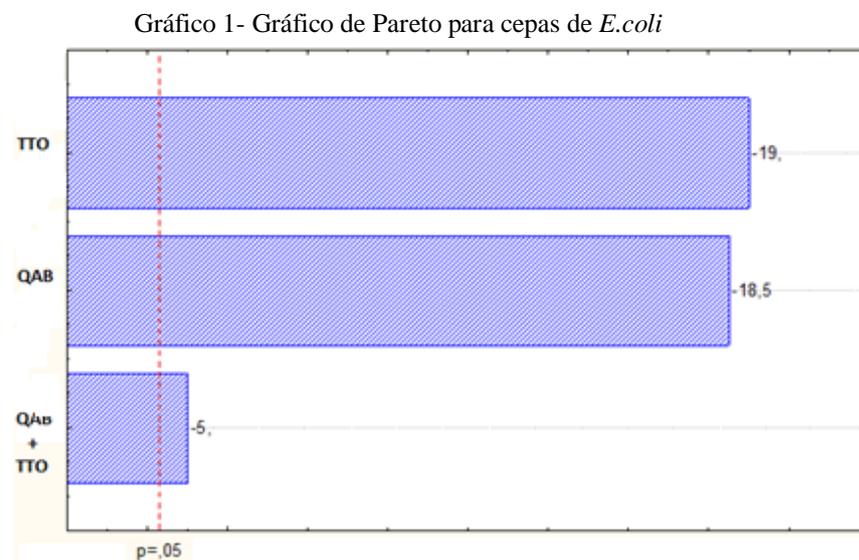
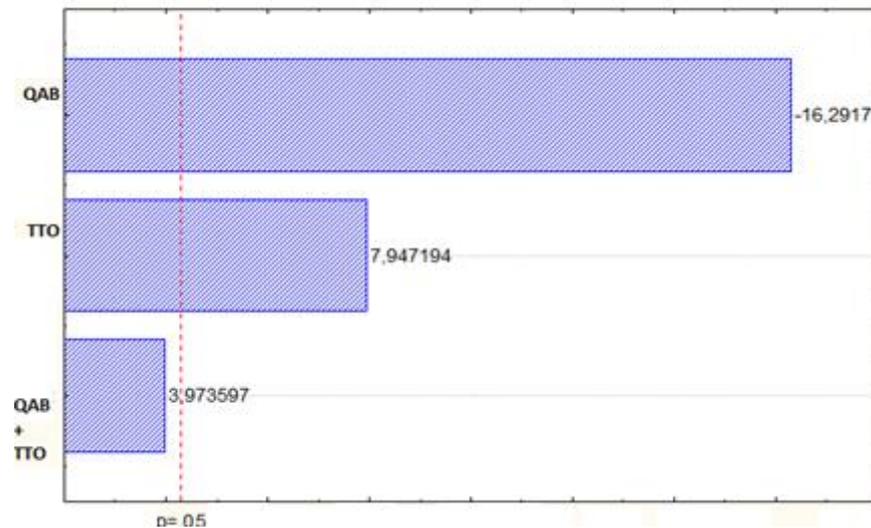


Gráfico 2- Gráfico de Pareto para cepas de *S.aureus*

Para os valores de FIC, obtidos a partir dos valores CIM foram obtidos de acordo com a equação descrita no tópico 8.3 da 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)

As substâncias testes foram avaliadas separadamente quanto o seu grau de irritabilidade. Para cada amostra foram realizadas cinco medições de tempo avaliando o surgimento característico de lise, hemorragia e coagulação (Tabela 10). Os valores do tempo em segundos foram adicionados na equação descrita no tópico 2.10 da metodologia a fim de avaliar o potencial de irritabilidade.

O TTO a 1% apresentou taxa de irritação de 9,57, como mostra a Tabela 10. Este resultado indica que o TTO1% apresentou elevado poder irritante. Alguns estudos

correlacionam a presença do composto 1,8 cianole aos possíveis quadros irritantes (HAMMER, et al., 2006; CARSON, et al., 2006).

Tabela 10- Determinação do potencial de irritação pela presença dos parâmetros lise, hemorragia coagulação da quitosana de alto e médio peso molar (QAB), óleo essencial de *Melaleuca alterifolia* 1% (TTO) e associação entre as substâncias QAB + TTO 1% pelo teste da membrana corioalontóide do ovo. Controle positivo: lauril sulfato de sodio 1% (LSS1%).

Parâmetros de Irritabilidade da HET-CAM	Substâncias testes			
	TTO 1%	QAB	Associação QAB + TTO	LSS1%
Lise	59,2 ± 1,7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.0 ± 1.0
Hemorragia	152,6 ± 5,6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	48 ± 3.0
Coagulação	252,4 ± 2,4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	63 ± 3.0
Potencial de irritação	9,57 ± 0,7	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

A quitosana QAB no presente trabalho mostrou não apresentar nenhum efeito irritante (Tabela 10). A quitosana é um biopolímero de natureza hidrofílica capaz de apresentar degradação através de enzimas humanas, dessa forma sendo considerado biocompatível e biodegradável (AHMADI, F. 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, T. et al., 2012).

A tabela 10 apresenta os resultados do HET-CAM para a associação entre TTO 1% mais quitosana QAB, onde é possível identificar que a associação entre os componentes não apresentaram efeito irritante. A incorporação de OEs a possíveis agentes carreadores superam as limitações relacionadas à baixa solubilidade dos óleos em água, assim como aumenta a estabilidade física dos compostos e podem melhorar a bioatividade do óleo com liberação controlada requerendo menores doses para a atividade do óleo e redução de possíveis reações indesejadas (SEVERINO, et al., 2014; SHEM & KANDA, 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o óleo essencial de melaleuca e a quitosana QAB demonstram atividade bactericida frente às cepas avaliadas, entretanto, neste estudo o TTO apresentou elevados índices para a atividade antimicrobiana, enquanto dados na literatura apresentam níveis reduzidos de TTO com efeito antimicrobiano.

A formulação contendo TTO associada com quitosana QAB promoveu significativa redução dos níveis de TTO necessários para ação antimicrobiana. Fator considerado importante na preparação de possíveis formulações tópicas.

Embora, a associação entre as substâncias testes tenham apresentado efeito positivo na redução do CIM e CBM, para o TTO em estudo estatísticos com base no planejamento fatorial 2^2 as substâncias na formulação não demonstrou apresentar sinergismo. Este mesmo resultado foi comprovado com a análise do FIC.

Segundo resultados obtidos pelo HET-CAM o óleo essencial de melaleuca apresentou elevado nível de irritabilidade, o que era esperado devido as suas características químicas, a quitosana QAB não apresentou nenhum parâmetro irritante. Entretanto, a formulação TTO+QAB, nos mesmos ensaios de HET-CAM, não demonstrou níveis de irritabilidade sugerindo que quitosana inibiu os efeitos irritantes do óleo.

REFERÊNCIAS

- AMATHIEU et al. Nuclear magnetic resonance based metabolomics and liver diseases: Recent advances and future clinical applications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 417, 2016.
- ARANA-SÁNCHEZ et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.
- ASSIS., SILVA., Caracterizacao estrutural e da capacidade de absorcao de agua em filmes finos de quitosana processados em diversas concentracoes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AUMEERUDDY-ELALFI., GURIB-FAKIM., MAHOMOODALLY. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p. 197-204, 2015
- AZUMA et al. Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: Old and new materials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 104-142, 2015.
- AVILA-SOSA et al. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 66-72, 2012.
- BADWAN et al. Chitin and chitosan as direct compression excipients in pharmaceutical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1519-1547, 2015.
- BAGLEY ., WATERS., KONG. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the draize rabbit eye irritation test. **Fd Chem Toxic** 1994;32:1155-1160.
- BAYALA et al. Anticancer activity of essential oils and their chemical components—a review. **American Journal of Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 591, 2014.
- BAKKALI et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BASSOLÉ., JULIANI. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012
- BELLINI et al. Desenvolvimento de membranas lamelares e porosas de xantana e quitosana para aplicação no tratamento de lesões de pele. 2012.
- BISCHOFF., GUALE. Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil poisoning in three purebred cats. **Journal of Zool and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 28-34, 1998
- BURT. 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.

CARSON., HAMMER., RILEY. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CEDRAN et al. Influência da Quitosana sobre a Viabilidade Celular do Probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA 3. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 103-106, 2006

CHANDRA., RAWAT. Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties. **Integrative Medicine Research**, v. 4, n. 3, p. 123-131, 2015.

CHALOVA., CRANDALL., RICKE. Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 5, p. 870-876, 2010.

COX et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CROSS et al. Human skin penetration of the major components of Australian tea tree oil applied in its pure form and as a 20% solution in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 214-222, 2008.

CUARON et al. The Isolation of *Staphylococcus aureus* Tea Tree Oil-Reduced Susceptibility Mutants. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 8, p. 1240-1245, 2014.

CULYBA., MO., KOHLI. Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. **Biochemistry**, v. 54, n. 23, p. 3573-3582, 2015

D'ARRIGO et al. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 317-322, 2010.

DAIMIAN et al.; Quitosana um aminopolissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.16, n. 2, p. 195-205, 2005

DASH et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DAVID. Disponível em, <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/I/isoprene.html>. Acessado em 20 de Janeiro de 2016.

DEE; RHODE; WACHTER; Chitosan mult-functional marine polymer. **Cosmetics & Toiletries**, v. 116, n.2, p. 39-42, 2001.

DEBABOV. Antibiotic resistance: Origins, mechanisms, approaches to counter. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 665-671, 2013

DOS SANTOS et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003

DUMITRIU., VIDAL., CHORNET. Esteban. Hydrogels based on polysaccharides. **Polysaccharides in Medical Applications**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 125-242, 1996.

E. GUSTAFSON et al. The bacterial multiple antibiotic resistant (Mar) phenotype leads to increased tolerance to tea tree oil. **Pathology**, v. 33, n. 2, p. 211-215, 2001.

EMBRAPA, Avaliação do efeito cicatrizante da quitosana por aplicação tópica em ratos, 2007

EL-SHERBINY., EL-BAZ. A Review on Bionanocomposites Based on Chitosan and Its Derivatives for Biomedical Applications. **Eco-friendly Polymer Nanocomposites**. Springer India, 2015. p. 173-208.

FALCI et al. Antimicrobial activity of Melaleuca sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant Staphylococcus aureus. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 401-406, 2015.

FAIR., TOR. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25, 2014.

FIGUREIREDO et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.23, n.4, p. 213-26, 2008.

FOSTER et al. 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.

FRANCI et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8856-8874, 2015.

FRANK et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104: H4 outbreak in Germany. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.

GÁMIZ-GONZÁLEZ et al. Determining the influence of N-acetylation on water sorption in chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 110-116, 2015

GÓMEZ-ESTACA et al. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889-896, 2010

GONZÁLEZ-LAMOTHE et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009

GOY., BRITTO., ASSIS. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GREAY., HAMMER. Recent developments in the bioactivity of mono-and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2015.

GUIMARÃES et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010

GUINOISEAU et al. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 873-879, 2010.

GYAWALI., IBRAHIM. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HAJDARI et al. Essential oil composition variability among natural populations of *Pinus mugo* Turra in Kosovo. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2015.

HAMMER., CARSON., RILEY. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HAMMER., CARSON., RILEY. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.

HAMMER et al. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 5, p. 616-625, 2006.

HAMMER., CARSON., RILEY. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 909-915, 2012

HAMMER, K. A. Treatment of acne with tea tree oil (*Melaleuca*) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p. 106-110, 2014.

HART et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, n. 11, p. 619-626, 2000

HAYEK., GYAWALI., IBRAHIM. Antimicrobial natural products. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education**, v. 2, p. 910-921, 2013.

JUNTER., THÉBAULT., LEBRUN. Polysaccharide-based antibiofilm surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 13-25, 2016

KACZMAREK, Ha., ZAWADZKI, J. Chitosan pyrolysis and adsorption properties of chitosan and its carbonizate. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 7, p. 941-947, 2010.

KALI, A. Antibiotics and bioactive natural products in treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A brief review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 17, p. 29, 2015

KANATT, S. R. et al. Effects of chitosan coating on shelf-life of ready-to-cook meat products during chilled storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 321-326, 2013.

KIM., TATOR., SHOICHET. Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 97, n. 4, p. 395-404, 2011.

KONG et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51-63, 2010

KUMAR et al. Chitin and chitosan: Chemistry, properties, and applications. **Journal of Science & Industrial Research**. V. 63, p. 20-31, 2004.

KUMAR-KRISHNAN et al. Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 242-251, 2015.

KUMIRSKA et al. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1875-1901, 2011.

LARANJEIRA; FÁVERE; Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**. V.32. 672-678, 2009

LIU., WANG., WANG. Synthesis, characterization, and swelling behaviors of chitosan-g-poly (acrylic acid)/poly (vinyl alcohol) semi-IPN superabsorbent hydrogels. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 5, p. 627-634, 2011

LUEPKE. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food Chem Toxic**, 1985;23:287-291.

MANTIL., DALY., AVIS. Effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil as a natural antimicrobial agent in lipophilic formulations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 82-88, 2014

MEDEIROS et al. Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan—Evaluation of its gas barrier properties and application on ‘Tommy Atkins’ mangoes. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 457-464, 2012.

MEDEIROS. Avaliação in vitro e in vivo de Efeitos Sinérgicos de Antibacterianos para o Tratamento de Infecções por *Acinetobacter baumannii* Multirresistentes produtoras de Carbapenemases tipo OXA endêmicas no Brasil. 2012. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.

MORADI et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 477-484, 2012.

NORDMANN et al. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkq520, 2011.

OKOH., SADIMENKO., AFOLAYAN. 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.

OLIVEIRA et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, p. 492-499, 2011

OLIVEIRA. INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA: PARTE II. 1986

PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 174-187, 2015.

PEDRO et al. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 4, p. 501-508, 2009.

PELAEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 981-990, 2006.

PENESYAN, A.; GILLINGS, M., PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.

PILAY et al. Chitin and chitosan polymers chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, 2009.

POIREL, L. et al. Emergence of metallo- β -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4914-4916, 2010

PALOMINO, J. et al. 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.

PRETE, P. Solubilização de membranas de eritrocitos por surfactantes da serie Tween. 2000

RAGHAVENDRA, G. et al. Microwave assisted antibacterial chitosan–silver nanocomposite films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 281-288, 2016.

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

REGNAULT-ROGER, C., Vincent. C., Arnason, J. T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v. 57, p. 405-424, 2012.

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

SAGAVE, L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 221-226, 2015

SÁNCHEZ, M.B. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 4, p. 443-452, 2010.

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

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

SCAZZOCCHIO, F. Microbial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. Natural product research, p. 1-10, 2015.

SCHEFFLER, R. J. et al. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 969-978, 2013

SECOLI, S. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 1, p. 28-34, 2001.

ŞENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 193, n. 2, p. 197-203, 2000

SEOW, Y. et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.

SEVERINO, R. et al. 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.

SHEN, Z., KAMDEM, D. P. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 289-296, 2015.

SILVA., SANTOS., FERREIRA. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química nova**, v.29, No. 4, p.776-785, 2006.

SILVA., FIDELES., FOOK. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 10, n. 1, 2015

SILVA., SANTOS., FERREIRA. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, No. 4, p.776-785, 2006.

SIMOES., BENNETT., ROSA. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746-757, 2009

STAMFORD et al. Microbiological chitosan: Potential application as anticariogenic agent. **INTECH Open Access Publisher**, 2013.

STEILING et al. The HET–CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in Vitro**, v. 13, n. 2, p. 375-384, 1999.

TAJKARIMI., IBRAHIM., CLIVER. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010

THARANATHAN., KITTUR. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. 2003.

THOMSEN et al. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 343-351, 2013.

TONGNUANCHAN., BENJAKUL. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014

TORTORA., FUNKE., CASE. Microbiologia. **Artmed Editora**, 2009

TOSHKOVA et al. Antitumor activity of quaternized chitosan-based electrospun implants against Graffi myeloid tumor. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 400, n. 1, p. 221-233, 2010.

VARGAS., LANGE., GURNY., DELIE. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery**, Rev. 2007;59:1162-1176.

VOON., BHAT., RUSUL. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34-55, 2012.

VU et al. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 198-203, 2011.

WANG et al. Quality evaluation of terpinen-4-ol-type Australian tea tree oils and commercial products: An integrated approach using conventional and chiral GC/MS combined with chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 2674-2682, 2015

WALSH. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **American Society for Microbiology Press**, Washington, DC). 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual for Early Implementation. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2015.

XING et al. Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1443-1450, 2011

XING et al. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 569-588, 2015.

XIAO, et al. High molecular weight chitosan derivative polymeric micelles encapsulating superparamagnetic iron oxide for tumor-targeted magnetic resonance imaging. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1155, 2015

YONG, et al. Environmental applications of chitosan and its derivatives. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233. **Springer International Publishing**, 2015. p. 1-43

YOON et al. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 753-757, 2004.

YOUNES, I., RINAUDO, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015.

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

ZHANG et al. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 9, p. 768-772, 2003

ZHENG. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ZHOU et al. Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1643-1651, 2011.