

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Bibiana Ferreira Gouvêa Ramos

Morgana Pordeus do Nascimento Forte

Campina Grande – PB

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

**Bibiana Ferreira Gouvêa
Ramos**

**Morgana Pordeus do
Nascimento Forte**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado com requisito à obtenção do título de médicas pela Universidade Federal de Campina Grande, sob orientação da Prof.^a Dra. Cristina Ruan Ferreira de Araújo.

Campina Grande – PB

2015

Bibiana Ferreira Gouvêa Ramos
Morgana Pordeus do Nascimento Forte

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA QUITOSANA
SOBRE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida***

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado com requisito à obtenção
do título de médicos pela Universidade
Federal de Campina Grande, sob
orientação do Prof.^a Dra. Cristina Ruan
Ferreira de Araújo.

Campina Grande, __ de novembro de
2015

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristina Ruan Ferreira de Araújo

Dra. Jozinete Vieira Pereira

Dr. Saulo Mariz Rios

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do HUAC - UFCG

R175e

Ramos, Bibiana Ferreira Gouvêia.

Estudo da ação antifúngica da Quitosana sobre leveduras do gênero *Candida*/Bibiana Ferreira Gouvêia Ramos, Morgana Pordeus do Nascimento Forte. – Campina Grande, 2015.

31 f.; il.; tab.

Monografia (Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências Médicas, Curso de Medicina, Campina Grande, 2015.

Orientadora: Profa. Cristina Ruan Ferreira de Araújo, Dra.

1.Quitosana. 2.Antimicrobiano. 3.Levedura. I.Forte, Morgana Pordeus do Nascimento.
II.Título.

BSHUAC/CCBS/UFCG

CDU 618.1

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais, pelo apoio incondicional e a todos que contribuíram direta ou indiretamente pela execução do projeto: nossa gratidão.

RESUMO

A quitosana é um polímero derivado da quitina, de baixo custo, renovável e biodegradável, sendo de grande importância econômica e ambiental. Embora nos últimos anos, este composto tenha sido descrito como um potente antimicrobiano, sua ação antifúngica permanece pouco explorada. Este trabalho objetivou avaliar a ação antifúngica das quitosanas de baixo, médio e alto peso molecular sobre diferentes espécies de *Candida*. As principais cepas do gênero *Candida* (ATCC) foram investigadas: *Candida sp* ATCC 34147, *C. albicans* sorotipo A ATCC 36801 e *C. albicans* sorotipo B ATCC 36802, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. Krusei* ATCC 34135 e *Candida tropicalis* ATCC 28707. Elas foram obtidas por solicitação à Fundação Oswaldo Cruz, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido e em meio líquido. O composto foi testado em diferentes pesos frente às concentrações puras, 20mg/mL, e nas diluições referentes às concentrações de 10 mg/mL, 5 mg/mL, 1,75 mg/mL e 0,875mg/mL. Observou-se que todas as cepas testadas foram sensíveis a pelo menos um tipo de quitosana, demonstrando assim o caráter fungistático do composto estudado. Diante dos resultados, foi selecionada a quitosana com maior ação antifúngica, bem como a cepa de maior sensibilidade, para avaliação minuciosa em diversos tempos de crescimento da espécie, cujo resultado de CIM até as 24 horas foi de 0,875 mg/mL, o menor valor testado no estudo, e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi 1,75 mg/mL, enquanto que no crescimento de 144 horas a CIM foi de 5mg/mL e a CFM de 20mg/mL. Tais resultados demonstraram um alto poder de ação fungicida da quitosana frente a um fungo patógeno, sendo inclusive de maior eficácia quando comparado ao fluconazol.

Palavras chave: Quitosana, antimicrobiano, levedura.

ABSTRACT

Chitosan is a low-cost, renewable and biodegradable polymer derived from chitin that has great economic and environmental importance. Although in recent years, this compound has been described as a potent antimicrobial agent, its antifungal action remains little explored. This study aimed at evaluating the antifungal effect of low, medium and high molecular weight chitosan on *Candidas*. The main strains of *Candida* (ATCC) were investigated in this work: *Candida sp* ATCC 34147, *C. albicans* sorotipo A ATCC 36801 e *C. albicans* sorotipo B ATCC 36802, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. Krusei* ATCC 34135 e *Candida tropicalis* ATCC 28707. They were obtained upon request at the Oswaldo Cruz Foundation, by means of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in solid and liquid media. The compound was tested at different concentration weights forward to pure (20mg/ml), and dilutions relating to concentrations of 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1.75 mg/mL, 0.875 mg/ml. It was observed that all the strains were susceptible to at least one type of chitosan, demonstrating the fungistatic property of the studied compound. Given those results, the chitosan with higher antifungal action, as well as the most sensitive strain, was selected to thorough evaluation in different species growth times in which MIC results until 24 hours were 0.875 mg/ml, the lowest value tested in the study, and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was 1.75 mg/mL, while in the 144 hours growth the MIC was 5mg/ml and MFC was 20mg/mL. Those results showed chioticsan as a high power fungicide against a pathogenic fungus, being additionally more efficient when compared to fluconazole.

Keywords: Chitosan, antimicrobial, yeast.

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

QBPM – Quitosana de Baixo Peso Molecular

QMPM – Quitosana de Médio Peso Molecular

QAPM – Quitosana de Alto Peso Molecular

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1. Representação da ação antimicrobiana da QBPM sobre o crescimento de *Candida albicans sp*, incubado em estufa a 37°C por 24 horas.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: CIM em meio sólido da QBPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	18
Tabela 2: CIM em meio líquido da QBPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	18
Tabela 3: CIM em meio sólido da QMPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	19
Tabela 4: CIM em meio líquido da QMPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	19
Tabela 5: CIM em meio sólido da QAPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	20
Tabela 6: CIM em meio líquido da QAPM em diferentes concentrações frente a cepas de <i>Candida</i>	20
Tabela 7: CIM da QBPM em comparação com a CIM do fluconazol na espécie <i>Candida sp</i> inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C.....	21
Tabela 8: CFM de quitosana na espécie <i>Candida sp</i> inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C.....	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Desenho do Estudo	13
3.2 Espécies fúngicas	13
3.3 Curva de crescimento	13
3.4 Obtenção da quitosana	14
3.5 Preparo do gel de quitosana	14
3.6 Determinação da atividade antifúngica da quitosana em diferentes tempos de crescimento.....	14
2.6.1 Inóculo Microbiano	14
2.6.2 Determinação da CIM – Técnica de Macrodiluição.....	15
2.6.3 Determinação da CIM e CFM para cada tempo de ação da quitosana em relação ao crescimento fúngico – Técnica de Microdiluição.	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1 Determinação da CIM em meio sólido e em meio líquido da QBPM.....	17
3.2 Determinação da CIM em meio sólido e em meio líquido da QMPM	18
3.3 Determinação da CIM em meio sólido e em meio líquido QAPM.....	19
3.4 Determinação das CIMs de QBPM para cada tempo de crescimento da espécie <i>Candida sp</i>	20
3.5 Determinação da CFM de quitosana para cada tempo de crescimento da espécie <i>Candida sp</i>	21
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO	26
6 REFERÊNCIAS.....	27

1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polímero formado por uma cadeia longa de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, sendo um derivado da quitina, e um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza, cuja fórmula estrutural da quitina é semelhante à da celulose com a qual compartilha a função estrutural em matérias vivas (OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2005; ZARGAR et al, 2015).

Algumas propriedades peculiares tornam a quitosana um biomaterial de alta aplicabilidade nas mais diferentes áreas. As principais características são a biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, atoxicidade, possibilidade de ser quimicamente modificada, ação homeostática, imunoadjuvante, cicatricial, bacteriostática e antimicrobiana, além da capacidade de ser processada em diferentes formas (soluções, esponjas, filmes, membranas, gel, pasta, tabletes, microesferas, fibras, entre outros) (SILVA, 2005; PAVINATTO, 2009; PENA et al, 2013; SOLIMAN et al, 2015).

A atividade antimicrobiana da quitosana contra uma variedade de bactérias e fungos se deve, principalmente, a sua natureza policatiônica, mas, embora vários mecanismos tenham sido propostos, o modo exato de ação ainda é incerto. Porém parece existir um consenso de que a ação antimicrobiana é produto da interação entre a superfície da cadeia do biopolímero e a parede celular microbiana (LIM; HUDSON, 2004; FOSTER; BUTT, 2011). Como agente biocida, a quitosana age contra um amplo espectro de organismos-alvo, de forma geral, os bolores e leveduras são os mais sensíveis, seguidos por bactérias Gram-negativas e, finalmente, bactérias Gram-positivas. Ainda, há estudos que apontam para uma possível ação biostática, na qual os microrganismos estariam impedidos de crescer devido a uma ação quelante propiciada pela quitosana sobre a superfície celular (TAYEL et al, 2010; KILLAY et al, 2015).

Espécies de *Candida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal na boca, no trato gastrointestinal, trato genitourinário e na região retal em indivíduos sadios. Todavia, quando há uma ruptura da homeostase na microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (BARBEDO et al., 2009).

Apesar do aumento no número de antifúngicos comercialmente disponíveis nos últimos anos, estes ainda se encontram em desvantagem, quando comparados às drogas antibacterianas. Além disso, a resistência aos antifúngicos tem representado um grande desafio para a clínica (BATISTA; BIRMAN; CURY, 1999; CHAMI et al., 2005).

Diante desta problemática, vários pesquisadores têm intensificado seus estudos no campo da medicina alternativa, e principalmente no uso da quitosana, que constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos. Depois da celulose, é o composto orgânico mais importante da natureza. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Por possuir tais propriedades e ser abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material orgânico potencialmente interessante para usos diversos. Portanto, objetivou-se, estudar a ação antifúngica da quitosana sobre os principais tipos de *Candida* relacionadas com as infecções que atingem as diversas partes no organismo humano.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da quitosana de baixo, médio e alto peso molar sobre cepas do gênero *Candida*.
- Determinar a atividade antifúngica nos diferentes tempos de crescimento da espécie de *Candida* que se demonstrar mais susceptível a ação da quitosana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Tratou-se de um estudo do tipo experimental.

3.2 Espécies fúngicas

Foram utilizadas na presente pesquisa cepas fúngicas padronizadas de *Candida sp* (ATCC 34147), *C. albicans* sorotipo A (ATCC 36801) e *C. albicans* sorotipo B (ATCC 36802), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. Krusei* (ATCC 34135) e *Candida tropicalis* (ATCC 28707), obtidas mediante solicitação ao departamento de microbiologia (Laboratório de Materiais de Referência) da Fundação Oswaldo Cruz, remetidas liofilizadas, e posteriormente reativadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Campina Grande/PB.

3.3 Curva de crescimento

De acordo com GAVA em 1984, realizando contagens microbianas periódicas e, ao se fazer um gráfico, colocar o logaritmo do número de microorganismos viáveis por mililitro na ordenada e a unidade de tempo na abscissa, obteremos uma curva de crescimento. Além disso, esta curva é composta por quatro fases distintas de crescimento: fase de arranque, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio. (KONEMAN et al. 2001 apud SANTIAGO, 2010).

A partir do momento no qual um microrganismo é inoculado em um meio de cultura estéril, o crescimento não se inicia de imediato. Esta fase, conhecida como fase lag ou de arranque, ocorre pela necessidade das células de se adaptarem ao novo meio, até que possam dar início ao seu desenvolvimento (BROCK; BROCK, 1978 apud SANTIAGO, L., 2010).

Já na fase logarítmica ou de crescimento exponencial, o número de células fúngicas aumenta em progressão geométrica na medida em que o tempo cresce em progressão aritmética. Na fase estacionária ou de equilíbrio, a contagem de microorganismos viáveis permanece constante em seu valor máximo, já que o

número de fungos neoformados é compensado pelo daquelas que começam a morrer. Por último, segue a fase de declínio ou morte dos fungos (BIER, 1977; TORTORA et al., 2005 apud SANTIAGO, 2010).

Para determinação da curva de crescimento de cada espécie do gênero *Candida* adquirida para o projeto, primeiramente foi feita a preparação do inóculo puro de cada espécie para posterior início de coleta de duas em duas horas com plaqueamento e quantificação celular estimada através da avaliação da densidade óptica (D.O.) em comprimento de onda de 530 nm e posterior contagem após 24 e 48 horas de tais preparações. A partir das quatro horas de crescimento foram realizadas diluições seriadas com plaqueamento e D.O. de cada uma delas no intuito de facilitar a contagem de células. A última coleta foi realizada 144 horas após o início.

3.4 Obtenção da quitosana

A quitosana purificada de baixo (lote: MKBG3334V), médio (lote: MKBF1336V) e alto (lote: MKBF9232V) peso molar foi obtida da empresa Sigma-Adrick.

3.5 Preparo do gel de quitosana

A quitosana foi diluída em ácido acético 1% para obtenção de quitosana com concentração inicial 20mg/mL (1g de quitosana diluída em 50mL de AC 1%). As soluções ficaram em agitação por 12h e depois em repouso por mais 12h. Após esse período, foi feito o ajuste do pH, com Hidróxido de Sódio a 4%, no equipamento Hanna Instruments HI 221 para obtenção de pH 5,9 (a partir de pH 6 a quitosana precipita). O ajuste de pH foi feito sob agitação para melhor homogeneização da base.

3.6 Determinação da atividade antifúngica da quitosana em diferentes tempos de crescimento

3.6.1 Inóculo Microbiano

As cepas fúngicas foram repicadas em Agar Sabouraud e incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C, 24h antes da realização do experimento, para fazer

o pré-inóculo, obtendo suspensões padronizadas em 10^7 células viáveis/mL em caldo Sabouraud. Em seguida, foi feito o inóculo em Caldo Sabouraud, que serve para análise de cada cepa em tempos de crescimento diferentes, comparando com as concentrações referidas em curva de crescimento padrão de cada espécie.

3.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Técnica de Macrodiluição

A Concentração Inibitória Mínima da quitosana em meio líquido foi determinada através da técnica de diluição em caldo Sabouraud. Inicialmente, foi adicionado 4,5 mL da solução de quitosana possuindo diferentes concentrações (0 a 10mg/mL) em 4,5 mL de caldo Sabouraud com concentração ajustada para 10 mL ao se inocular posteriormente 1 mL da suspensão fúngica. Em seguida, o sistema é incubado em estufa a 37 °C por 24-48 horas. Ao término do período de incubação, a menor concentração (mais alta diluição) de quitosana que não apresentar crescimento fúngico visível é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido.

Para determinação da CIM em meio sólido, realizou-se o teste de difusão em ágar, onde as placas de Petri (90x15mm), descartáveis, estéreis foram inoculadas pela técnica de pour plate, nas quais se inoculou 100µL do inóculo fúngico e em seguida adicionou-se 25mL de Agar Sabouraud fundido e resfriado a 45°C. O material foi homogeneizado girando-se a placa através de movimentos circulares.

Após solidificação do meio, foram feitos em cada placa 5 cavidades de 6 mm cada, com auxílio de ponteiros descartáveis, estéreis. Nessas cavidades, foram adicionados 50µl de quitosana em suas diferentes concentrações, partindo de uma solução cuja concentração era de 20mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, após este período os resultados foram notificados. Foi considerado aqueles em que houve inibição de crescimento com halos de inibição igual ou superior a 8 mm (WONG-LEUG, 1988; SAKAR et al., 1988; NAQVI et al. 1991; CATAO, 2007).

Os testes foram realizados em triplicata e o resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos de inibição. Considerou-se como CIM a menor concentração da quitosana capaz de inibir o crescimento da cepa, com formação

de halos, após incubação a 37°C por 24 e 48 horas (FABRY, et al., 1998; CONSENTINO, et al., 1999; ALVES, 2006; CATAO, 2007).

3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) para cada tempo de ação da quitosana em relação ao crescimento fúngico – Técnica de Microdiluição.

Para a segunda etapa foi escolhida a técnica da microdiluição (CLSI M27-A2, 2008): foram utilizadas microplacas contendo 96 orifícios com fundo em forma de “U”, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de “A” a “H”. As colunas 1 e 2 foram utilizadas para quitosana de baixo peso molecular. A coluna 4 foi utilizada como controle negativo, tendo somente meio de cultura Caldo Sabouraud. A coluna 5 continha o controle positivo, onde há meio de cultura e inóculo. No que se refere à coluna 6, conteve apenas metanol e meio de cultura. Enquanto as colunas 11 e 12 foram utilizadas para testar fluconazol e metanol em diferentes concentrações.

Inicialmente, nas colunas 1 e 2 foram adicionados 45 µL da solução de quitosana possuindo diferentes concentrações (0 a 20mg/mL) e 45 µL de caldo Sabouraud e posteriormente inoculado 10 µL de cada suspensão, conforme o tempo de crescimento avaliado. Na coluna 4, foi colocado 45 µL de Caldo Sabouraud. Na coluna 5, 90 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inóculo. Na coluna 6, 45 µL de metanol, 45 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inóculo. Quanto às colunas 10 e 11, foram preenchidas com 45 µL da solução de fluconazol, 45 µL de Caldo Sabouraud e 10 µL de inóculo. Ao final, cada orifício onde foi testado uma solução antimicrobiana possuía 100 µL de volume total. Assim como realizado para avaliar os halos de inibição descritos anteriormente, todos os testes foram realizados em triplicata neste experimento em microplacas

Após 24 horas do período de incubação das microplacas, foi adicionado 30 µL de resazurina em cada orifício das colunas 1, 4, 5, 6 e 11. As colunas 2 e 12 foram utilizadas para determinação da CFM.

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 fúngico enquanto que as variações de rosa e roxo são indicativos da presença de células viáveis para crescimento. Após 15 e 30 minutos foram feitas as análises da mudança de cor.

Diante da mudança de cor para determinação da CIM, a primeira concentração que houve crescimento visível e duas imediatamente acima foram testadas para encontrar a CFM. Dessa forma, foram colocados 10 µL das cavidades da microplaca (sem resazurina) em placa de Petri, as quais foram posteriormente incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. A placa onde estava incubada a menor concentração de quitosana e não houve crescimento algum foi considerada CFM.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido e em meio líquido da Quitosana de Baixo Peso Molecular (QBPM)

No presente estudo, o gel de quitosana de baixo peso molecular apresentou atividade antimicrobiana sobre todas as cepas fúngicas analisadas, *Candida sp*, *C. albicans* sorotipo A, *C. albicans* sorotipo B, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, apresentando halos de inibição que variaram de 18 a 12 mm, 12 a 08 mm, 13 a 09 mm, 16 a 08 mm, 12 a 10 mm e 10,5 a 09 mm, respectivamente. A inibição do crescimento apresentou-se homogênea de acordo com o grau de concentração da quitosana em estudo (tabela 1 e fotografia 1).

Tabela 1. CIM em meio sólido da QBPM em diferentes concentrações frente a cepas de *Candida*.

	Concentrações da QBPM (em mg/mL)				
	20	10	5,0	2,5	1,75
<i>Candida sp</i>	18 mm	14 mm	12 mm	-	-

<i>C. albicans sorotipo A</i>	12 mm	10 mm	09 mm	08 mm	-
<i>C. albicans sorotipo B</i>	13 mm	10 mm	09 mm	-	-
<i>C. glabrata</i>	10,5 mm	09 mm	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	12 mm	11 mm	10 mm	-	-
<i>C. krusei</i>	16 mm	11,5 mm	10 mm	08 mm	-



Fotografia 1. Representação da ação antimicrobiana da QBPM sobre o crescimento de *Candida albicans sp*, incubado em estufa a 37°C por 24 horas.

No que diz respeito à CIM em meio líquido, notou-se que, analisando todas as cepas em conjunto, até a concentração de 1,75mg/mL não foi apresentado turbidez visual, excetuando a *C. glabrata* que se apresentou com turbidez quando a QBPM estava em uma concentração de 2,5 mg/mL (tabela 2).

Tabela 2. CIM em meio líquido da QBPM em diferentes concentrações frente a cepas de Candida.

	Concentrações da QBPM (em mg/mL)							
	20	10	5,0	2,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo A</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo B</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

* (-) sem crescimento visível ** (+) crescimento visível

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido e em meio líquido da Quitosana de Médio Peso Molecular (QMPM)

A CIM em meio sólido resultou com atividade da QMPM para as seguintes cepas: *C. albicans sp*, *C. albicans sorotipo A*, *C. albicans sorotipo B*, *C. krusei* e *C.*

glabrata, apresentando halos de inibição que variaram de 9,5 a 08 mm, 10 a 08 mm, 13 a 09 mm, 12 a 09 mm, 10,5 a 9,5 mm e 9,5 mm respectivamente (tabela 3)

Tabela 3. CIM em meio sólido da QMPM em diferentes concentrações frente a cepas de *Candida*.

	Concentrações da QMPM (em mg/mL)				
	20	10	5,0	2,5	1,75
<i>Candida albicans sp</i>	10,5 mm	10 mm	09 mm	-	-
<i>C. albicans sorotipo A</i>	11,5 mm	9 mm	08 mm	-	-
<i>C. albicans sorotipo B</i>	13 mm	9,5 mm	8,5 mm	-	-
<i>C. glabrata</i>	9,5 mm	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	11,5 mm	9,5 mm	8,5 mm	-	-

A avaliação dos tubos contendo quitosana de médio peso molecular resultou com CIM em meio líquido para a concentração de 05mg/mL como não apresentando turbidez visual. Neste caso, as cepas de *C. albicans sp*, *C. albicans sorotipo A*, *C. albicans sorotipo B* e *C. krusei* mostraram-se mais sensíveis que a *C. glabrata* e *C. tropicalis* (tabela 4).

Tabela 4. CIM em meio líquido da QMPM em diferentes concentrações frente a cepas de *Candida*

	Concentrações da QMPM (em mg/mL)							
	20	10	5,0	2,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo A</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo B</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

* (-) sem crescimento visível ** (+) crescimento visível

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio sólido e em meio líquido da Quitosana de Alto Peso Molecular (QAPM)

No caso do gel de Quitosana de Alto Peso Molecular, os resultados de CIM em meio sólido se apresentaram com atividade antimicrobiana sobre as cepas: *Candida sp*, *C. albicans sorotipo A*, *C. albicans sorotipo B*, *C. krusei* e *C. glabrata*, em que os halos de inibição que variaram de 9,5 a 08 mm, 10 a 08 mm, 12 a 09 mm, 10,5 a 9,5 mm e 09 a 8,5 mm, respectivamente (tabela 5).

Tabela 5. CIM em meio líquido da QAPM em diferentes concentrações frente a cepas de *Candida*

	Concentrações da QAPM (em mg/mL)				
	20	10	5,0	2,5	1,75
<i>Candida sp</i>	9,5 mm	9,5 mm	8 mm	-	-
<i>C. albicans sorotipo A</i>	10 mm	8,5 mm	8 mm	-	-
<i>C. albicans sorotipo B</i>	12 mm	9 mm	9 mm	-	-
<i>C. glabrata</i>	9 mm	8,5 mm	-	-	-

<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	10,5 mm	9,5 mm	-	-	-

Em relação à CIM em meio líquido, o resultado se apresentou semelhante ao da QMPM, onde não foi visto crescimento nos tubos até a concentração de 5 mg/ml de quitosana, como também demonstrou que *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram cepas menos sensíveis (tabela 6).

Tabela 6. CIM em meio líquido da QAPM em diferentes concentrações frente a cepas de *Candida*.

	Concentrações da QAPM (em mg/mL)							
	20	10	5,0	2,5	1,75	0,875	0,4375	0,21875
<i>Candida sp</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo A</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. albicans sorotipo B</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

* (-) sem crescimento visível ** (+) crescimento visível

4.4 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM's) de quitosana de baixo peso molecular (QBPM) para cada tempo de crescimento da espécie *Candida sp*

Diante dos resultados acima, notou-se que a quitosana mais eficaz em todas as cepas testadas foi a de baixo peso molecular e que a cepa mais sensível corresponde a de *Candida sp*. Por esse motivo, optamos por aprofundar os dados entre essa espécie e composto e testamos sua eficácia em diversos tempos da curva de crescimento, comparando com resultados de um dos principais antifúngicos usados na atualidade: o fluconazol.

Nesta primeira análise, observamos que a quitosana se mostrou mais eficaz para inibir o crescimento da *Candida sp*. Até a quarta hora de crescimento, tanto a quitosana quanto o fluconazol possuíram a mesma CIM de 0,875. A partir da sexta hora de crescimento, a quitosana já se mostrou mais eficaz, pois sua CIM foi de 0,875 até a 24^a hora de crescimento, enquanto o fluconazol teve aumento gradativo de sua concentração necessária para inibir o crescimento do fungo em estudo, como visto na seguinte tabela.

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima da QBPM em comparação com a CIM do fluconazol na espécie *Candida sp* inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CIM (mg/mL) da Quitosana	CIM (mg/mL) do Fluconazol
00	0,875	0,875
02	0,875	0,875
04	0,875	0,875
06	0,875	1,75
08	0,875	1,75
10	0,875	1,75
12	0,875	2,5
15	0,875	05
18	0,875	05
24	0,875	10
36	2,5	10
48	2,5	05
72	05	2,5
96	05	05
120	05	05
144	05	05

4.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de quitosana para cada tempo de crescimento da espécie *Candida sp*

No que se refere à CFM de cada tempo analisado em curva de crescimento, vimos que até o tempo 18 de crescimento, a concentração fungicida mínima da quitosana foi a menor concentração testada nos experimentos, não descartando que ela ainda pode ser menor ao ser estudar concentrações ainda menores, enquanto a partir de 24 horas de crescimento, a concentração necessária para inibir o crescimento de tal espécie de cândida foi aumentando de forma gradativa, como exposto na tabela 8.

Tabela 8. Concentração Fungicida Mínima de quitosana na espécie *Candida albicans* inoculada em Sabouraud, ao longo de 144 horas de incubação a 37°C

Tempo (h)	CFM (mg/mL)
24	1,75
36	2,5
48	2,5
72	10
96	10
120	10
144	20

5 DISCUSSÃO

O aumento da resistência a antifúngicos alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, que se encontram disseminadas e fora de controle (MENEZES et al, 2009). Além disso, a resistência de *Candida non-albicans* isoladas a antifúngicos disponíveis atualmente é um grande desafio para uma futura estratégia terapêutica empírica e profilática, já que a chance de haver resistência aos azólicos é maior com *C. glabrata*, *C. krusei* e outras espécies incomuns (MICELI; DÍAZ; LEE, 2011). Diante desse fato, a procura por meios alternativos se faz presente, o qual pode ser encontrado *in vitro* nesse estudo com a ação fungistática eficaz da quitosana sobre espécies de *Candida albicans* e *Candida non-albicans*.

A quitosana tem sido investigada como um material antimicrobiano contra uma grande quantidade de organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos em experimentos envolvendo interações *in vivo* e *in vitro* com a quitosana em diferentes formas (soluções, filmes e compostos). Geralmente, a quitosana é considerada bactericida ou bacteriostática. Pesquisas anteriores tiveram a tendência de caracterizar a quitosana como mais bacteriostática do que bactericida (GOY et al, 2009).

A atividade da quitosana contra fungos é considerada fungistática, apesar de existir alguns trabalhos recentes mostrando seu papel fungicida (GOY et al, 2009). De fato, como visto na presente pesquisa, a quitosana se apresentou com caráter fungistático, visto que houve formação de halo de inibição para todas as cepas estudadas.

De forma geral, pode-se dizer que a quitosana apresenta poder antifúngico, mas tal fato varia de acordo com o peso molecular deste composto, como descrito por GUO em 2009, o qual afirmou que a diferença de peso molecular parece ter diferentes impactos na atividade de inibição.

O peso molecular depende do grau de desacetilação da quitina por hidrólise básica com solução de hidróxido de sódio. Durante as reações de desacetilação, a manipulação do grau de acetilação, de cargas ao longo da cadeia molecular e da massa molecular do polímero, através da temperatura, condições atmosféricas e concentrações utilizadas no processamento das reações, serão determinantes nas propriedades físico-químicas (solubilidade, viscosidade, comportamento eletrolítico, entre outros) apresentadas pela quitosana (PAVINATTO, 2010; OLIVEIRA, 2004).

Sabe-se que quanto maior o grau de desacetilação, maior sua natureza policatiônica. Diante disso, autores Lim e Hudson, em 2004 e Foster e Butt, em 2011 relataram que a natureza policatiônica da quitosana seja uma das razões para que tal composto apresente atividade antimicrobiana, agindo contra fungos e bactérias principalmente. Em suma, quanto maior o grau de desacetilação, menor pode ser seu peso molecular e maior a quantidade de cátions livres para que haja interação do composto com a parede celular do microorganismo, justificando, e sendo demonstrado em nosso estudo que, quanto mais baixo o peso molecular da quitosana, maior sua atividade antimicrobiana. Tal fato corrobora com o estudo realizado por Goy em 2009 o qual relatou que vários estudos analisaram a quitosana em diferentes graus de acetilação contra fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*) e em todos os casos a atividade antimicrobiana aumentou com o a diminuição do grau de acetilação, ou seja, menor peso da quitosana.

Nesta pesquisa, vimos primeiramente que os resultados diferem conforme os três tipos de quitosana em estudo (QBPM, QMPM, QAPM), opondo-se ao estudo realizado por Coqueiro, em 2011, onde foi testado a quitosana de baixo e médio peso molecular sobre o fungo fitopatógeno *Alternaria solani*, o qual teve como resultado que o peso molecular da quitosana não influenciou a atividade antibiótica in vitro, discordância esta que pode estar relacionada a característica intrínsecas deste fungo, tornando-o mais susceptível à quitosana, seja qual for seu peso molecular.

A quitosana de baixo peso molecular e seus derivados mostram uma melhor atividade contra bactérias, leveduras e fungos no geral. Semelhante ao nosso

estudo, houve a demonstração da eficácia da QBPM contra *Candida krusei*. (TIKHONOV et al., 2006). Diante da hipótese de que a quitosana entra na célula fúngica e seus nutrientes essenciais são adsorvidos, inibindo ou diminuindo a síntese de proteína e RNAm, acredita-se que essa seja a forma da atuação da quitosana de baixo peso molecular por ser menor e ter mais fácil acesso na célula (GUO et al, 2008).

Como visto nessa pesquisa, a quitosana de baixo peso molecular (QBPM) apresentou-se com uma maior capacidade de inibir o crescimento de todas as cepas de *Candida* em estudo, concordando com um estudo realizado por Ahmed et al. (2010), onde foi comprovado que a quitosana mais bioativa para inibir *Candida albicans* tinha o menor peso molecular e o maior grau de desacetilação e opondo-se a um estudo realizado por Seyfarth et al. (2008), o qual afirmou que um menor peso molecular está associado com uma menor atividade antifúngica nas espécies *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*. Isso pode se dever a forma como a solução contendo quitosana foi preparada..

Um estudo averiguando componentes iônicos e metabólicos da ação da quitosana de baixo peso molecular frente ao crescimento da *Candida albicans* mostrou que um dos motivos para sua eficácia se deve a sua natureza policatiônica e seu alto efluxo de potássio. No mesmo estudo foi postulado que quanto maior a concentração da espécie, mais difícil era a ação da quitosana. (PENA; SANCHEZ; CALAHORRA, 2013)

Isso foi comprovado no presente estudo: quando testou-se a quitosana ao longo da curva de crescimento deste fungo, notou-se que a menor concentração avaliada na metodologia utilizada nesse estudo já era suficiente para se apresentar como fungicida em menores tempos de crescimento da *Candida*, enquanto ao longo do crescimento deste, as concentrações inibitórias ou fungicidas iriam aumentando, ainda que em menores proporções do que o antifúngico controle (fluconazol), demonstrando uma eficácia maior da quitosana *in vitro*.

Em relação à ação antifúngica da quitosana de médio peso molecular (QMPM), os resultados desse estudo evidenciaram que esta se mostrou eficiente

em relação a quase todas as cepas em estudo, excetuando a *C. tropicalis* (Tabela 3).

A quitosana de alto peso molecular (QAPM) não se mostrou eficiente contra *C. tropicalis* (Tabela 5 e Tabela 6). Além disso, se mostrou menos ativa do que as quitosanas de menores pesos, opondo-se a um estudo realizado por Tapia et al. (2009), em relação a *Candida glabrata* pois este afirmou que quitosana de alto peso molecular apresentava atividade antifúngica considerável sobre tal espécie.

Em relação à eficácia da quitosana em cada espécie, nesse estudo os resultados condiz com a pesquisa realizada por Seyfarth et al. (2008), em que foi comprovado que *C. krusei* e *C. albicans* foram mais sensíveis do que *C. glabrata*. A resistência maior de *C. glabrata* não ocorre somente com a quitosana, pois estudos revelam sua menor sensibilidade a azólicos devido a uma predisposição genética (REX, 1995; SANGUINETTI et al., 2005).

No que diz respeito à ação contra *C. albicans*, o resultado foi de que há ação fungistática, concordando com o estudo realizado por Azcurra et al., em 2006, o qual relatou que com a quitosana de alto peso molecular diminuiu a hidrofobia e adesão da parede celular do fungo a algumas células, e com isso poderia diminuir a virulência dessa levedura em tecidos presentes no sistema bucal humano, evitando então seu crescimento.

A quitosana vem sendo testada in vivo, em ratos cujos sistemas imunológicos encontram-se suprimidos. Em uma pesquisa realizada por Solimam (2015), a quitosana se mostrou com uma atividade contra *Candida albicans* significativa. Neste mesmo estudo, tal composto foi combinado com anfotericina B e a consequência foi de redução dos efeitos tóxicos deste. Tal efeito sinérgico pode ser uma opção para reduzir a concentração de anfoterina B usada em humanos. Os resultados obtidos nesse estudo, in vitro, corrobora com a hipótese descrita: a quitosana ser um potente composto capaz de inibir espécies patogênicas humanas.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo a atividade antimicrobiana da quitosana foi comprovada sobre um fungo patógeno humano cujo gênero é responsável pela maioria das infecções fúngicas documentadas. Concluiu-se que a quitosana tem caráter fungioestático e que esse composto com menor peso molecular tem mais atividade antimicrobiana frente à quitosana de médio e alto peso molecular sobre as cepas estudadas. Além disso, foi visto que a quitosana de baixo peso molecular tem maior ação na *Candida albicans sp*, em um fungo com alta prevalência de infecção em humanos, bem como suas concentrações necessárias para inibir este patógeno apresentou-se menor do que a do fluconazol, sugerindo sua melhor eficácia.

Diante dos resultados, além de necessários mais estudos sobre a ação antimicrobiana, principalmente antifúngica in vitro da quitosana, devem-se aprofundar estudos para saber se tal biopolímero pode ser utilizado sem toxicidade por humanos no intuito de que futuramente seja possível o uso deste composto como um fármaco para tratamento de micoses. Sendo demonstrado seu potencial antifúngico, ainda que não se consiga demonstrar sua capacidade isolada de ação, estudos também poderiam ser realizados no intuito de unir drogas já utilizadas para tratamentos antifúngicos com a quitosana, no sentido de reduzir sua posologia, podendo então diminuir a incidência de microrganismos resistentes aos fármacos atuais.

7 REFERÊNCIAS

AHMED et al. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 47, p. 454–457, 2010.

ALSARRA, I. A. et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**,. v. 23, p. 3637–3644, 2002.

ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of brasilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n.3, p. 367-373, 2000.

AZCURRA, A. et al. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesion to cells. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 11, p. 120-125, 2006.

BARBEDO, L. S. et al. Candidíase. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.1, p.22-38, 2010.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **R. Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.13, n.4, p.343-348, out/dez 1999.

BENTO, R.A. et al. Potential of chitosan from *Mucor Rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria Monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.583-589, 2009.

BIER, O. **Bacteriologia e Microbiologia**. 18. ed. São Paulo: Melhoramentos, p.1056, 1977.

BROCK, T. D.; BROCK, K. M. **Basic microbiology with applications**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 608, 1978.

CATÃO, R. M. R. et al, Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre cepas isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Anal. Clin.** v. 38, n. 2, p. 111-114, 2006.

CHAMI, N. et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 2, p. 106-111, 2004.

CHEUNG, R. C. F. et al. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5156-5186, 2015.

CONSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

COQUEIRO, D.S.O.; DI PIERO, R.M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria Solani*.. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 78, n. 3, p.459-463, jul/set., 2011.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of east African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84, 1998.

FOSTER, L.J.R; BUTT, J. Chitosan films are not antimicrobial. **Biotechnol Lett**, Australia, v. 33, p. 417–421, 2011.

GAVA, A. J. Métodos de conservação de alimentos. In: _____. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel. cap. 2, p. 57-58, 1984.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G.. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GUO, Z et al. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 71 p. 694–697, 2008.

KILLAY, Amos. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent and Fatty Acid Absorber in Smoked Skipjack Tuna Processed Using Coconut Shell. **American Journal of Life Sciences**, v. 3, n. 2, p. 93-99, 2015.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Medsi, p.1465, 2001.

LI, XIAO-FANG et al. Effects of MolecularWeight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus Niger Iranian Polymer Journal*. v.17, n.11, p. 843-852, 2008.

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

MENEZES, E. A.; MENDES, L. G.; CUNHA, F. A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 354-355, 2009.

MICELI, M.H. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**. v. 11, p. 142–51, 2011.

NAQVI, S. H.; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, SãoPaulo, v. 62, n.3, p. 221-228, 1991.

OLIVEIRA, R. A. Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans*. Tese (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos-SP: Universidade de São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-19012005-103055/en.php>> [acessado em 26/04/2011].

PAVINATTO, F.J. Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais). São Carlos – SP: Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-17122010-152254/es.php>> [acessado em 28/04/2011].

PEÑA, A.; SÁNCHEZ, N. S.; CALAHORRA, M. Effects of Chitosan on *Candida albicans*: Conditions for Its Antifungal Activity. **BioMed Research International**. v. 2013, Article ID 527549, 2013.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1–8, 1995.

SAKAR, M. K.; TAMER, A. V.; TOKOUR, S. - Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey. **Fitoterapia**, v. 59, n. 1, p. 49-52, 1988.

SANGUINETTI, M., et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, p.668–679, 2005.

SANTIAGO, L. B. Avaliação *in vitro* e *in vivo* de antissépticos e desinfetantes no controle da linfadenite caseosa, 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE. p. 42-43, 2010.

SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. **Int J Pharm.** v. 353, n. 1, p. 139-48, 2008.

SHAHIDI, F. et al. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology.** v. 10, p. 37-51, 1999.

SILVA, G. L. Estudo da ação inibitória da quitosana sobre os enteropatógenos: *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* e *Escherichia coli* EPEC. Tese (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos-SP: Universidade de São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006-095954/es.php>> [acessado em 26/04/2011].

SOLIMAN, A. M.; FAHMY, S. R.; MOHAMED, W. A.; Therapeutic efficacy of chitosan against invasive candidiasis in mice. **The Journal of Basic & Applied Zoology.** 2015.

TAPIA, C. et al. Efecto antifúngico de quitósan de alto peso molecular em cepas de *Candida sp* aislada de muestras clínicas. **Revista Chilena de Infectología.** v.26, n.6, 2009.

TAYEL, A.A. et al. Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 47, p.10–14, 2010.

TIKHONOV et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. **Carbohydrate Polymers.** v.64, p.66–72, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p. 894, 2005.

WONG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hong-Kong plants used in chinese medicine. **Fitoterapia**, v.69, n.1, p.11-16, 1988.

ZARGAR, V., ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**. v. 2, p. 204–226, 2015.