



CENTRO UNIVERSITÁRIO FRANCISCANO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS
Curso de Mestrado em Nanociências

MAURA ZUBIAURRE DOS SANTOS

**DERIVADOS DA GLUCOSAMINA:
SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Santa Maria, RS

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MAURA ZUBIAURRE DOS SANTOS

**DERIVADOS DA GLUCOSAMINA:
SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Nanociências do Centro Universitário Franciscano de Santa Maria como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências.

Orientador: Prof. Dr. **HELMOZ ROSENIAIM APPELT**

Santa Maria, RS

2010

ÁREA DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS

Mestrado em Nanociências

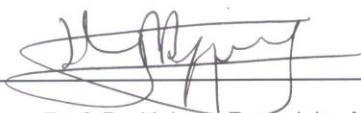
A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO-ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO:

DERIVADOS DA GLUCOSAMINA: SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

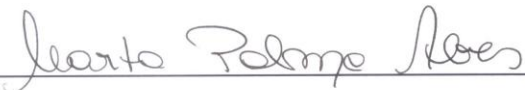
Elaborada por:

MAURA ZUBIAURRE DOS SANTOS

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Helmoz Roseniain Appelt



Prof.ª Dr.ª Marta Palma Alves



Prof. Dr. Tales Leandro Costa Martins

Santa Maria 26 de março de 2010.

Aos meus pais, exemplo de força, coragem e determinação, que não mediram esforços para a minha formação, obrigada pelos ensinamentos, tudo que sou devo a vocês. À minha irmã e as minhas sobrinhas pelo apoio e amor incondicional. Dedico essa conquista a vocês!

Muito obrigada!

Ao professor Helmoz, pela dedicação e orientação deste trabalho, pelos conselhos, paciência nos momentos difíceis e principalmente pela amizade.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram:

Aos meus colegas do mestrado, em especial à Jerusa, Dani, Gabi, que por vezes choramos e discutimos na realização dos trabalhos, mas no fim tudo acabava bem.

A todos os professores do Mestrado em Nanociências. Em especial ao prof. Helmoz, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao prof. Oscar pelas suas contribuições na correção desta dissertação. E aos colegas do laboratório de Química da UFSM, principalmente ao Diego que colaborou com a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa em Química da Unifra: Elisiane, Rafaela, Mariana, Aline, Cíntia e de maneira especial à Cayane, por toda ajuda e companhia diária.

Aos professores e funcionários do laboratório de Química da UNIFRA. Sobretudo ao Cláudio pela disponibilidade e acesso livre a todos os laboratórios.

Aos professores e funcionários do laboratório de Controle de Qualidade.

Aos professores do laboratório de Microbiologia. Ao prof. Roberto e principalmente a prof^ª. Camila pela ajuda na realização deste trabalho, muito obrigada pelo tempo disponibilizado.

As colegas do laboratório de Nanotecnologia: Gabriela, Dani, Márcia e principalmente a minha querida colega Isabel, pela dedicação e amizade desde a elaboração da minha TFG, obrigada Isa.

A minha família que não mediu esforços para esta conquista, compreendendo as inúmeras vezes em que se fez necessária a minha ausência.

Ao meu namorado e sua família que foi fonte de apoio constante por me receberem em sua casa de forma sincera e com muito carinho.

A coordenação, prof^ª Solange Fagan e prof^ª Ivana Zanela e a secretária do Mestrado: Ana
Paula.

RESUMO

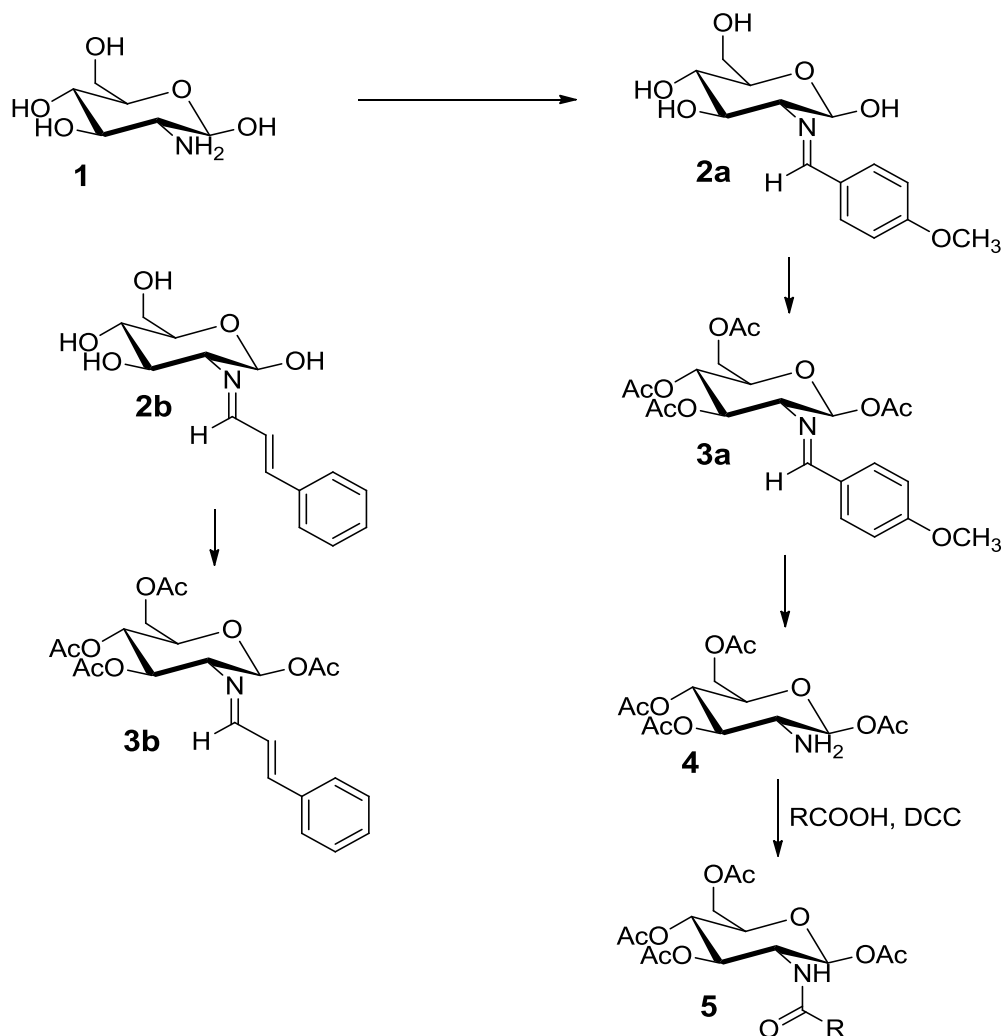
Título: Derivados da Glucosamina: Síntese e Atividade Biológica

Autor: Maura Zubiaurre dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Helmoz Roseinain Appelt

No presente trabalho, foram sintetizados vários compostos derivados da *D*-Glucosamina. Estes compostos foram usados com sucesso contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos.

Na síntese dos compostos, foram utilizados métodos clássicos em química orgânica. Todas as etapas da síntese estão resumidas no esquema abaixo.



Os produtos foram facilmente preparados a partir da *D*-glucosamina em poucas etapas. Na primeira etapa, foram obtidas as iminas derivadas **2a** ou **2b**. As iminas resultantes foram protegidas nos grupamentos OH ligados nas posições C1, C3, C4 e C6, por grupos acetila.

Desproteção seletiva do grupamento amino ligado na posição C2, e posterior acoplamento com ácido cinâmico, forneceu o composto **5**.

Todos os compostos foram testados como agentes antimicrobianos contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos. Os melhores resultados foram obtidos quando o composto **2b** foi utilizado.

Palavras-chave: Glucosamina, atividade antimicrobiana, bases de Schiff, disco-difusão, microduição.

ABSTRACT

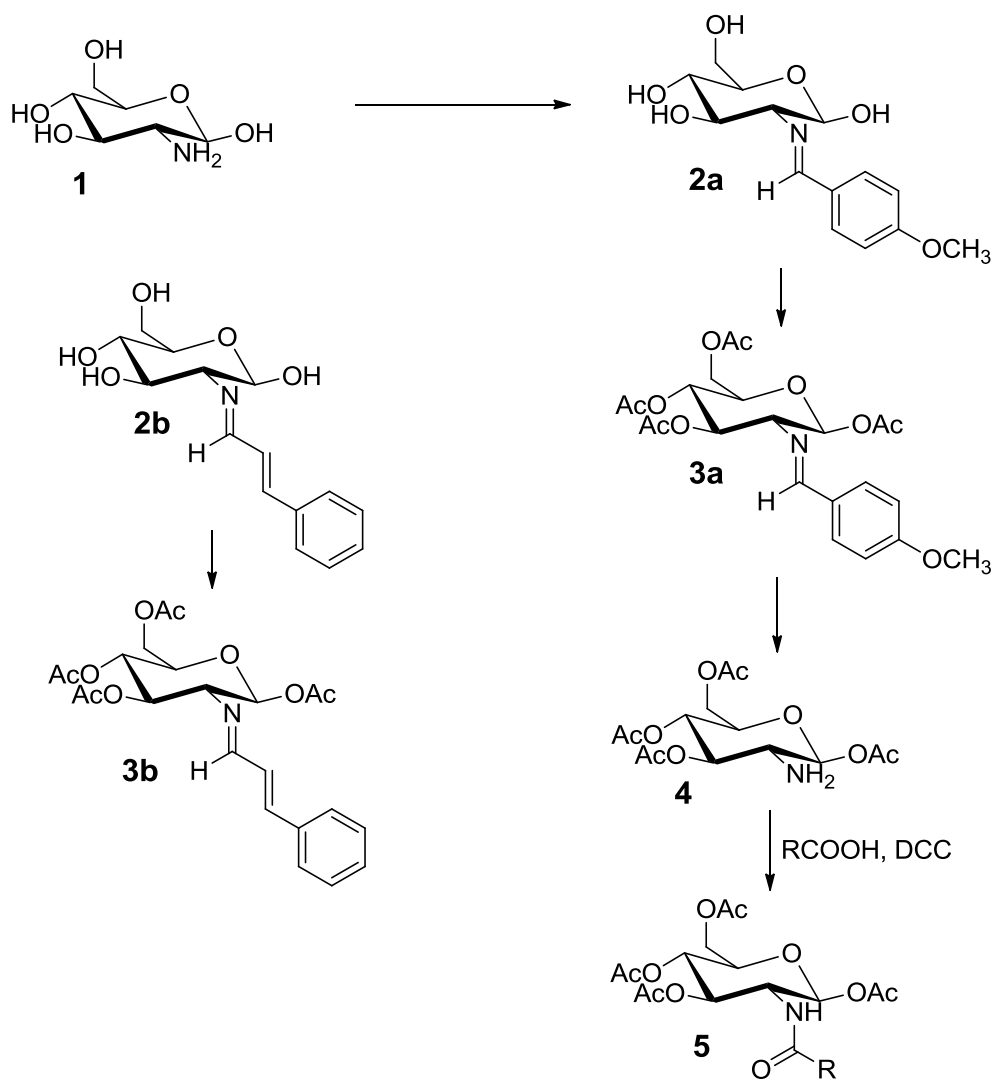
Title: Glucosamine Derivatives: Synthesis and Biological Activity

Author: Maura Zubiaurre dos Santos

Academic Advisor: Prof. Dr. Helmoz Roseinain Appelt

In the present work, several compounds derived from monosaccharide *D*-Glucosamine were synthesized. These compounds were used successfully against gram-positive and gram-negative microorganisms.

In the synthesis of compounds, classical methods in organic chemistry were used. All steps of synthesis are shown in the Scheme below.



The products were readily prepared from *D*-Glucosamine in few easy steps. In the first step, we have obtained the imine derivatives **2a** or **2b**. The resultant imines were protected in the OH groups at C1, C3, C4 and C6 positions with acetyl group.

Selective desprotection of C2 aminogroup and coupling with cinnamic acid afforded compound **5**.

All compounds were tested as antimicrobial agents against gram-positive and gram-negative microorganisms. Best results were obtained when compound **2b** was used.

Keywords: Glucosamine, antimicrobial activity, Schiff base, diffusion disc, microdiffusion.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac₂O - Anidrido acético;

°C - Graus Celsius;

CIM - Concentração inibitória mínima;

DCC - Dicicloexilcarbodiimida;

DMSO - Dimetil sulfóxido;

ET₃N - Trietilamina;

min - Minutos;

Py - Piridina;

RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze;

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Rendimentos e condições de reação para todas as etapas da dos derivados da glucosmina | 39 |
| Tabela 2 - Resultados, em cm, dos halos de inibição obtidos no teste disco difusão | 40 |
| Tabela 3 - Resultados de CIM obtidos por microdiluição, em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 45 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura da Quitina | 28 |
| Figura 2 - Estrutura da Quitosana | 29 |
| Figura 3 - Atividade antimicrobiana do composto 2b | 43 |
| Figura 4 - Atividade antibacteriana frente ao microorganismo <i>Pseudomonas aureginosa</i> | 44 |
| Figura 5 - Atividade antimicrobiana frente ao microorganismo <i>Candida albicans</i> | 44 |
| Figura 6 - Cloridrato de glucosamina | 54 |
| Figura 7 - Composto 1a N - (<i>p</i> -metoxibenzilideno) D - glucosamina 1 | 54 |
| Figura 8 - Composto 1b 3 - fenilpropenilideno | 54 |
| Figura 9 - Composto 2a O – tetracetil - D - glucosamina 2 | 54 |
| Figura 10 - Composto 2b 3 - (Fenilpropenilideno) O - tetracetil - D - glucosamina | 55 |
| Figura 11 - Composto 4 N - cinamil - tetracetil - D - glucosamina | 55 |
| Figura 12 - Representação da Técnica Disco Difusão | 56 |
| Figura 13 - Representação da Técnica de Microdiluição | 57 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS | 19 |
| 2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 21 |
| 2.3 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 22 |
| 2.4 ASSOCIAÇÃO DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS | 24 |
| 2.5 CONSIDERAÇÕES DOS MICROORGANISMOS TESTADOS | 25 |
| 2.6 CARBOIDRATOS E QUÍMICA | 26 |
| 2.7 QUITINA E QUITOSANA | 27 |
| 2.8 GLUCOSAMINA | 31 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 34 |
| 3.1 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS | 34 |
| 3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 40 |
| 3.3 MICRODILUIÇÃO | 45 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 4.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR | 49 |
| 4.1.1 Rota-Evaporadores | 49 |
| 4.1.2 Solventes e Reagentes | 49 |
| 4.1.3 Equipamentos | 49 |
| 4.2 METODOLOGIA | 50 |
| 4.2.1 Preparação <i>N</i> - (<i>p</i> -metoxibenzilideno) <i>D</i> - glucosamina 1 | 50 |
| 4.2.2 Preparação do <i>O</i> - tetracetil - <i>D</i> - glucosamina 2 | 50 |
| 4.2.3 Preparação do 3 - fenilpropenilideno | 51 |
| 4.2.4 Preparação do Tetracetilglucosamina | 51 |
| 4.2.5 Preparação 3 - (Fenilpropenilideno) <i>O</i> - tetracetil- <i>D</i> - glucosamina 4 | 52 |
| 4.2.6 Preparação do <i>N</i> - cinamil – tetracetil – <i>D</i> - glucosamina | 52 |
| 4.2.7 Atividade Antimicrobiana | 53 |
| 4.2.8 Teste de difusão em ágar ou disco difusão | 55 |
| 4.2.9 Microdiluição | 56 |
| 5 CONCLUSÃO | 59 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| 7 ANEXOS | 66 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a resistência bacteriana é um sério problema de saúde, que atinge a população. A disseminação do uso de antibióticos fez com que algumas bactérias desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o consequente aparecimento da resistência. Este fenômeno impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (RANG, 2001; VARALDO, 2002).

A busca por novos agentes antimicrobianos, principalmente, de fontes naturais, vem ganhando destaque. Os vegetais constituem uma enorme e importante fonte de produtos naturais que são biologicamente ativos, sendo que muitos destes podem ser utilizados como modelos para a síntese de inúmeros fármacos (WALL, 1996).

Derivados de plantas como os óleos essenciais têm sido muito utilizados em indústrias de alimentos como aromatizantes. Dentre eles o óleo de canela tem despertado um grande interesse entre os pesquisadores devido sua potencial atividade antimicrobiana (HELANDER et al., 1998).

O cinamaldeído é o componente principal do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* espécie da família Lauraceae que apresenta várias atividades como, por exemplo, atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SINGH, MAURYA, de LAMPASONA e CATALÃO, 2007).

Por outro lado, os carboidratos existem, difundidos em toda a natureza e alguns existem praticamente puros, tais como: sacarose, glicose, frutose, amido e celulose, este último no algodão, na madeira e papel. É bem estabelecido que os carboidratos desempenhem importantes atividades em sistemas biológicos, e isto atrai a atenção de muitos pesquisadores. O interesse no desenvolvimento de derivados com aplicação farmacêutica tem ganhado cada vez mais destaque, sendo que nos últimos anos têm surgido vários fármacos derivados de carboidratos.

O desenvolvimento de novos compostos com potencial antimicrobiano, de baixo custo, e que viabilizem a incorporação de agentes com atividade reconhecida, é uma área de extremo interesse, tanto para químicos, quanto farmacêuticos.

Observando o exposto, este trabalho apresenta como objetivo principal, a obtenção de compostos químicos, que venham a contribuir com o desenvolvimento de novos fármacos que tenham aplicação no combate a diferentes microorganismos, Gram-positivos, Gram-negativos. Os compostos derivados da glucosamina foram funcionalizados com produtos de origem natural, como cinamaldeído, anisaldeído e ácido cinâmico. Posteriormente o estudo da atividade antimicrobiana destes, visando à avaliação do potencial antimicrobiano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AGENTES ANTIMICROBIANOS

O termo agente antimicrobiano começou a ser utilizado a partir da descoberta da penicilina, por Fleming, em 1929. Os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados desta maneira. Algumas classificações são propostas para os antibióticos, de acordo com diferentes critérios classifica-os de acordo com sua origem, química, farmacocinética e farmacodinâmica. (SILVA, 1998; SOUZA, 2003).

Um agente antimicrobiano classifica-se como um produto químico natural ou sintético, que mata ou inibe o crescimento de microorganismos. Agentes que matam microorganismos são denominados, como os agentes bactericidas, fungicidas e viricidas. Um agente bactericida mata bactérias e pode ou não matar outros tipos de microorganismos. Agentes que não matam, mas inibem o crescimento de microorganismos são denominados agentes bacteriostáticos, fungistáticos e viristáticos (MADIGAN et al, 2004).

Quando se faz necessário, a utilização de um antibiótico para tratar uma infecção bacteriana. É de grande importância estabelecer a sensibilidade do microorganismo a agentes antimicrobianos. Desta forma, devem-se levar em conta alguns fatores como: o hospedeiro, a exposição prévia a antibióticos, idade, função hepática e renal, local da infecção, administração concomitante de outras drogas que possam interagir com os antibióticos e comprometimento do sistema imune (RANG, 2001).

Muitos dos microorganismos são classificados como gram-positivos ou gram-negativos. Estes microorganismos diferem em alguns aspectos, fato este, que possui implicações na ação dos antibióticos. A parede celular dos microorganismos gram-positivos é uma estrutura relativamente simples, de 15-50 nm de espessura cerca de 50% de peptidoglicano. Em contraste, a parede celular dos microorganismos gram-negativos é muito mais complexa, uma camada de peptidoglicano de 2 nm de espessura que constitui 5% da massa da parede celular (RANG, 2001).

A sensibilidade dos microorganismos aos antibióticos ou a agentes antimicrobianos é muito variável, bactérias gram-positivas geralmente são mais sensíveis aos antibióticos do que as bactérias gram-negativas. Os antibióticos que atuam

tanto em uma bactéria gram-positiva quanto gram-negativas são denominados de antibióticos de amplo espectro (MADIGAN *et al.*, 2004).

Definem-se como antibióticos os compostos químicos produzidos por microorganismos, que inibem ou matam outros microorganismos. Os antibióticos diferenciam-se dos análogos por serem produtos naturais (produtos da atividade microbiana) em vez de compostos químicos sintéticos (MADGAN, 2004).

Os antibióticos constituem a classe mais prescrita de fármacos. Eles são utilizados para diversas finalidades: (1) combate a infecções sistêmicas, circulatórias, respiratórias, geniturinárias, gastrointestinais, oftálmicas, ósseas, (2) profilaxia de infecções em indivíduos sadios e doentes (ANDREJUS e JOSEPH, 1988).

O antibiótico ideal deve apresentar toxicidade seletiva porque interferem na função vital das bactérias sem comprometer as células hospedeiras. Por exemplo, diferentemente das células de mamíferos as bactérias possuem uma parede celular. Portanto, as drogas que interferem na produção da parede celular da bactéria são tóxicas para a bactéria e não para o hospedeiro (PAGE, 2004).

Agentes antimicrobianos, que possuem toxicidade seletiva são especialmente úteis no tratamento de doenças infecciosas, uma vez que podem ser utilizados para matar os microrganismos causadores de doenças, sem causar danos ao hospedeiro (MADIGAN *et al.*, 2004).

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos incluem os principais pontos: inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; Inibição da função da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; Inibição da síntese de proteínas, inibição da tradução e transcrição do material genético; inibição da síntese de Ácido nucléico (SILVA *et al.*, 1998, TORTORA *et al.*, 2001).

Os quatro mecanismos dos agentes antimicrobianos são os seguintes (Pager, 2004):

- Antibióticos inibidores da síntese da parede celular: Os antimicrobianos que atuam nesta classe são os β -lactâmicos. Estes compostos possuem um anel de nitrogênio contendo o grupamento β -lactâmico e interferem na síntese da parede celular bacteriana,

principalmente por inibirem a ligação cruzada das cadeias laterais da parede celular da bactéria. Os β -lactâmico são principalmente bactericidas.

- Antibióticos inibidores da síntese de proteínas bacterianas: Os antimicrobianos que atuam nesta classe são os aminoglicosídeos, tetraciclina e macrolídeos etc. Essas drogas exibem uma toxicidade seletiva por inibirem a síntese proteica bacteriana a um grau muito maior do que inibe a síntese proteica da célula hospedeira. A maioria destas drogas é predominantemente bacteriostática.

- Antibióticos inibidores da síntese do ácido desoxirribonucléico das bactérias: Os antimicrobianos que atuam nesta classe são as quinolonas, inibem o ácido desoxirribonucléico (DNA) girase, enzima responsável pelo enrolamento, espiralamento e fechamento do DNA bacteriano. As quinolonas são predominantemente bactericidas.

- Antibióticos inibidores da síntese do ácido ribonucléico bacteriano: Os antimicrobianos que atuam nesta classe são as rifamicinas, inibem a síntese do RNA bacteriano por inibirem a RNA polimerase DNA-dependente.

Atualmente, a maioria dos agentes antibacterianos e antifúngicos são derivados da fermentação de produtos naturais, grande parte deles é modificada quimicamente com a finalidade de melhorar atividade farmacológica (MIMIS *et al.*, 2000).

Os testes de susceptibilidade tornaram-se importantes, principalmente devido ao aumento de infecções e ao concomitante aparecimento de resistência aos agentes antimicrobianos (REX *et al.*, 2001). Estes testes podem ser usados na pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos (GULLECE *et al.*, 2006).

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os métodos mais utilizados para a determinação do potencial antimicrobiano são os de difusão em ágar e de diluição em caldo. O método de difusão em ágar (Kirky-Bauer) ou disco difusão é um teste qualitativo obtido pela aplicação de pequenos discos de papel embebidos com a substância sob análise sobre o ágar. A partir do disco o antimicrobiano se difunde no ágar, em concentrações decrescentes. A cepa bacteriana semeada na placa cresce até encontrar a concentração inibitória mínima. Onde ocorre a

formação de um halo de inibição ao redor do disco. Determina-se diâmetro do halo e conclui se a bactéria é sensível ou resistente (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

O método de diluição é utilizado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microorganismo. Os antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como concentração inibitória mínima CIM (MURRAY, 1999).

O método de diluição consiste na observação do comportamento de cepas bacterianas frente a concentrações crescentes do antimicrobiano em tubos de ensaio com meios de cultura líquidos, podendo-se identificar a CIM por meio da turvação do meio (FUCHS, WANNMACHER e FERREIRA, 2006).

A técnica de microdiluição consiste no uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 poços de fundo redondo ou cônico estéreis, próprios para a microdiluição. Algumas vantagens referentes à técnica de microdiluição incluem a utilização de pequenos volumes de reagentes e a avaliação de grande número de bactérias de modo simples e econômico (KONEMAN, 2001).

2.3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas tornou-se um problema grave em hospitais e comunidades, o que lamentavelmente fez com que as bactérias desenvolvessem defesas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência aos antimicrobianos (VARALDO, 2002).

Define-se como resistência antimicrobiana a capacidade que o microorganismo tem de resistir a um agente quimioterápico ao qual é normalmente suscetível. A maioria das resistências antimicrobianas envolve o desenvolvimento de genes de resistência, que são transferidos por meio de troca genética (BROKS, BUTEL e MORSE, 2000).

A resistência bacteriana de diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (WISE, 2003).

Alguns microorganismos são naturalmente resistentes a certos antibióticos. Há várias razões para o microorganismo apresentar esse tipo de resistência: (1) O organismo pode ser desprovido de parede celular bacteriana, o que o torna resistente às penicilinas, (2) O organismo pode ser impermeável ao antibiótico a maioria das bactérias gram-negativas são impermeáveis á penicilina G, (3) O organismo pode ser capaz de modificar o antibiótico para uma forma inativa como o estafilococos que produz β - lactamases que clivam o anel β - lactâmico da maioria das penicilinas (BROKS, BUTEL e MORSE, 2000).

Os mecanismos de resistência podem ser classificados de maneira ampla em quatro tipos principais: (1) bactérias produzem enzimas que inativam as drogas, (2) bactérias sintetizam alvos modificados para os quais as drogas são ineficazes, (3) bactérias alteram sua permeabilidade de forma que a concentração intracelular de uma determinada droga não é alcançada, (4) bactérias exportam drogas ativamente usando uma “bomba de multirresistência as drogas” (LEVINSON, JAWETZ; 2008).

Na maioria dos casos, a resistência às drogas ocorre devido a modificações genéticas no organismo, mediada por mutação cromossomal; é devida a uma mutação do gene que codifica para o alvo da droga ou para o sistema de transporte na membrana que controla a entrada da droga na célula, mediada por um plasmídeo; São moléculas de DNA de dupla fita circulares e extracromossomais que carregam os genes para uma variedade de enzimas que podem degradar antibióticos e modificar o sistema de transporte, mediada por tranposons; são seqüências genéticas transferidas dentro ou entre grandes frações de DNA, como o cromossomo bacteriano e os plasmídeos (LEVINSON e JAWETZ, 2008).

Os mecanismos gerais de resistência dos agentes aos antimicrobianos são (FUCHS, WANNMACHER, FERREIRA, 2006):

Resistência natural ou intrínseca: Ocorre quando espécies bacterianas são naturalmente resistentes aos antibacterianos. O principal mecanismo é a inexistência de sistema metabólico ou organela, alvos da ação do antimicrobiano no organismo. Os antibióticos betalactâmicos que agem em nível de parede celular são ineficazes quando o microorganismo é desprovido de parede celular, como *Mycoplasma pneumoniae*.

Resistência fisiológica: Os biofilmes constituem o exemplo mais típico desta classe. Ocorre somente em bactérias fixadas em superfícies, dificultando a penetração dos agentes antimicrobianos, e conseqüentemente, tornando o ambiente favorável para trocas genéticas entre os microorganismos. As bactérias podem produzir biofilmes em superfícies inanimadas, como cateteres e outros instrumentos médicos, e em superfícies orgânicas (lentes de contato, placas dentárias e outras). *Pseudomonas aureginosa* destaca-se entre os microorganismos capazes de produzir biofilmes.

Resistência adquirida: Desenvolvimento de novos mecanismos de defesa ante a exposição continuada aos agentes antimicrobianos. Pode ocorrer através de mutação ou transferência horizontal de material genético. A mutação ocorre em material genético próprio da bactéria, resultando em prole resistente ao agente antimicrobiano. A resistência por transferência ocorre de indução da síntese de DNA extracromossômico, orientando a síntese de enzimas e outras substâncias que inativem ou antagonizem o antimicrobiano. O DNA pode estar na forma de plasmídeo ou transposomas.

Os testes de susceptibilidade tornaram-se importantes, principalmente, devido ao aumento de infecções e ao concomitante aparecimento de resistência aos agentes antimicrobianos e antifúngicos. Estes testes podem ser usados na pesquisa de sensibilidade aos antimicrobianos, como também na busca por novos fármacos (REX et al., 2001; GULLECE *et al.*, 2006).

2.4 ASSOCIAÇÕES DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

A associação de antimicrobianos pode resultar em benefícios ou malefícios ao tratamento, e também produzir sinergia que consiste do efeito sobre um mesmo microorganismo, pode ser utilizado para diminuição de dose que conduz a menos efeitos tóxicos de cada um dos fármacos associados. O antagonismo entre antimicrobianos e o aumento de efeitos adversos constituem de malefícios (FUCHS, WANNMACHER, FERREIRA, 2006).

O sinergismo é caracterizado pela interação de dois ou mais antibióticos produzindo um efeito superior ao obtido pela simples soma de seus efeitos individuais. Como exemplo, pode-se citar o uso de penicilinas com aminoglicosídeos. A penicilina

inibe a síntese da parede celular do microrganismo, enquanto o aminoglicosídeo inibe a síntese protéica (JACKSON *et al.*, 1998).

O antagonismo é o fenômeno no qual o efeito de um medicamento reprime o efeito de outro quando utilizados simultaneamente. Um exemplo é a combinação de penicilina (bactericida) com tetraciclina (bacteriostático) (YOUNG *et al.*, 1994).

2.5 CONSIDERAÇÕES DOS MICROORGANISMOS TESTADOS

- *Enterococcus faecalis*: São cocos gram-positivos, esses microrganismos são membros comuns da microbiota endógena do trato gastrointestinal e biliar e, em menor proporção na vagina e da uretra masculina. As espécies de *Enterococcus* causam infecções complicadas no trato urinário, bacteremia, endocardite e infecções intra-abdominais. Os fatores de risco para bacteremia incluem imunossupressão e debilidade, causados por prematuridade, diabetes e infecções de localização profundas (úlceras).

- *Staphylococcus aureus*: Coco gram-positivo, anaeróbio facultativos geralmente encontrados na pele e em mucosas do homem e de outros animais. Embora esses microrganismos façam parte da microbiota humana normal, podem produzir infecções oportunistas importantes. *S. aureus* pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas até infecções sistêmicas potencialmente fatais.

- *Listeria monocytogenes*: Bacilo gram-positivo, este gênero abrange uma ampla variedades de fontes, como água doce, água salgada, esgoto, solo, forragem, fertilizantes e vegetais em decomposição. Apesar de sua ampla distribuição no meio ambiente, a maioria das pessoas corre pequenos riscos de desenvolver algum tipo de infecções causadas por *L. monocytogenes*. Entretanto estas infecções podem ser graves como no caso da listeriose que ocorre em epidemias causadas por alimentos. Os alimentos envolvidos como origem de *L. monocytogenes* leite, couve-flor, repolho, frango mal cozido entre outros. As pessoas que tem maiores riscos de adquirir a listeriose são as mulheres grávidas, os idosos e os indivíduos imunossuprimidos.

- *Salmonella spp*: Bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, causa intoxicação alimentar através da ingestão de alimento, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais. As salmonellas são primariamente patógenos de animais (aves domésticas, bovinos, pássaros, ovinos e macacos) os quais são as principais fontes de salmonelose não tifóide em humanos.

- *Pseudomonas aureginosa*: Bacilo gram-negativo, aeróbico, produz um pigmento característico verde azulado (piocianina), A infecção causada por este microorganismo ocorre principalmente entre pacientes com queimaduras, fibrose cística, transplante de órgãos e drogas endovenosas. Estas infecções são observadas em sítios onde existe a tendência de acúmulo de umidade como pacientes com traqueostomia, cateteres permanentes, queimaduras e feridas cutâneas exsudativas.

- *Klebsiella pneumoniae*: Bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro comum da microbiota endógena do colón, patógeno oportunista, amplamente distribuído na natureza e no trato gastrointestinal de humanos e animais. Pode causar infecções pulmonares que geralmente ocorre em pacientes em condições debilitantes como, alcoolismo, diabetes melitus e doença pulmonar obstrutiva crônica.

- *Escherichia coli*: Bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, membro comum da microbiota endógena do trato gastrointestinal, patógeno oportunista. Geralmente não causa problema quando permanece no GI, mas pode causar infecções graves em contato com a corrente sanguínea, este microorganismo é o principal agente responsável por septicemia e infecção do trato urinário. *E. coli* que não faz parte da microbiota humana pode causar doenças se for ingerida são denominadas enterovirulentas, entero-hemorrágicas e enterotoxigênica.

2.6 CARBOIDRATOS E QUÍMICA

Os carboidratos representam a maior fonte renovável do planeta. Entre eles destacam-se a celulose, a hemicelulose, o amido e a sacarose. Os carboidratos são utilizados industrialmente em grande escala. Por serem materiais de baixo custo e renováveis (PINHEIRO, 1998; LICHTENTHALER, 2004).

Os carboidratos existem difundidos em todos os seres vivos. São constituintes estruturais de tecidos de plantas (celulose), de alguns animais (quitina em crustáceos e

insetos) e paredes celulares de bactérias. Fazem parte das membranas celulares do DNA e RNA, que carregam importantes informações genéticas nas células, glicoconjugados com uma variedade de produtos naturais, tais como antibióticos, glicolípídios, e glicoproteínas (STICK, 2001).

Polissacarídeos são polímeros naturais, constituídos de monossacarídeos interligados através de ligações glicosídicas. A diversidade estrutural destes compostos está relacionado com a grande diversidade de açúcares e derivados (JAMES, MARYLIN, VARRO, 1997).

Os polissacarídeos apresentam uma variedade de atividades biológicas como: antivirais, antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes e antitrombóticas. Os polissacarídeos presentes nos cogumelos têm sido reportados como estimuladores do sistema imunológico, atuando como antivirais, antioxidantes e antitumorais (SAKURAI, 1995; EBINA, 1998; LO, 2005).

O segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose é a quitina, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sua presença ocorre também na parede celular de fungos e leveduras (KUBOTA, 2000).

Em sistemas biológicos, os carboidratos exercem três funções fundamentais (1) reserva de carbono, como fonte de energia e bloco de construção para a produção de outras classes de produtos naturais; (2) Suporte para estabilização mecânica; (3) na forma de glicoconjugados (LEHAMAN, 1998).

A utilização da quitosana é muito restrita, devido problemas de hidrosolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água em meio neutro,, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade (KUBOTA, 2000). Partindo do princípio que derivados de quitina e quitosana podem ser preparados a fim de se melhorar sua solubilidade em água, aumentando assim significativamente a utilização destes polímeros em diversas áreas.

2.7 Quitina e Quitosana

Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas

unidades predomina no caso de quitina, enquanto a quitosana é composta predominantemente, por unidades *D*-glicosamina (KUBOTA, 2000).

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos; sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação em meio alcalino, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KAFETIZOULOS, 1993).

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. Geralmente, é difícil de se obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta. (SINGLA, 2001; LE DUNG, 1994). As figuras 1 e 2 representam as estruturas químicas parciais da quitina e quitosana, respectivamente.

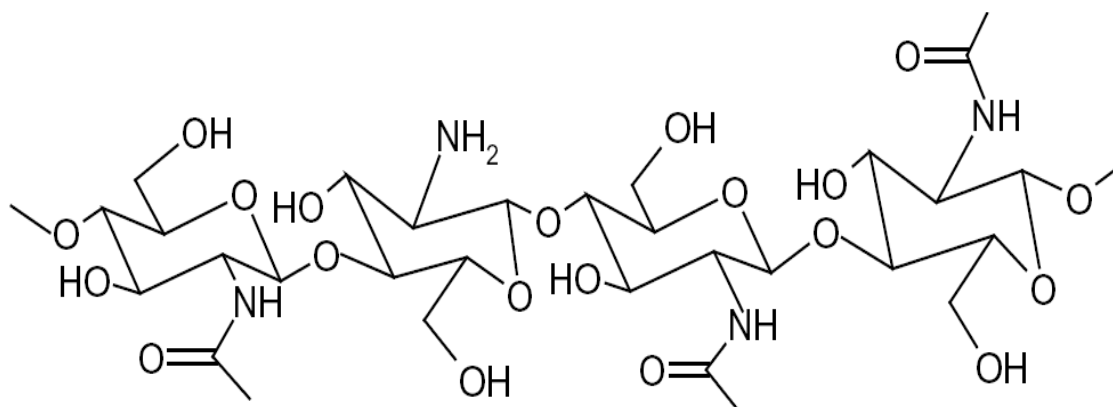


Figura 1: Estrutura da quitina

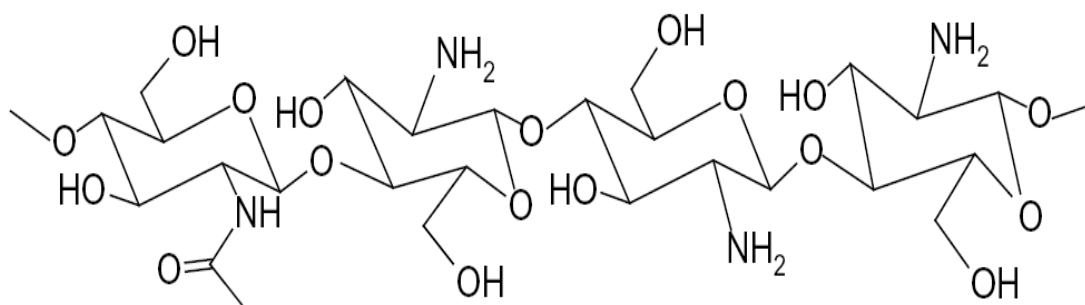


Figura 2: Estrutura da quitosana

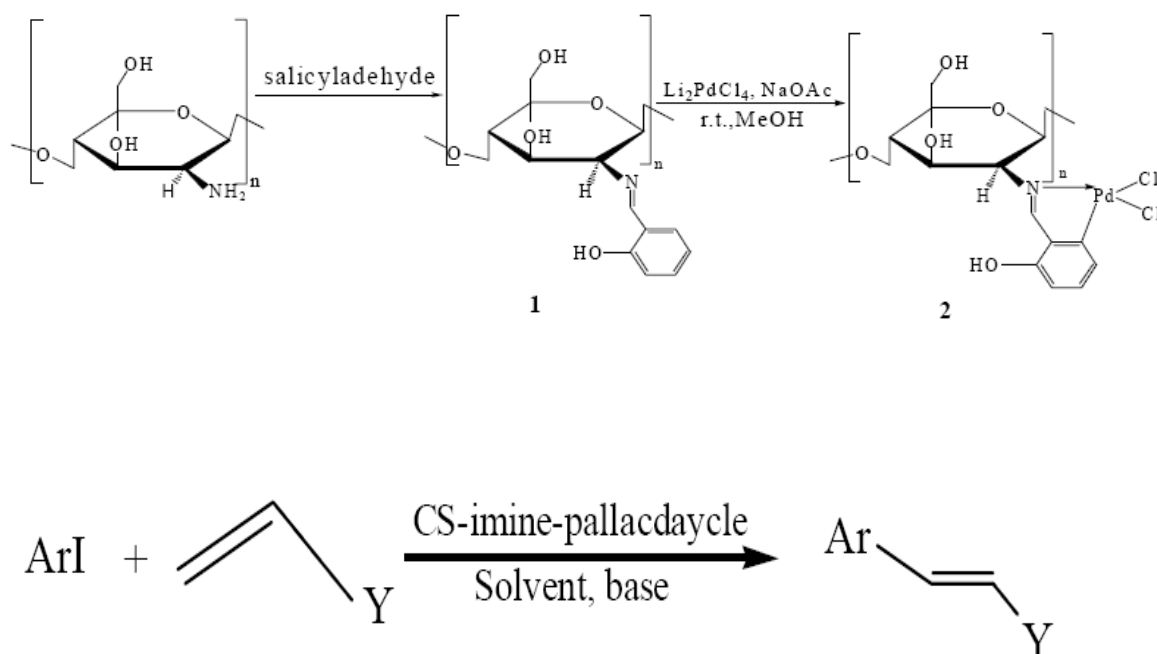
O emprego de quitina e quitosana e a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura e indústria de alimentos, mas, especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos (SKAJAK-BRAEK, 1989; MUZARELLI, 2002), e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas (NAKATSUTA, 1992; TONHI, 2002).

Reações de modificação química da quitosana, como desacetilação, N-acetilação, acilação, O-acetilação, O- e N-ftalação, O-carboximetilação, oxidação, entre outras, têm sido estudadas, de forma a preparar produtos com características específicas para determinadas aplicações. De acordo com várias estratégias químicas, um grande número de pesquisas tem sido realizado, principalmente na área farmacêutica, visando o desenvolvimento de diversas formulações (BORCHARD, 2001; KURITA, 2001).

Contudo, devido às fortes interações intermoleculares e ao caráter semicristalino, a quitosana é menos acessível a reagentes químicos que a celulose.

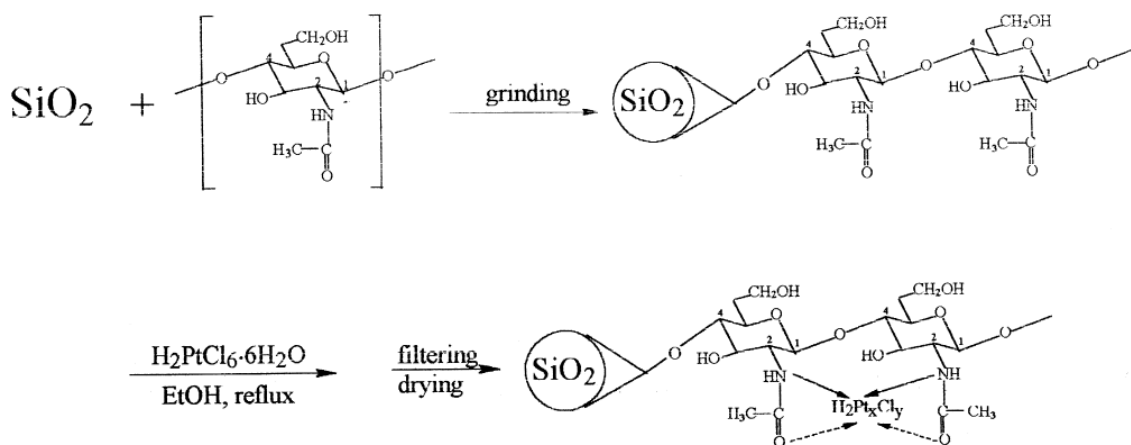
Nos últimos anos, alguns autores têm demonstrado a aplicação de quitina, quitosana ou seus derivados como catalisadores em reações orgânicas. Xu e colaboradores (2006) sintetizaram um complexo quitosana-imina paladacilo, pela formação de uma base de Schiff entre quitosana e salicilaldeído, seguido pela reação com Li_2PdCl_4 em metanol.

O complexo foi utilizado como um eficiente catalisador reciclável em reações do tipo Heck. A síntese do catalisador é demonstrada no esquema 1.



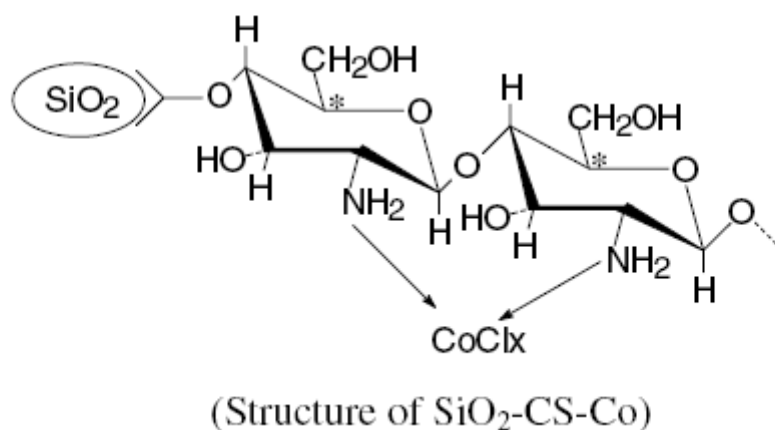
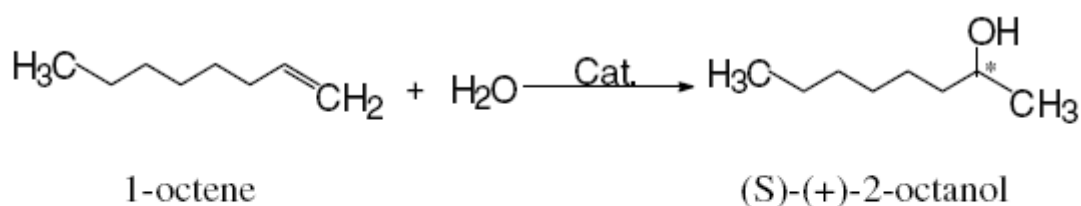
Esquema 1: Síntese e aplicação catalítica do complexo quitosana-imina paladacilo.

Yuan e colaboradores (2000) prepararam um complexo quitina-platina imobilizado sobre sílica. Este complexo mostrou ser um catalisador altamente estereosseletivo para a hidrogenação assimétrica de α -feniletanol racêmico, obtendo *R*-(+)-1-cicloexiletanol, a 30°C e hidrogênio a pressão atmosférica (esquema 2).



Esquema 2: Complexos quitina-Pt imobilizados sobre sílica.

Xue e colaboradores (2004) prepararam um novo complexo quitosana-cobalto imobilizado sobre sílica, por um método simples, pela reação da quitosana-SiO₂ com CoCl₂.6H₂O. O composto assim preparado foi utilizado como catalisador estereosseletivo na reação de hidratação assimétrica do 1-octeno à (*S*)-(+)-2-octanol, com excesso enantiomérico de até 97,8%. Esse catalisador mostrou-se muito estável e pode ser reutilizado várias vezes sem alteração na atividade catalítica (esquema 3).



Esquema 3

2.8 GLUCOSAMINA

A glucosamina é um monômero da quitosana D-glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glicose) polissacarídeo natural que pode ser obtido a partir da hidrólise ácida da quitina. A glucosamina apresenta-se na forma de amino açúcar envolvido na formação de cartilagem, onde é precursora de dissacarídeos dos glicosaminoglicanos (MORGELIN et al., 1988; JIANG, 2002).

Devido à alta concentração de glucosamina nos tecidos articulares, a hipótese de que os suplementos de glucosamina proporcionam um alívio sintomático de

osteoartrite. Existem disponíveis três formas de glucosamina: cloridrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, e N-acetil-glucosamina (D AMBROSIO et al., 1981; INSTITUTE OF MEDICINE, 2004).

Na artrite, ocorre à inflamação das articulações, sua forma mais comum é osteoartrite também conhecida como doença degenerativa das juntas, artrite degenerativa e osteoartrose (MAZIERES, 2001).

A glucosamina tem sido utilizada no tratamento de osteoartrite, pois desempenha um papel na formação de superfícies articulares, tendões, ligamentos, fluidos sinoviais, pele, osso, unhas, válvulas do coração, vasos sanguíneos e secreções mucosas dentro dos sistemas digestivo, respiratório e urinário (CARTER, 2001).

Atualmente, a Glucosamina tem ganhado destaque devido algumas características como: rápida absorção apresenta várias hidroxilas e grupamento amino o que torna fácil sua modificação (JIANG, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização deste trabalho. Inicialmente será discutida a síntese dos derivados da *D*-Glucosamina, preparados por nós, e em seguida, discutir-se-á a avaliação da atividade antimicrobiana destes compostos.

3.1 PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS

Partindo-se da idéia geral de se obter compostos químicos com alto potencial antimicrobiano, porém de baixo custo, facilmente preparados, e em poucas etapas sintéticas, pensou-se imediatamente na utilização de carboidratos naturais como material de partida. Por serem compostos altamente funcionalizados, esses compostos possuem um bom potencial sintético, sendo bastante versáteis, e possuindo muitas possibilidades de derivatização. A *D*-Glucosamina é um monossacarídeo nitrogenado, com boa flexibilidade para funcionalizações seletivas, por possuir, além de grupamentos hidroxila, também um grupo amino em sua estrutura.

A partir da proposta de obtenção de novos compostos químicos, derivados da glucosamina com potencial antimicrobiano planejamos a incorporação de produtos naturais com atividade antimicrobiana, comprovada visando a potencialização dessa atividade e facilidade de manipulação.

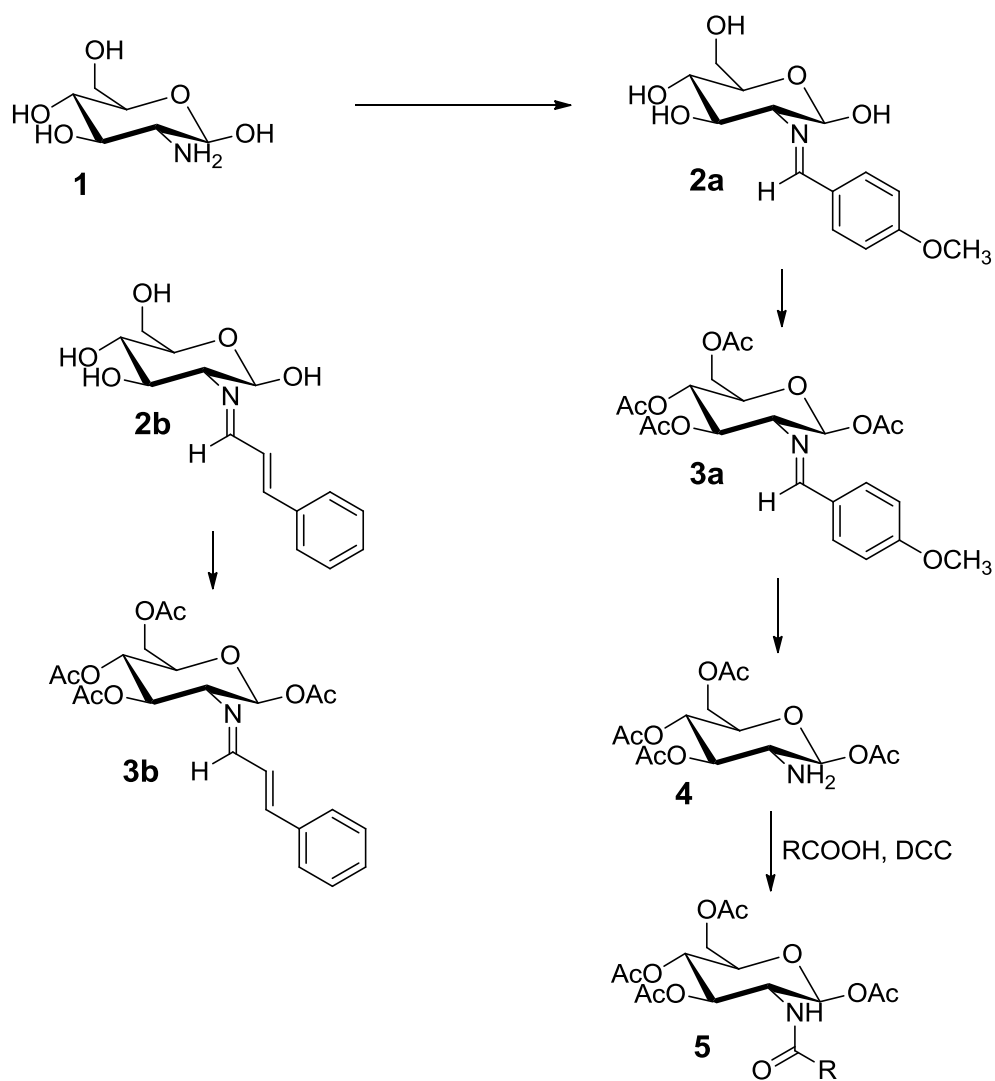
Os óleos essenciais de plantas aromáticas e seus componentes, são produtos do metabolismo secundário de plantas, apresentam muitas aplicações tais como preservação de alimentos, indústrias farmacêuticas e perfumarias (STAMMATI et al., 1999).

Muitos componentes desses óleos possuem atividades biológicas conhecidas, mas são de difícil empregabilidade, seja pela dificuldade de manipulação, obtenção em pequenas quantidades, e/ou volatilidade, entre outros fatores. Neste contexto, o cinamaldeído e o anisaldeído apresentaram-se como bons candidatos ao nosso estudo.

O cinamaldeído é o principal constituinte do óleo essencial da casca de canela *Cinnamomum zeylanicum* espécie da família Lauraceae compreende cerca de 250 espécies distribuídas na Índia, China, Sri Lanka e Austrália . A composição do óleo essencial é muito variável, de 60 a 90% de aldeído cinâmico e 10% de eugenol na casca e 10% de aldeído cinâmico e 60 a 95% de eugenol nas folhas. (ALBUQUERQUE, 1989). Estudos anteriores sobre as atividades bioquímicas do *Cinnamomum* comprovam seu potencial que inclui atividade antimicrobiana, antioxidante (SINGH, MAURYA, de LAMPASONA, CATALÃO, 2007). Mas, devido sua alta volatilidade, é de difícil utilização.

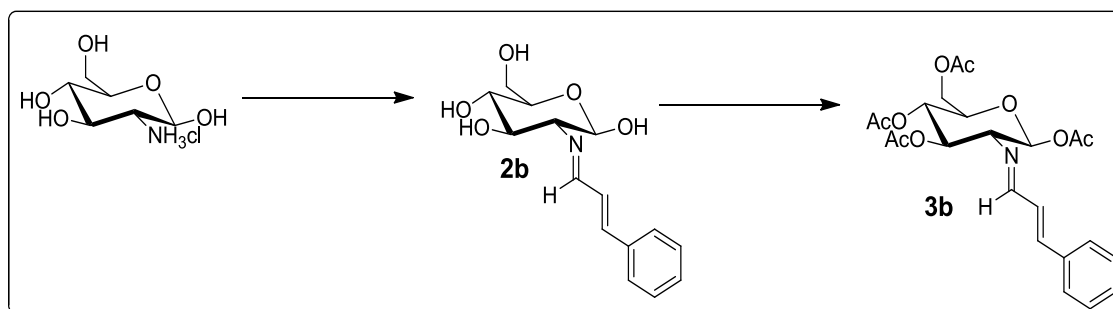
Inicialmente, pensamos na sua imobilização sobre uma base sólida, de forma a ocorrer à liberação curta, e assim na presença maior prolongamento do princípio ativo.

Nesse sentido, propomos a rota sintética, representada no esquema a seguir para a síntese dos compostos 1-4.



Esquema 4

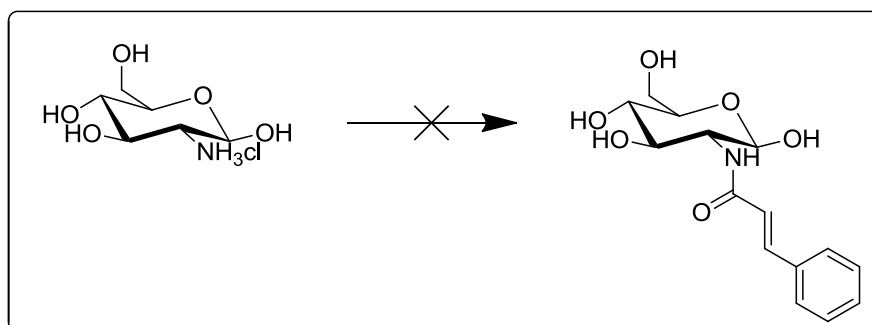
Analisando o esquema 4, observamos a síntese dos compostos **2b** e **3b**. A síntese destes compostos foi adaptada a partir da metodologia proposta por Bergmann e Zervas (1931), conforme o esquema 5.



Esquema 5

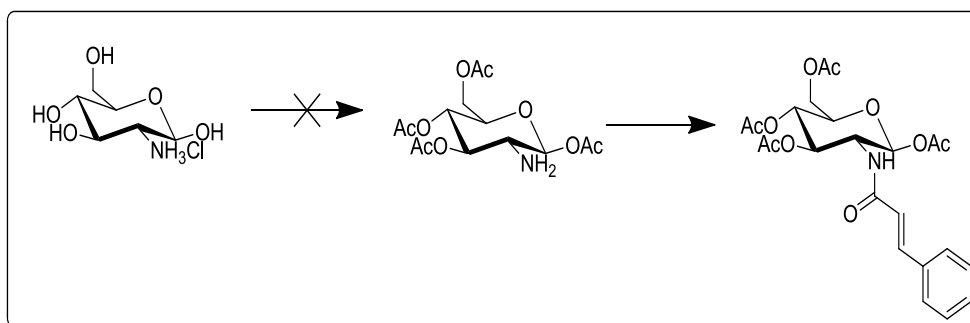
O composto **2b**) foi obtido com um bom rendimento (80%) de forma pura, após recristalização. A acetilação das hidroxilas anoméricas e dos carbonos 3,4 e 6 da glucosamina se deu pela reação com anidrido acético em presença de piridina como solvente e base. Para identificar se a atividade antimicrobiana se deve exclusivamente pela presença da ligação imina entre o cinamaldeído e a glucosamina, ou pela estrutura dos compostos obtidos, propomos a síntese do composto **5**. Este composto difere do produto **3b** apenas pela substituição da ligação C = N (imina) entre o C₂ da glucosamina e a função aldeído do cinamaldeído, por uma amida. Para isso deveríamos utilizar com o material de partida ácido cinâmico (6).

Ao tentarmos a reação de acoplamento entre a glucosamina e ácido cinâmico na presença de DCC, não foi possível a obtenção do produto esquerdo, seja pela ocorrência de reações paralelas, das hidroxilas da glucosamina, ou pelas características estruturais do produto, que mantém sua alta polaridade e é de difícil separação (Esquema 6).



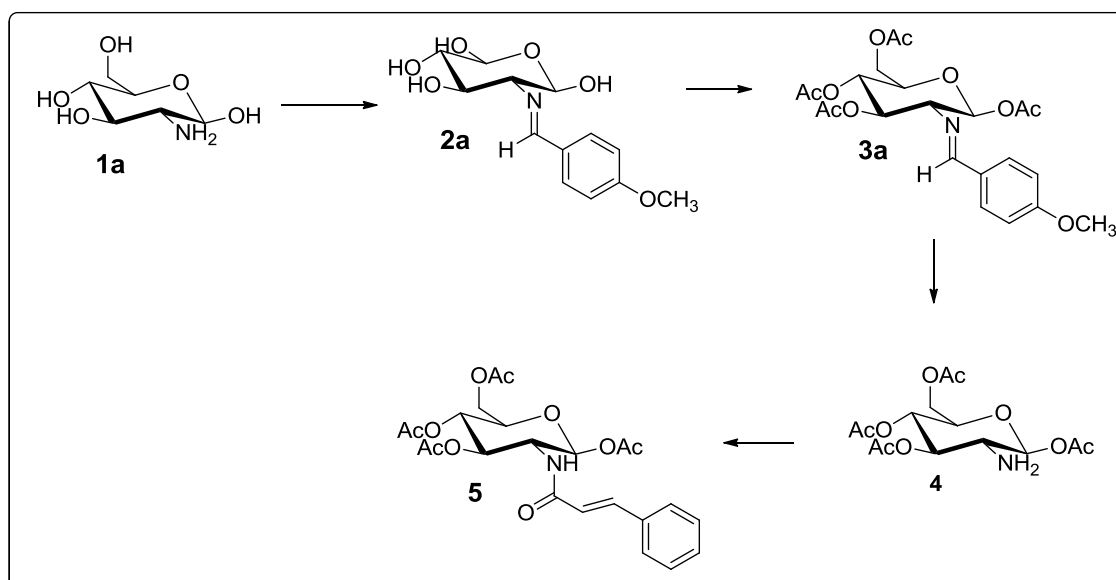
Esquema 6

A proteção seletiva somente das hidroxilas da glucosamina é inviável. A maior nucleofilicidade do grupamento amina, quando comparado com álcoois primários ou secundários, faz com que o nitrogênio seja acetilado mais rapidamente que as hidroxilas (Esquema 7). Por outro lado, a acetilação total da glucosamina, e posteriormente a desacetilação seletiva do nitrogênio não é possível, devido à maior estabilidade da ligação amida, em comparação ao grupamento éster.



Esquema 7

Baseado na metodologia inicial também utilizada para obtenção dos compostos **2b** e **3b**, pensamos na utilização do grupamento imino como um grupo de proteção para o nitrogênio. Assim, no esquema abaixo (Esquema 8) apresentamos a estratégia de obtenção dos compostos **1 – 5**, de maneira seletiva, e com bom rendimento.



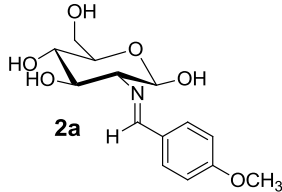
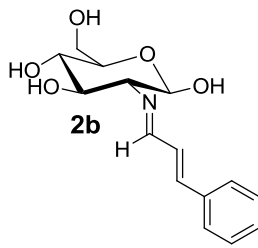
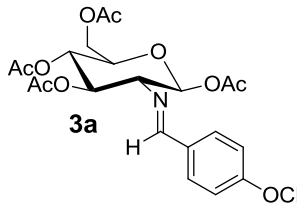
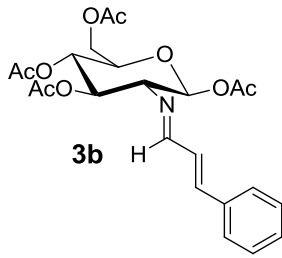
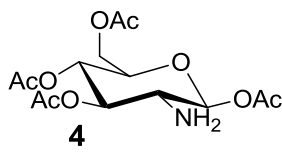
Esquema 8

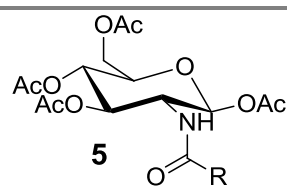
Na primeira etapa foi feita a proteção do grupamento amino, pela reação da *D*-glucosamina com *p*-anisaldeído, levando à imina **2a**. Este composto foi acetilado nas hidroxilas, levando ao derivado tetra-acetilado **3a**. A partir dessa etapa, foi feita a desproteção seletiva do grupamento imino. Essa desproteção ocorre rapidamente, de forma seletiva, pela reação do composto **3a** com HCl a quente, levando à

Tetraacetilglucosamina **4**. Pelo acoplamento do composto **3** com ácido cinâmico, na presença de DCC, como auxiliar de acoplamento, foi obtido o composto **5**.

Na Tabela 1, são apresentados os rendimentos, bem como as condições reacionais para a obtenção dos compostos **1-5**.

Tabela 1: Rendimentos e condições de reação para todas as etapas da dos derivados da glucosmina **1- 5**:

| Produto | Reagentes | Solvente | t (h) | Rendimento (%) |
|--|-----------------------|--------------------------|-------|----------------|
|  2a | <i>p</i> -anisaldeído | NaOH _{aq} 1N | 3 | 80 |
|  2b | Cinamaldeído | NaOH _{aq} 1N | 3 | 74 |
|  3a | 2a | Py | 24 | 69 |
|  3b | | | | |
| | 2b | Py | 24 | 65 |
|  4 | 2a | Acetona | 0,5 | 57 |

| | | | | |
|---|----------|---------------------------------|----|----|
|  | 3 | CH ₂ Cl ₂ | 24 | 53 |
|---|----------|---------------------------------|----|----|

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método disco de difusão, realizados em triplicata para evitar qualquer tipo de interferência, sendo os resultados dos halos de inibição apresentados na tabela a seguir:

Tabela 2: Resultados, em cm, dos halos de inibição obtidos no teste disco difusão.

| <i>Bactérias</i> | <i>Compostos</i> | <i>Média</i> | <i>DP</i> | <i>DPR (%)</i> |
|------------------------------|------------------|--------------|-----------|----------------|
| <i>Candida albicans</i> | A | - | - | - |
| | B | 2,1 | 0,17 | 8,25 |
| | C | 1,3 | 0,0 | 0,0 |
| | 2a | 0,73 | 0,06 | 7,87 |
| | 2b | 0,93 | 0,06 | 6,18 |
| | 3a | 0,7 | 0,05 | 7,87 |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | A | - | - | - |
| | B | 2,1 | 0,1 | 4,76 |
| | C | 2,4 | 0,1 | 4,16 |
| | 2a | 0,93 | 0,05 | 6,18 |
| | 2b | 1,43 | 0,05 | 4,02 |
| | 3a | 0,83 | 0,05 | 6,92 |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | A | - | - | - |
| | B | 2 | 0,05 | - |
| | C | 2,3 | 0,0 | - |
| | 2a | - | - | - |
| | 2b | - | - | - |
| | 3a | - | - | - |
| | 3b | 0,7 | 0,0 | - |
| | 5 | 0,8 | 0,1 | - |
| <i>Klebsiela pneumoniae</i> | A | - | - | - |

| | | | | |
|------------------------|-----------|------|------|-------|
| | B | 1,7 | 0,0 | 0,0 |
| | C | 1,6 | 0,0 | 0,0 |
| | 2a | - | - | - |
| | 2b | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| | 3a | - | - | - |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | - | - | - |
| <i>Listeria</i> | | | | |
| <i>monocytogeneses</i> | A | - | - | - |
| | B | 1,3 | 0,0 | 0,0 |
| | C | 1,03 | 0,21 | 20,14 |
| | 2a | 0,86 | 0,06 | 6,66 |
| | 2b | 1,9 | 0,1 | 5,26 |
| | 3a | - | - | - |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> | | | | |
| <i>aureginosa</i> | A | - | - | - |
| | B | - | - | - |
| | C | - | - | - |
| | 2a | - | - | - |
| | 2b | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| | 3a | - | - | - |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | 0,8 | 0,0 | 0,0 |
| <i>Salmonella</i> | | | | |
| <i>cholerestasus</i> | A | - | - | - |
| | B | 2 | 0,0 | 0,0 |
| | C | 2,96 | 0,06 | 1,94 |
| | 2a | 0,76 | 0,06 | 7,53 |
| | 2b | 0,76 | 0,06 | 7,53 |
| | 3a | 0,7 | 0,0 | 0,0 |
| | 3b | - | - | - |
| | 5 | - | - | - |
| <i>Staphylococcus</i> | | | | |
| <i>aureus</i> | A | - | - | - |
| | B | 1,56 | 0,06 | 3,68 |
| | C | 2 | 0,0 | 0,0 |
| | 2a | 0,83 | 0,06 | 6,93 |
| | 2b | 0,76 | 0,06 | 7,53 |
| | 3a | 0,76 | 0,05 | 7,53 |
| | 3b | 0,73 | 0,05 | 7,87 |
| | 5 | 0,76 | 0,06 | 7,53 |

DP = Desvio padrão, DPR (%) = Desvio padrão relativo A = controle negativo (DMSO), B = Controle positivo Imipenem, C = Controle positivo Sulfazotrin.

Com base nos resultados obtidos, através da atividade antimicrobiana, considerou-se como atividade a presença de halo de inibição de crescimento bacteriano de qualquer tamanho, por não existir um padrão para fazer a comparação dos resultados.

O solvente utilizado como controle, DMSO não apresentou halo de inibição para nenhum dos microrganismos testados, não interferindo nas análises subsequentes.

Os agentes antimicrobianos utilizados como controle positivo foram o sulfazotrin e imipenem, onde apresentaram halos significativos frente às bactérias *Samonella*, *E. faecalis* e *C. albicans*.

Pelo método de disco difusão, observou-se que os cinco compostos derivados da glucosamina (**5**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**) apresentaram halo de inibição frente aos diferentes microrganismos testados. Exceto frente à *Klebsiella pneumoniae*.

Segundo Bandeira e colaboradores (1988), a falta de atividade antibacteriana está relacionado com a dificuldade de difusão destas substâncias. Descrevem que o teste de difusão em ágar tem uma maior eficiência com substâncias que apresentam uma maior solubilidade em água, possibilitando a difusão deste através do meio de cultura.

Outro fator que deve ser levado em conta é o peso molecular das substâncias que podem dificultar a difusão dos compostos no meio de cultura. Silva (1999) afirma que vários fatores podem ser fonte de erros tais como composição do meio de cultura, preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio de cultura, densidade do inóculo, uso de swab com excesso de caldo para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequada, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas.

A figura 3 representa atividade antimicrobiana do composto **2b**.

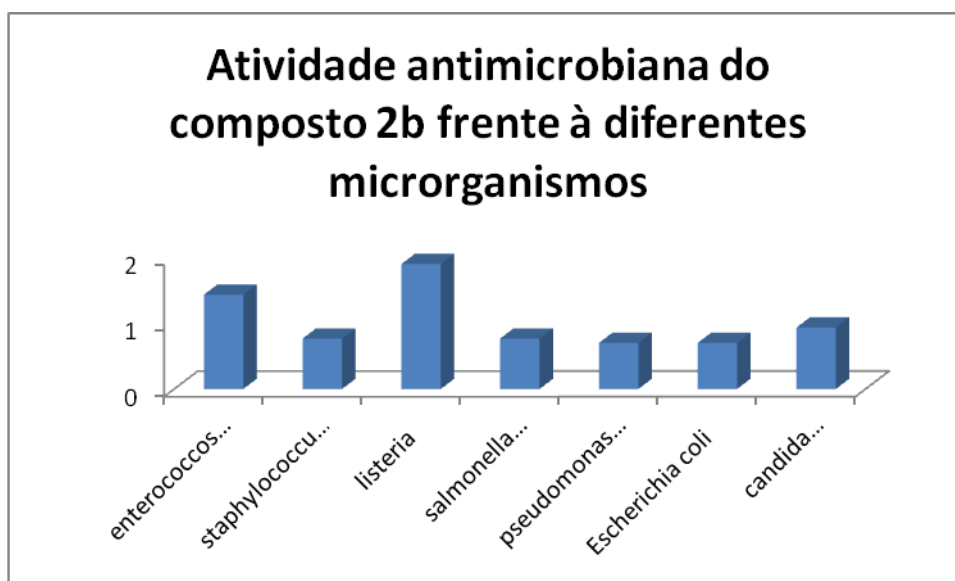


Figura 3: Representação gráfica do composto **2b**

A figura 3 representa atividade antibacteriana do composto **2b**. Entre os compostos testados o que apresentou um maior halo de inibição de crescimento foi o composto **2b** frente ao microorganismo *Listeria monocytogeneses* podendo estar relacionado com sua estrutura química. Este composto apresenta características mais polares em relação aos outros, o que o torna um composto mais solúvel, em contraste, estão os compostos acetilados que apresentam-se na forma menos polar portanto são compostos menos solúveis.

Outro aspecto que deve ser levado em conta é a funcionalização do cinamaldeído na posição 2, na literatura existem inúmeras publicações sobre a potencial atividade antimicrobiana do cinamaldeído o que comprova sua potencialidade tanto para bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e para fungos. Desta forma a variação da estrutura química revela que a posição dos grupamentos pode influenciar significativamente na atividade antimicrobiana dos compostos frente aos diferentes microrganismos.

Nesse contexto, a química orgânica através de modificações moleculares tem contribuído para muitas descobertas, observando-se um crescimento considerável de novos compostos sintéticos para uso terapêutico visando diminuir a dose administrada e muitos efeitos adversos.

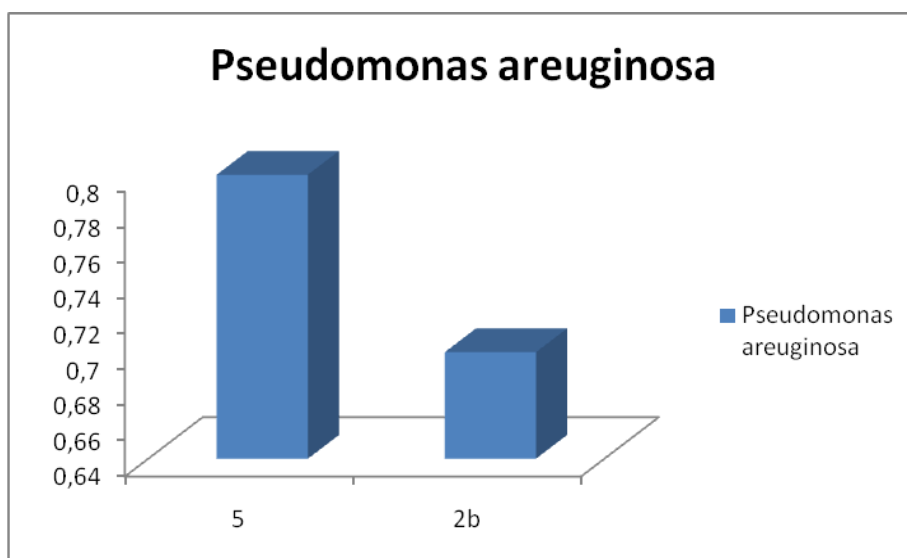


Figura 4: Representação gráfica frente ao microrganismo *Pseudomonas areuginosa*

A figura 4 representa atividade antibacteriana frente ao microrganismo *Pseudomonas areuginosa*. Embora o composto **5** não tenha apresentado atividade antibacteriana para a maioria dos compostos testados, frente ao microrganismo *Pseudomonas areuginosa* apresentou um halo de inibição significativo, porém apresentou atividade antibacteriana maior que os controles utilizados nos ensaios biológicos. (imipenem e sulfazotrin) que não apresentaram nenhum tipo de atividade contra este microrganismo.

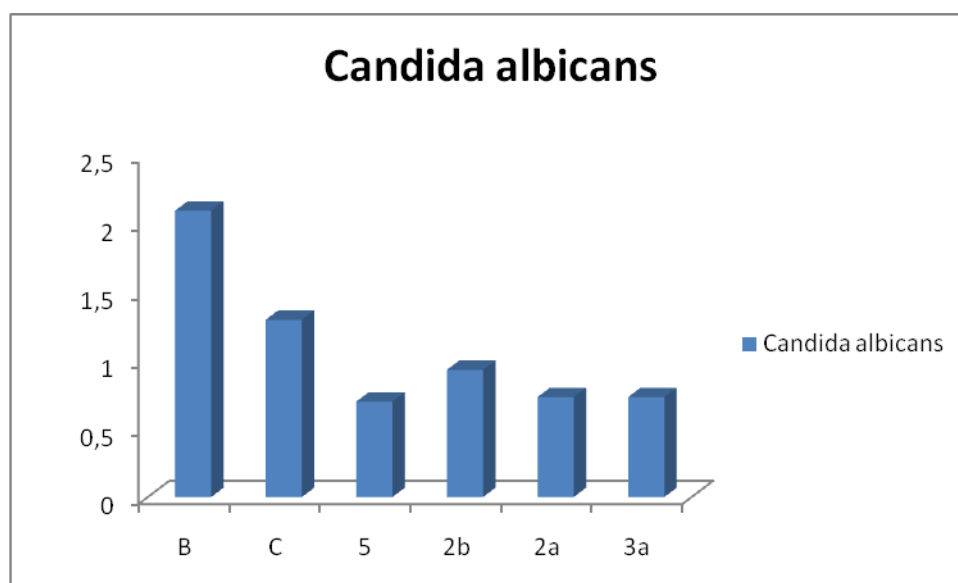


Figura 5: Representação gráfica frente à *Candida albicans*

A figura 5 representa atividade antibacteriana frente ao microrganismo *Candida albicans*. Apesar dos compostos testados (**5**, **2b**, **2a**, **3a**) não apresentarem halos significativos frente a este microrganismo, estes demonstraram atividade antibacteriana, exceto composto **3b** que não apresentou halo de crescimento frente a este microrganismo, pode estar relacionado com a estrutura química deste composto.

3.3 MICRODILUIÇÃO

Partindo dos resultados de disco difusão, somente as substâncias que demonstraram ter atividade antimicrobiana foram testadas pela técnica de microdiluição a fim de obter quantitativamente as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos testados frente às diferentes bactérias. Os resultados obtidos na microdiluição podem ser visualizados na Tabela.

Tabela 3: Resultados de CIM obtidos por microdiluição, em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

| <i>Bactérias</i> | <i>Compostos</i> | <i>Média</i> | CIM $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
|-------------------------------|------------------|--------------|-------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 2a | 5 | 1,25 |
| | 2b | 3 | 5 |
| | 1a | 5 | 1,25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 2a | 5 | 2,5 |
| | 2b | 5 | 2,5 |
| | 3a | 5 | 0,625 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2b | 5 | 1,25 |
| | 3b | 5 | 1,25 |
| | 5 | 3 | 5 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 2a | 5 | 1,25 |
| | 2b | 9 | 0,078 |
| <i>Salmonella</i> | 2b | 3 | 5 |
| | 2a | 5 | 1,25 |

| | | | |
|-----------------------|-----------|---|------|
| | 3b | 4 | 5 |
| <i>Pseudomonas</i> | 5 | 5 | 2,25 |
| <i>Aureginosa</i> | 2b | 4 | 1,25 |
| <i>Staphylococcus</i> | 3b | 4 | 2,5 |
| <i>aureus</i> | 5 | 3 | 5 |
| | 2b | 4 | 2,5 |
| | 2a | 4 | 2,5 |
| | 3a | 5 | 1,25 |

Consideramos extremamente necessário a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) destes compostos frente aos microrganismos testados, para poder determinar quantitativamente o melhor percentual de inibição de crescimento bacteriano.

Comparando-se os resultados obtidos nas diferentes técnicas utilizadas observou-se que os compostos, que apresentaram halo de inibição por técnica de disco difusão demonstraram também atividade por microdiluição, mesmo em menor concentração. Quanto a *Klebsella pnemoniae*, a microdiluição não foi realizada uma vez que nenhum dos compostos testados apresentou halo de inibição no disco difusão.

Quando comparados entre si, verifica-se que o composto **2b** foi o que apresentou melhor eficiência frente à *Listeria monocytogeneses*. Segundo Matan e colaboradores (2006) os compostos ativos presentes no óleo de canela, entre 50 a 60% de cinamaldeído que tem a capacidade de interferir com a síntese de algumas enzimas nas bactérias e também pode provocar danos na estrutura da parede bacteriana. Como já foi visto anteriormente sua maior atividade antibacteriana pode estar relacionado com a estrutura química do composto **2b**, pois ocorre a funcionalização do cinamaldeído na posição 2 da glucosamina o que lhe confere um maior potencial antimicrobiano.

Por outro lado, observou-se que frente às bactérias Gram-negativas foram necessárias maiores concentrações para inibir *E. coli*, e *Salmonella*, isto pode ser confirmado quando comparado os valores de CIM obtidos para *L. monocytogeneses*.

Uma possível explicação para as diferenças observadas quanto à sensibilidade bacteriana, pode ser atribuída às diferenças na estrutura da parede bacteriana, a presença de lipopolissacarídeo nas bactérias Gram-negativas e a ausência nas Gram-positivas permite ou não a entrada de substâncias nas bactérias.

Desta forma, observou-se que ação antibacteriana dos compostos testados, varia significativamente em função da bactéria, sendo a sensibilidade maior frente à bactéria Gram-positiva em relação à Gram-negativa, outro fator que deve ser levado em conta é a estrutura química dos compostos, Comparando-se os compostos **2a** e **2b** na forma não acetilada com os compostos (**3a** e **3b**) acetilados, verifica-se que os compostos que apresentaram uma maior atividade antibacteriana foram os compostos não acetilados, por apresentar características mais polares frente aos outros compostos.

4 MATERIAIS

4.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C, foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX, que operam na frequência de 200 MHz e 400 MHz, (Departamento de Química – UFSM). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS, utilizado como padrão interno para os espectros de RMN ¹H) e CDCl₃ (para os espectros de RMN ¹³C), colocando-se entre parênteses a multiplicidade (s = singleto, d = duplete, t = tripleto, quart = quarteto, quint = quinteto, sex = sexteto, m = multiplete), o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa e a constante de acoplamento (*J*) expressa em Hertz (Hz).

4.1.1 Rota-evaporadores

Para remoção dos solventes das soluções orgânicas, utilizou-se:

- Rota-evaporador Fisatom – Modelo 802 D;
- Linha de vácuo equipada com uma bomba de alto-vácuo Edwards modelo E2M5.

4.1.2 Solventes e Reagentes

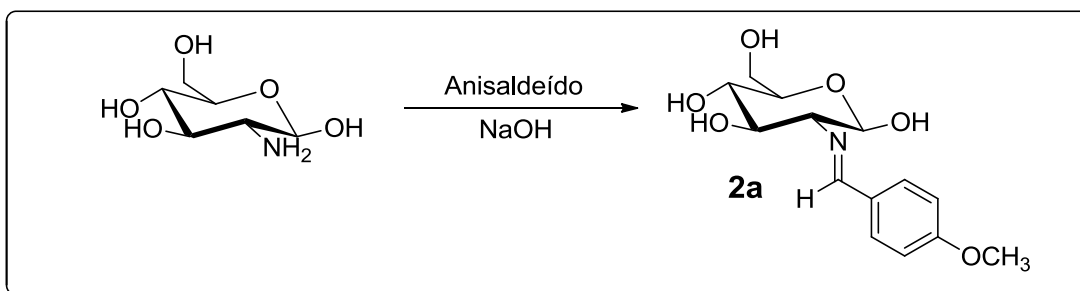
Os solventes e os reagentes utilizados para as reações foram obtidos comercialmente.

4.1.3 Equipamentos

- Autoclave: Phoenix;
- Balança analítica: BEL Engineering e Shimadzu AY220;
- Capela de fluxo laminar vertical: Pachane;
- Estufa bacteriológica: CQA Química;
- Geladeira: Consul;
- Microscópio: Euromex;

4.2 METODOLOGIA

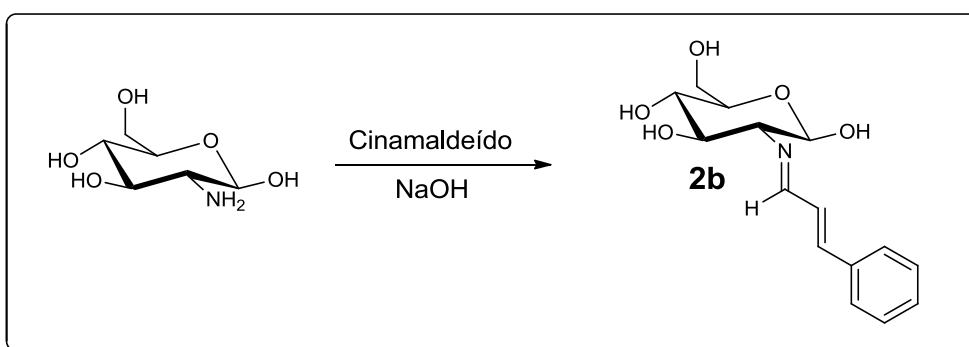
4.2.1 Preparação do Derivado **2a**:



Em um balão de fundo redondo, adicionou-se glucosamina (1g; 4,6 mmol), NaOH 1N (4,6 mL), anisaldeído (0,64g; 4,6 mmol), deixou-se o sistema reagir alguns minutos até formar um precipitado branco. Em seguida, o sistema foi resfriado por aproximadamente 3 horas. Após esse período, filtrou-se à vácuo, lavou-se o precipitado com água gelada e em seguida, com uma solução de éter e metanol (1:1). Secou-se o produto em bomba de alto vácuo.

Rendimento: 80%; RMN¹³C (DMSO-d₆, 50MHz): 161,28; 161,03; 131,81; 129,61; 129,05; 114,50; 113,87; 95,61; 78,09; 76,80; 74,54; 70,34; 67,01; 61,22; 55,26.

4.2.2. Preparação do derivado **2b**:

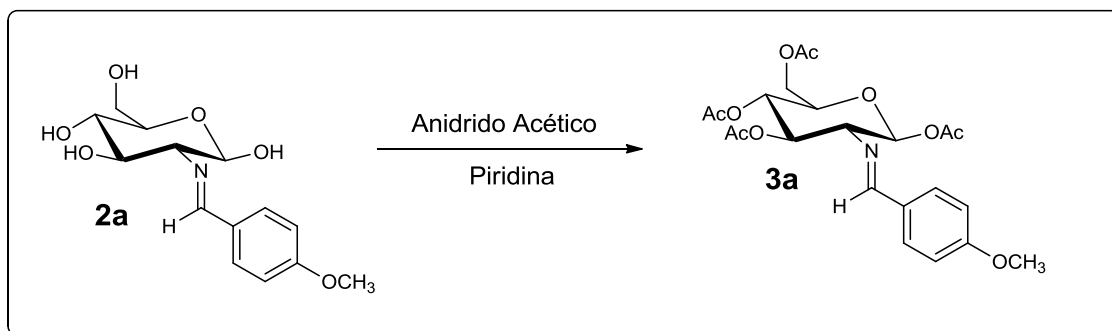


Em um balão de fundo redondo, adicionou-se glucosamina (1g; 4,6 mmol), NaOH 1N (4,5 mL), cinnamaldeído (607 mg; 4,6 mmol), deixou-se o sistema reagir alguns minutos até formar um precipitado branco. Em seguida, o sistema foi resfriado

por aproximadamente 3 horas. Após esse período, filtrou-se à vácuo, lavou-se o precipitado com água gelada. Secou-se o produto em bomba de alto vácuo.

Rendimento: 74%; RMN¹³C (DMSO-d₆, 50MHz): 163,86; 141,26; 135,88; 129,20; 129,02; 128,47; 127,33; 95,72; 78,43; 77,03; 74,71; 70,42; 67,19; 61,39.

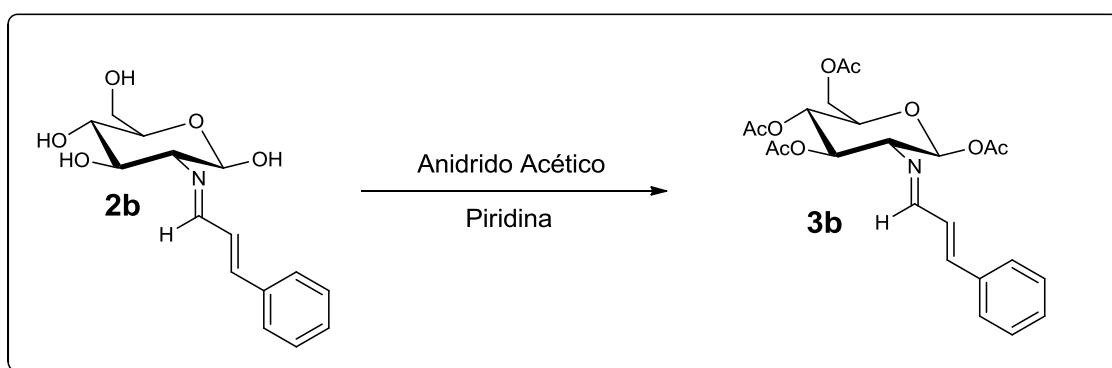
4.2.3 Preparação do derivado **3a**:



Em um balão de fundo redondo, adicionou-se anidrido acético (3 mL) e piridina (6 mL) deixou-se em banho de gelo por 15 minutos, a seguir adicionou-se *N*-(*p*-metoxibenzilideno) glucosamina **2a** (800 mg). Deixou-se sob agitação por 5 minutos a 0 °C. E em seguida, deixou-se sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Verteu-se a mistura reacional sob água gelada (10 mL) e deixou-se em repouso na geladeira por aproximadamente 2 horas. Filtrou-se e secou-se sob vácuo.

Rendimento: 69%; RMN¹³C (CDCl₃, 50MHz): 170,38; 169,66; 169,27; 168,48; 164,11; 162,37; 130,14; 128,47; 114,10; 93,25; 73,38; 72,98; 72,87; 68,37; 61,97; 55,30; 20,56; 20,52; 20,47; 20,31.

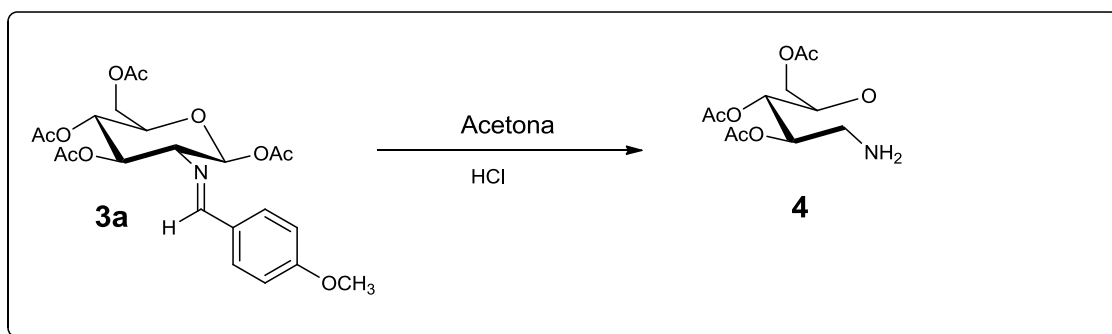
4.2.4 Preparação do derivado **3b**:



Em um balão de fundo redondo, adicionou-se anidrido acético (3 mL) e piridina (6 mL) deixou-se em banho de gelo por 15 minutos, a seguir adicionou-se o composto **2b** (1g). Deixou-se sob agitação por 5 minutos a 0 °C. E em seguida, deixou-se sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Vertereu-se a mistura reacional sob água gelada (10 mL) e deixou-se em repouso na geladeira por aproximadamente 2 horas. Filtrou-se e secou-se sob vácuo.

Rendimento: 65%; RMN¹³C (CDCl₃, 50MHz): 170,63; 169,85; 169,51; 168,63; 166,74; 143,92; 135,07; 129,76; 128,90; 127,47; 127,28; 93,04; 73,18; 72,96; 72,73; 67,99; 61,77; 20,78; 20,72; 20,64; 20,52.

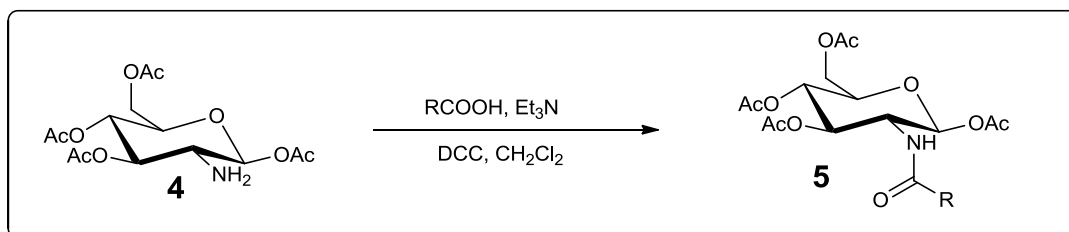
4.2.5 Preparação do derivado **4**:



Em um balão de fundo redondo, adicionou-se produto **3a** (800mg; 2 mmol), mais 10mL de acetona, deixou-se agitando em um banho com aquecimento até seu ponto de ebulição. Após adicionou-se HCl 2M com a ajuda de uma pipeta de pauster até sua precipitação. Filtrou-se o precipitado no vácuo com uma solução de éter e etanol (1:1). Secou-se o produto 3 na bomba.

Rendimento: 57%.

4.2.6 Preparação do derivado **5**:



Em um balão de fundo edondo, adicionou-se tetracetilglucosamina **4** (320 mg; 1 mmol), ácido cinâmico (1,1 mmol), diclorometano seco e (5 mL) e trietilamina (1mmol), a seguir adicionou-se o DCC (227mg; 1,1 mmol) e deixou-se sob agitação durante 1 hora à 0 °C. O sistema reagiu em temperatura ambiente durante 24 horas até formar um precipitado. Após esse período a reação foi extraída com diclorometano (20 mL), ácido acético (3 x 5 ml) e carbonato de potássio 10% (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO₄ o solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

Rendimento: 53%; RMN¹³C (CDCl₃, 50MHz): 170,41; 169,70; 169,32; 168,44; 166,50; 143,63; 135,27; 129,64; 128,86; 127,53; 127,44; 93,18; 73,37; 73,10; 72,89; 68,35; 61,95; 20,62; 20,56; 20,51; 20,39.

4.2.7 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos compostos foi determinada pelo método de Disco Difusão e a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em ágar. Para a cultura dos microorganismos foram utilizados os seguintes meios de cultura Àgar Mueller Hinton (Bio Brás Diagnósticos) e caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid). Foram utilizadas cepas padrão, de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos. As cepas foram cedidas pelo (Departamento de Microbiologia da UNIFRA), os quais possuem identificação como cepas ATCC (American Type Culture Connection) ou foram provenientes de isolados clínicos, como descritos abaixo.

- *Candida albicans* – cepa ATCC nº 90028;
- *Listeria monocytogenes* – cepa ATCC nº 7644;
- *Pseudomonas aureginosa* – cepa nº ATCC nº 25619;
- *Staphylococcus aureus* – cepa ATCC nº 25923;
- *Enterococcus faecalis* – cepa ATCC nº 29212;
- *Klebsiella pneumoniae* – cepa proveniente da USP – Isolado clínico
- *Escherichia coli* – cepa ATCC nº 25922;

- *Salmonella choleraesuis* – cepa ATCC nº 10708;

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram testados os seguintes compostos:

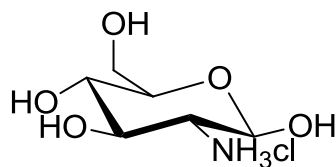


Figura 6: Cloridrato de glucosamina

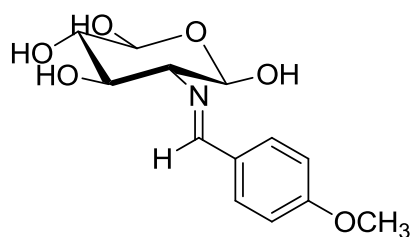


Figura 7: Composto **3a** *N*-(*p*-metoxibenzilideno) D- glucosamina **1**

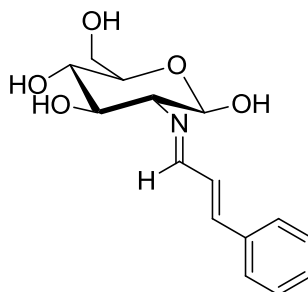


Figura 8: Composto **3b** 3- fenilpropenilideno

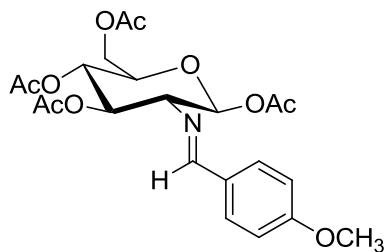


Figura 9: Composto **3a** O- tetracetil- D glucosamina **2**

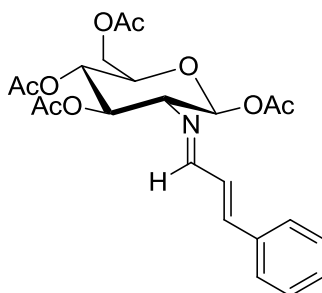


Figura10: Composto **3b** 3-(Fenilpropenilideno) O- tetracetil- D- glucosamina

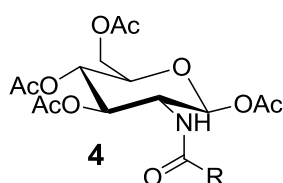


Figura11: Composto **5** N- cinamil- tetracetil- D- glucosamina

Para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* utilizaram-se os seguintes métodos:

4.2.8 Teste de difusão em ágar ou disco difusão:

Previamente aos testes, as cepas bacterianas e fúngicas, armazenadas a -70°C foram recuperadas através da inoculação em caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 37°C . Após esse período uma alíquota foi semeada em ágar Mueller Hinton com auxílio de alça de platina e incubada novamente por 24 h a 37°C . Após, 2 a 3 colônias foram transferidas para tubo de ensaio contendo 10 ml de Solução fisiológica 0,9% até alcançar uma turbidez correspondente a concentração de 0,5% da escala MacFarland.

Para realizar a técnica de disco-difusão, os microorganismos foram inoculados em Agar Mueller Hinton, com auxílio de swab estéril, aplicando-se em seguida, discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro previamente esterilizados contendo 20 μL das amostras, sendo estes em triplicata.

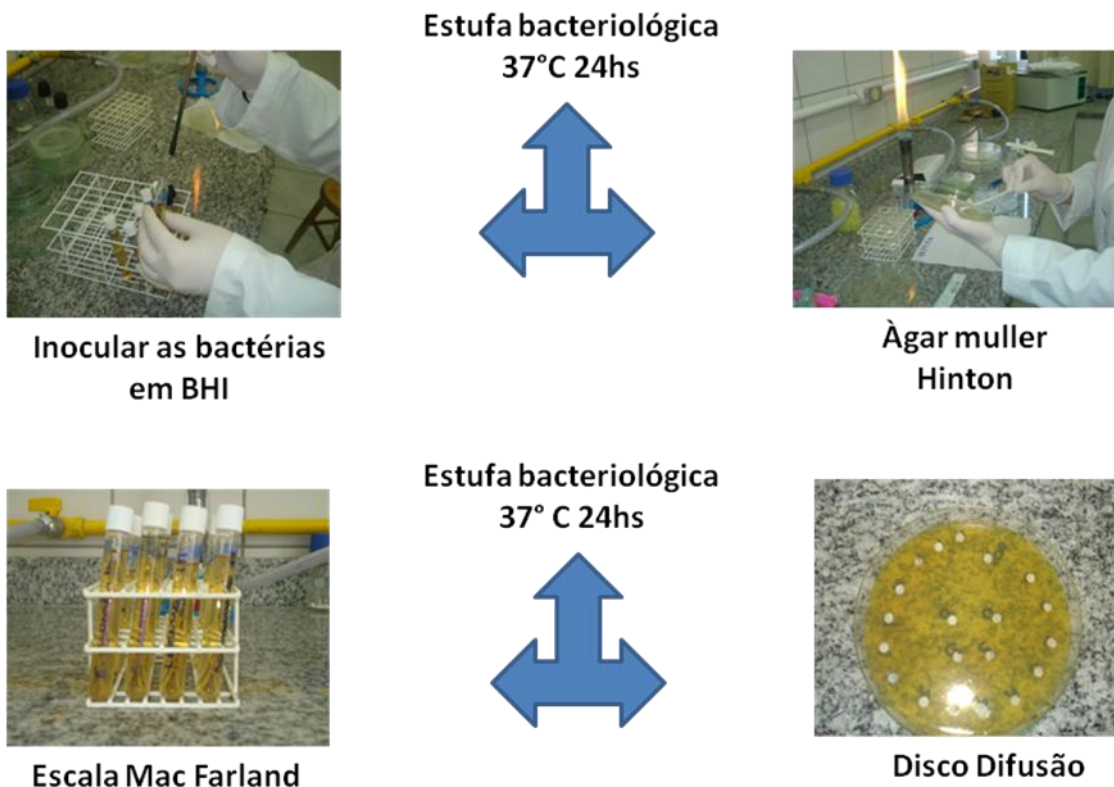


Figura 12: Representação da técnica de Disco Difusão

Utilizou-se como controle positivo os antibióticos imipenem e sulfazotrin e Dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo, pois as amostras foram solubilizadas neste solvente. As amostras foram preparadas neste solvente na concentração de 1%.

4.2.9 Microdiluição

A microdiluição foi utilizada para identificar a concentração inibitória mínima (CMI) dos compostos. Nesta técnica foram utilizadas microplacas de acrílico estéreis com 96 poços, onde cada poço recebeu o inóculo, meio de cultura (BHI) e as amostras.

Em cada linha da microplaca, identificada por letras, trabalhou-se com uma mesma bactéria. Em cada coluna da microplaca, identificada por números, foram realizadas as aplicações de 80 μ L de meio de cultura BHI em todos os poços de 1 a 10. No poço 1, além do meio, foi aplicada a amostra. No poço 2, além do meio foi aplicada a bactéria. No poço 3 além do meio foram aplicadas a bactéria (20 μ L) e a amostra (100

μL) sendo o volume final de $200 \mu\text{L}$. Este foi homogeneizado com pipeta automática e $100 \mu\text{L}$ foram transferidos ao poço 4 que continha previamente $80 \mu\text{L}$ de meio e $20 \mu\text{L}$ de bactéria. Consecutivamente, a diluição efetuou-se da mesma maneira para os demais poços até os da coluna 10, sendo $100 \mu\text{L}$ deste último poço desprezado, mantendo-se assim um volume final em todos os poços de $100 \mu\text{L}$.

Logo após a micropipetagem, as placas foram incubadas em uma estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Após o período de incubação, o corante de revelação de crescimento microbiano cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC), foi preparado na concentração de 0,5 % em solução fisiológica a 0,9 %. O corante foi então pipetado sobre os poços da microplaca com auxílio da pipeta de Pasteur, demonstrando crescimento microbiano nos poços que adquiriram coloração vermelha após 30 minutos de reagência ou turvação do meio. A CIM é identificada no poço anterior onde não ocorreu turvação ou coloração vermelha. Determinou-se, então, a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento do microorganismo.

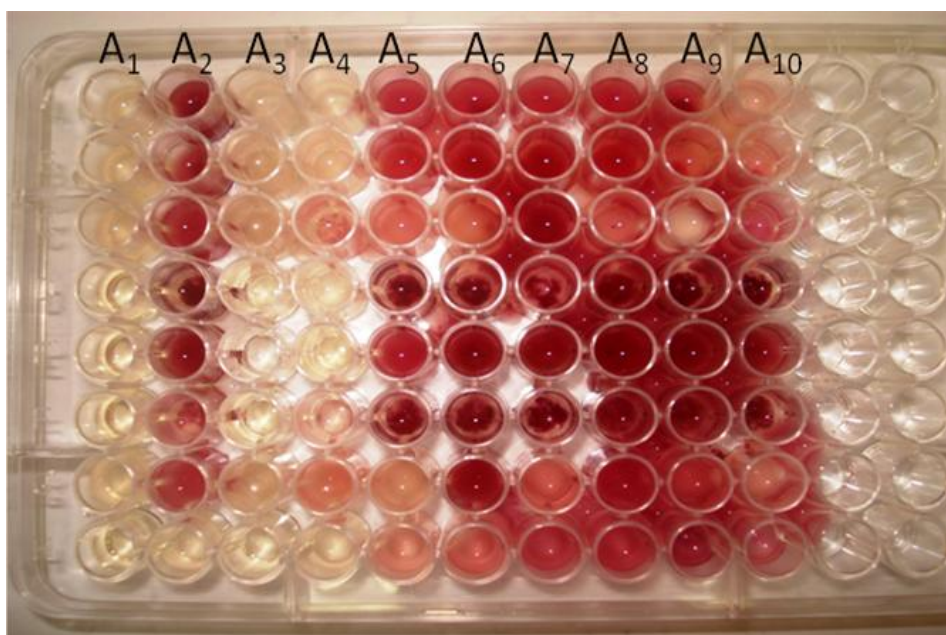


Figura 13: Representação da técnica de microdiluição

A₁- $80 \mu\text{L}$ de meio de cultura BHI + $20 \mu\text{L}$ dos compostos testados;

A₂- $80 \mu\text{L}$ de meio de cultura BHI + $20 \mu\text{L}$ do inóculo;

A₃- $80 \mu\text{L}$ de meio de cultura BHI + $20 \mu\text{L}$ de inóculo + $100 \mu\text{L}$ dos compostos testados, foram feitas diluições seriadas do Poço A₃ ao A₁₀, sendo que o último poço foi desprezado.

5 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos é possível fazer algumas considerações em relação ao estudo realizado.

Durante a realização deste trabalho, o principal foco foi o desenvolvimento de novos compostos derivados da glucosamina e a avaliação de seu potencial biológico.

Os compostos derivados da glucosamina foram obtidos através de metodologias simples e de fácil obtenção, onde foram funcionalizados com compostos de origem natural que apresentam um potencial antimicrobiano.

No que diz respeito à avaliação do potencial biológico dos compostos sintetizados, eles foram testados como agentes antimicrobianos através das técnicas de disco difusão e microdiluição. Os cinco compostos testados (**5**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**) apresentaram halo de inibição frente as diferentes bactérias, exceto frente a *klebsilla pneumonia*.

Entre os compostos testados, o que apresentou um a maior halo de inibição foi composto (**2b**), está relacionado com a estrutura química destes compostos. Pois este apresenta-se em uma forma mais solúvel em relação aos outros.

Como perspectivas futuras de continuidade deste trabalho, destaca-se a possibilidade de síntese e novos derivados, com pequenas modificações estruturais, graças ao caráter modular dos compostos obtidos. Com isso, pode-se melhorar o poder antimicrobiando dos derivados.

Por outro lado, a glucosamina é a unidade básica de biopolímeros como a quitosana e quitina. A transposição do conhecimento acerca das metodologias desenvolvidas permite a obtenção de polímeros derivados de produtos naturais, abundantes na natureza, com a incorporação de propriedades biológicas de grande interesse

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília, ABEAS/MEC, p. 96, 1989.

ANDREJUS, K.; JOSEPH, H. B. **Química farmacêutica**: Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p. 577, 1988.

BERGMANN, M.; ZERVAS, L. *Berichte*, p. 975-980, 1931.

BORCHARD, G. *Adv. Drug Delivery Ver.*, v. 52, p. 145, 2001.

BROKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **MICROBIOLOGIA MÉDICA**. 21 edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

BURTON, R. W.; ENGELKIRK, G. P. 7ª edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **2005**.

Carter, I. R.; *J. Fam. Practice*. **2001**, 50, 394.

Chun, H. K., Jang, W. C., Heung, J. C., & Kyu, S. C. (1997). *Polymer Bulletin*, 38, 387.

Coutinho, H. D. M.; Bezerra, D. A. C.; Lobo, K.; Barbosa, I. J. F.; *Conceitos* **2004**, 77, 78.

D_Ambrosio, E., Casa, B., Bompani, R., Scali, G., Scali, M., 1981. Glucosamine sulfate: a controlled clinical investigation in arthrosis. *Pharmacotherapeutica* 2, 504–508.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-16, **2000**.

Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683.

Ebina, T.; Fujimiya, Y.; *Biotherapy* **1998**, *11*, 289.

Franklin, T. J., & Snow, G. A. (1981). *Biochemistry of Antimicrobial Action*. London: Chapman & Hall. Hiroshi, S. (1993). *Sensshoku Kogyo*, 41, 177. Kean, T., Roth, S., & Thanou, M. (2005). *Journal of Controlled Release*, 103, 643.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2006 (1998).

Gulluce, M.; Aslan, A.; Sokmen, M.; Sahin, F.; Adiguzel, A.; Agar, G.; Sokmen, A. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 515.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A.V., **1998**.

Institute of Medicine and National Research Council, 2004. Prototype monograph on glucosamine. In *Dietary Supplements: a framework for evaluating safety*. C-1–C-86.

Carter, I. R.; *J. Fam. Practice*. **2001**, *50*, 394.

Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y., Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of a-chitin, b-chitin, and c-chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A*, 42(14), 3423–3432.

JACKSON, C. L.; REYES, M. A. L.; CORDIÉS, H. L. M. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana**. *Acta Medica* 8 (1): 13-27, **1998**.

Jiang Y, Xue PH, Chen SM, Li WJ. The inhibitory effect of chitosan to superoxide anion and LOO. *Sci Bull* 2002;47(3):182 -4.

Kafetzoulou, D.; Martinov, A.; Bouriotis, V. Em *Chitin Enzymology*; Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, **1993**, p. 147.

Koneman, W. E.; Allen, D. S.; Janda, M. W.; Schreckenberger, C. P.; Winn, C. W.; *Diagnóstico microbiológico 5° edição*.; editora Medsi.; Rio de Janeiro, **2001**.

- Kubota, N.; Tastumoto, N.; Sano, T.; Toya, K.; *Carbohydr. Res.* **2000**, *324*, 268.
- Kurita, K.; *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 1921.
- Lehmann, J.; translated by haines, A. H.; Carbohydrate, structure and biology, Thieme, Stuttgart, **1998**, p. 67.
- Le Dung, P.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Desbrières, J.; *Carbohydr. Polym.* **1994**, *24*, 209.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E.; Microbiologia médica e imunologia. 7ª edição Ed. Artmed São Paulo p. 85, **2008**.
- LIMA, M.P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauracea). *Acta Amazônica*, v.35, n.3, p.363-6, **2005**.
- Lichtenthaler, F. W.; Peters, S.; *C. R. Chim.* **2004**, *7*, 65.
- MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J.; **Microbiologia de Brock**. Pearson, 10 ed. Prentice Hall, cap. 17, p. 531, **2004**.
- MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v.107, n.2, p.180-5, **2006**.
- Mazieres, B.; Combe, B.; Van, A. P.; Tondut, J.; Grynfeldt, M.; *J. Rheumatol.* **2001**, *28*,173.
- MIMIS, C.;PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.; Microbiologia médica. 2ª edição ed. Manoele LTDA p.411, **2000**.
- Morgelin, M.; Paulsson, M.; hardingham, T. E.; Heinegard, D.; Engel, J.; *Biochem. J.* **1988**, *253*, 175.
- Murcia, M.A., Egea, I., Romajaro, F., Parras, P., Jimenez, A.M., Martinez-Tome, M., 2004. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.* *7*, 1872–**1881**.

Murray, P. R.; *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed., ASM Press: Washington, **1999**.

Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C., eds.; *Chitosan in pharmacy and chemistry*, Atec: Grottammare, 2002.

Nakatsuta, S.; Andrady, A. L.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *44*, 17.

ortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L.. *Microbiology: an introduction*. 17.ed. New York: Addison Wesley Longman, **2001**. p.549-575.

Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., Begin, A.,1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37, 155–162.

Page, C.; Curtis, M.; Sutter, M.; Walker, M.; Hoffman, B.; *Farmacologia integrada* 2° ed.; Editora Manole: São Paulo, **2004**.

Passos, X. S.; Santos, S. C.; Ferri, P. H.; Fernandes, O. F. L.; Paula, T. F.; Garcia, A. C. F.; Silva, M. R. R.; *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2002**, *35*, 623.

RANG, P. H.; DALE, M. M.; RITTER, M. J.; MOORE, K. P.; **Farmacologia**. Tradução da 5 ed. Elsevier, cap. 44, p. 714, 2003.

Rex, J. H.; Pfaller, M. A.; Walsh, T. J.; Chaturvedi, V.; Espinel-Ingroff, A.; Ghannoum, M. A.; Gosey, L. L.; Odds, F. C.; Rinaldi, M.; Sheehan, D. J.; Warnock, D. W.; *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 643.

Sakurai, T.; Ohno, N.; Suzuki, I.; Yadomae, T.; *Immunopharmacology* **1995**, *30*, 157.

Silva, P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **1998**. p.931-948. Singla, A. K.; Chawla, M.; *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1047.

Silva, C. H. P. M.; *Bacteriologia: Um Texto Ilustrado*, Ed. Eventos: Teresópolis, **1999**.

Sutherland, I. W. Em *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*; Dumitriu, S., ed.; Marcel Dekker: New York, 2nd ed., 2005, Cap. 16.

Skjak-Braek, G.; Anthonsen, T.; Sandford, P., eds.; *Chitin and Chitosan sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier Applied Science: London, 1989.

SILVA, C. R. S. H.; SANTOS, R. C. S. K.; FERREIRA, I. E. **Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**. *Química Nova* v.29, n. 4, São Paulo, jul./ago, **2006**.

Singla, A. K.; Chawla, M.; *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, 53, 1047.

Singh, H.B., Srivastava, M., Singh, A.B., Srivastava, A.K., 2007. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. *Allergy* 50, 995–999.

Souza, M.M.; et al. *Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Itajaí: Univali, **2003**.

Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H.L., vonWright, A., 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology* 37, 813–823.

Stick, R. V.; *Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life*, Academic Press, **2001**.

Tonhi, E.; Plepis, A. M. G.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 943.

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

Vanaclocha, B.; Canigüeral, S.; *Fitoterapia: Vademécum de prescripció*n, 4^a ed., Masson: Barcelona, 2003.

Varaldo, P. E.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50, 1.

Xue, L.; Zhou, D.-J.; Tang, L.; Ji, X.-F.; Huang, M.-Y.; Jiang, Y.-Y. *Reactive & Functional Polymers* **2004**, *58*, 117.

Xu, X.; Liu, P.; Li, S.-H.; Zhang, P.; Wang, X. *Reac. Kinet. Catal. Lett.* **2006**, *88*, 217.

Yalpani, M.; *Polysaccharide: synthesis, modifications and structure/ property relations*, Elsevier: New York, **1998**.

YOUNG, L. S.; WYNGAARDEN, J.; LLOYD, H. S. **Tratado de Medicina Interna**. 19 ed. México, DF: Nueva Editorial Interamericana, p. 1859-72, **1994**.

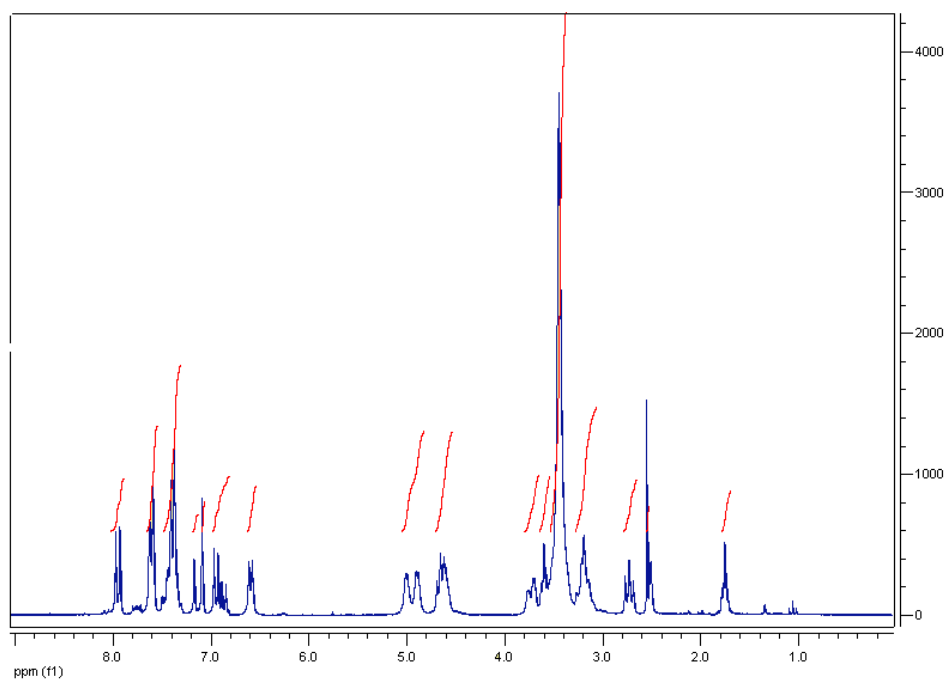
Yuan, G.-L.; Yin, M.-Y.; Jiang, T.-T.; Huang, M.-Y.; Jiang, Y.-Y. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2000**, *159*, 45.

Wall, M. E.; Wani, M. C.; *J Ethnopharmacol.* **1996**, *51*, 239.

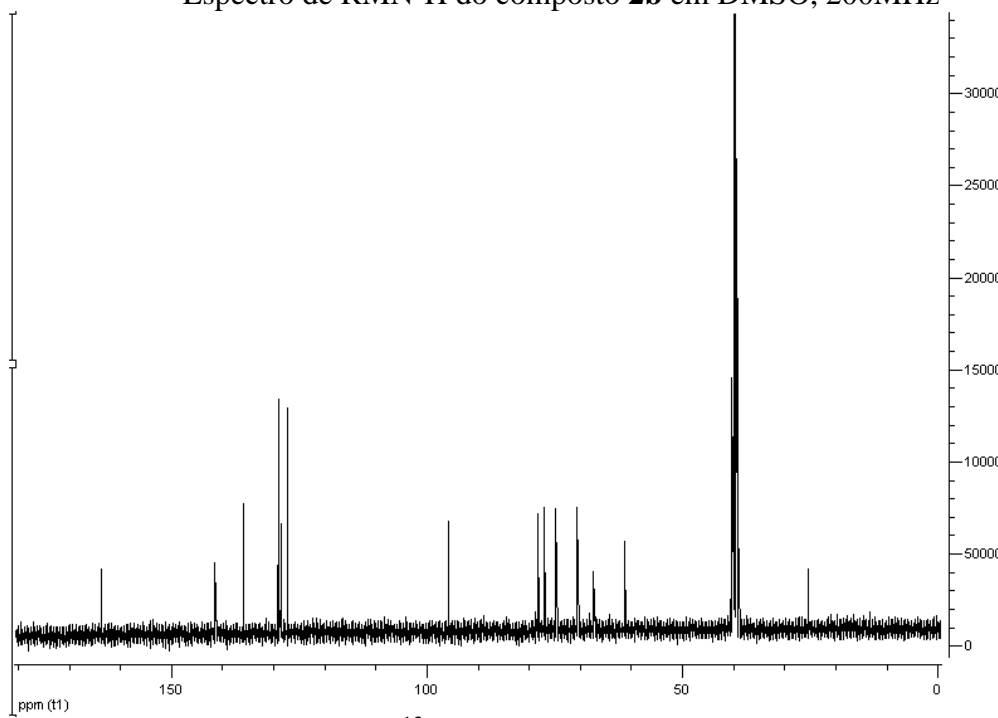
Wise, R.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, Suppl. S2, ii5.

WHO, 1999. Cortex Cinnamomi. In: WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. World Health Organization, Geneva, pp. 95–104.

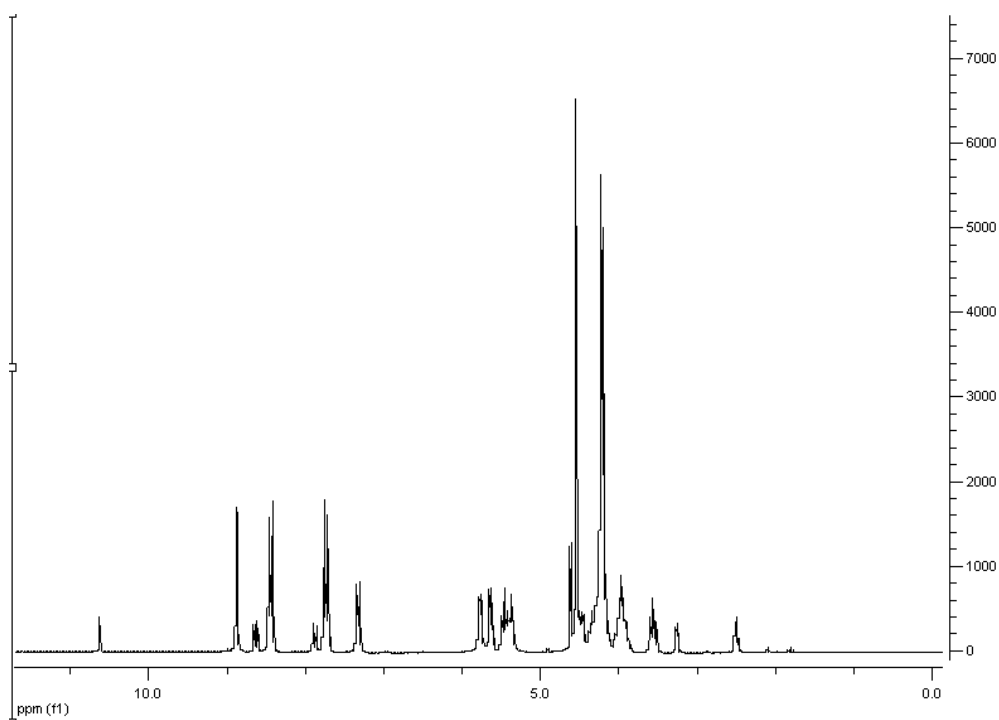
ANEXOS



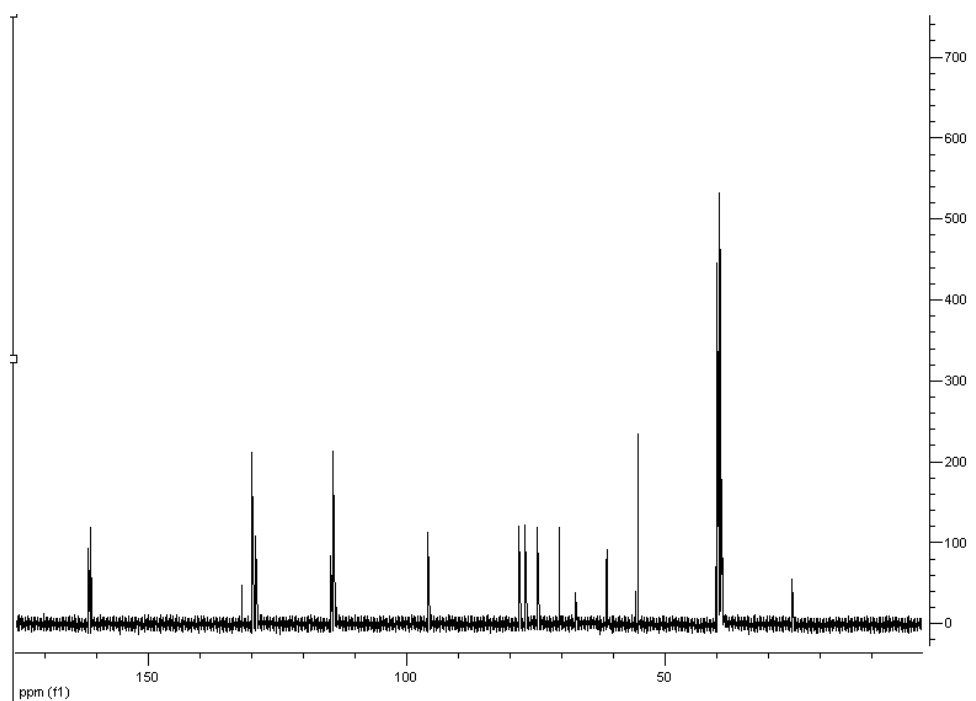
Espectro de RMN^1H do composto **2b** em DMSO, 200MHz



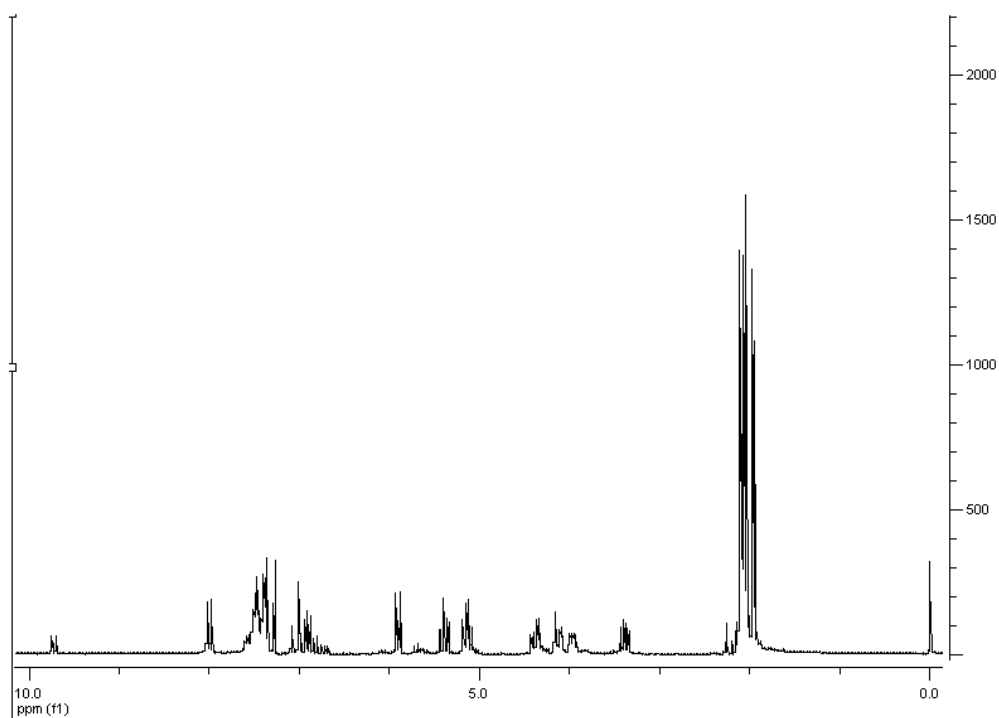
Espectro de RMN^{13}C do composto **2b**, em DMSO, a 50MHz



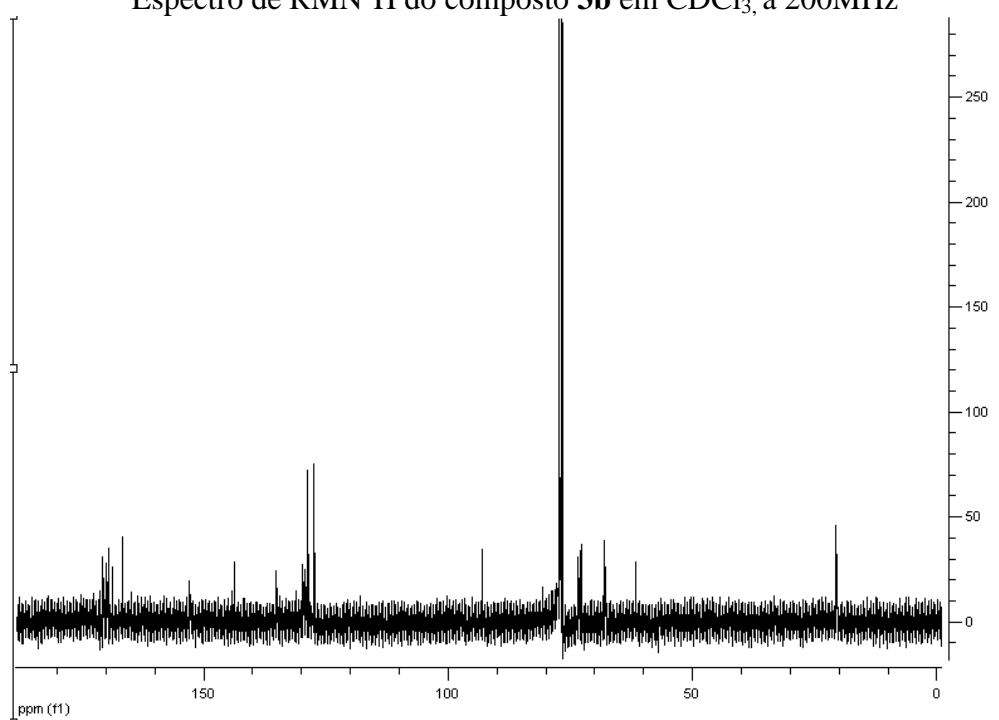
Espectro de RMN ^1H do composto **2a** em DMSO, a 200MHz



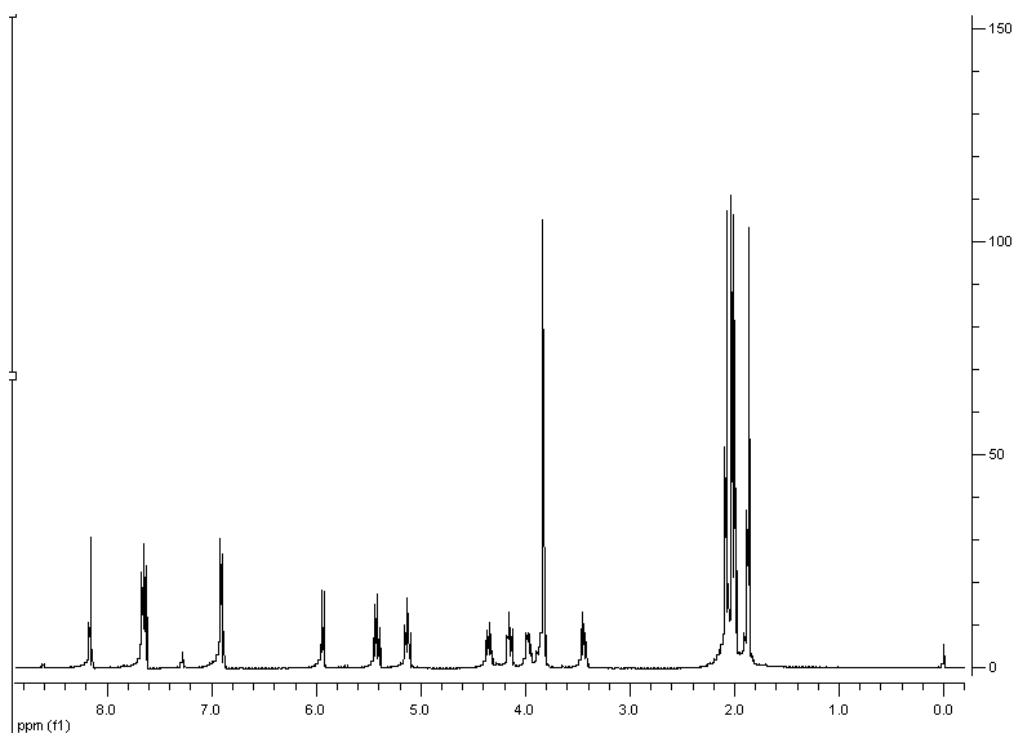
Espectro de RMN ^{13}C do composto **2a**, em DMSO, a 50MHz



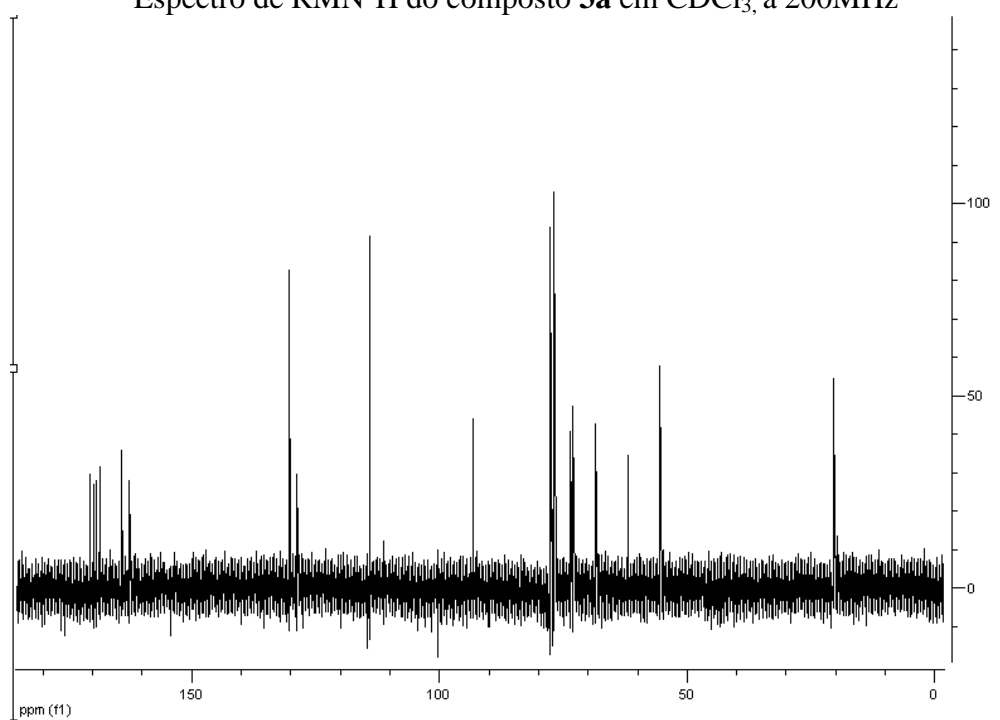
Espectro de RMN ^1H do composto **3b** em CDCl_3 , a 200MHz



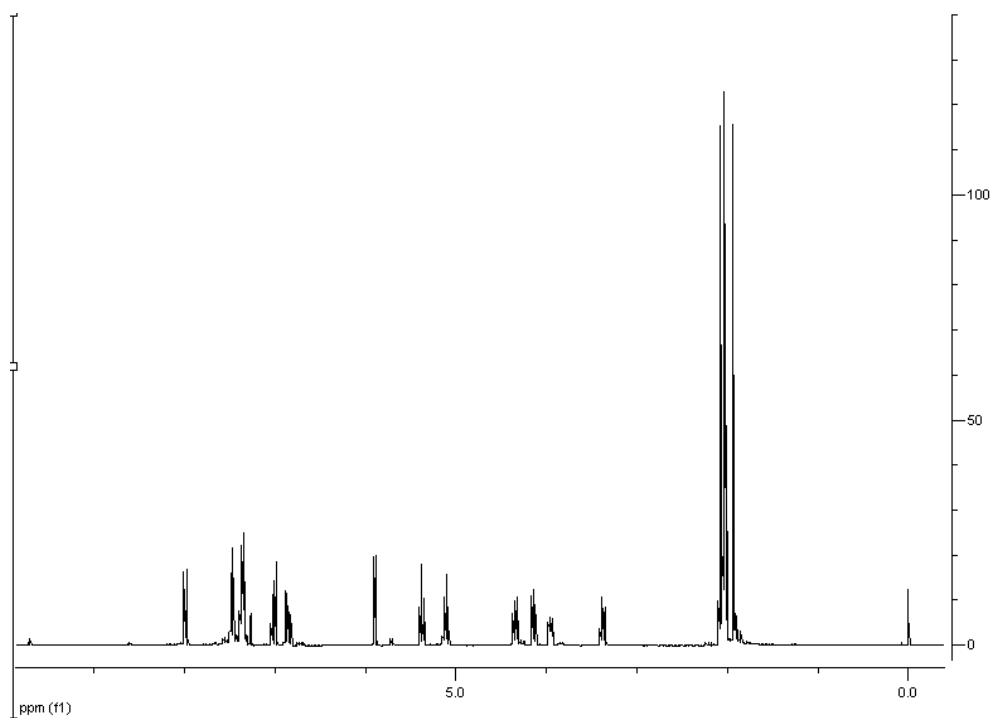
Espectro de RMN ^{13}C do composto **3b**, em CDCl_3 , a 50MHz



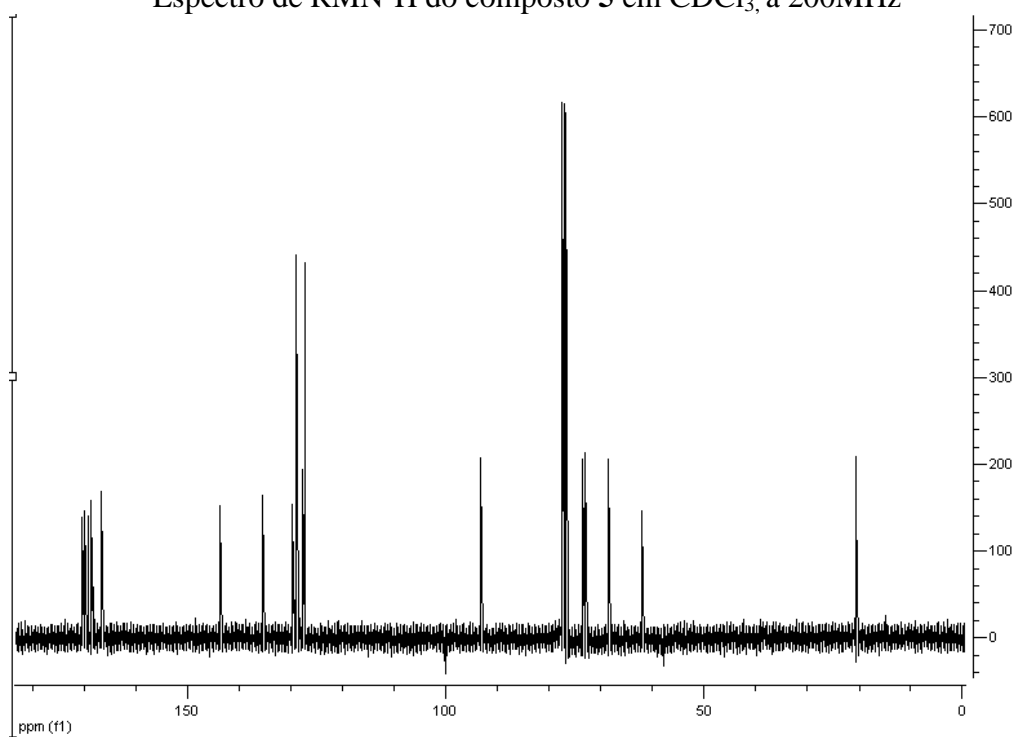
Espectro de RMN^1H do composto **3a** em CDCl_3 , a 200MHz



Espectro de RMN^{13}C do composto **3a**, em CDCl_3 , a 50MHz



Espectro de RMN^1H do composto **5** em CDCl_3 , a 200MHz



Espectro de RMN^{13}C do composto **5**, em CDCl_3 , a 50MHz

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)