

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores

Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

I. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



DETERMINAÇÃO DA MÍNIMA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (MIC) DE DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DE QUITOSANA CONTRA *E. COLI*

Leandro Prezotto da Silva^{1,2}, Mirna Helena Regali Seleglim², Douglas de Britto¹, Odilio B.G. Assis¹

¹Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. Odilio@cnpdia.embrapa.br

²Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: 01.05.1.01.02.02

Resumo

O efeito antibacteriano do derivado trimetilado de quitosana (TMQ) foi avaliado contra a bactéria *Escherichia coli*. O derivado foi preparado via reação com dimetilsulfato a partir de quitosana de origem comercial. A mínima concentração inibitória (MIC) foi medida em meio agar através de medidas de mudança na turbidez e por contagem em placas (Colony Forming Units - CFU). Os resultados indicam boa atividade antimicrobiana com MIC nos intervalos de 0,0075 gL⁻¹ a 0,0035 gL⁻¹. O objetivo é o emprego desses compostos como revestimentos comestíveis ou na produção de embalagens ativas.

Palavras-chave: derivados de quitosana, atividade antimicrobiana, MIC.

Introdução

Quitosana é um polissacarídeo catiônico que ocorre naturalmente ou pode ser obtido por reação alcalina da quitina, um abundante subproduto da indústria pesqueira. Por suas características atóxicas e de fácil formação de filmes, a quitosana tem sido estudada em potenciais aplicações em alimentos, agricultura e medicina (KUMAR, 2000).

Quando submetido a processo de metilação, a quitosana é transformada em um derivado trimetilado (TMQ) caracterizado por ter cargas positivas permanentemente em consequência da quaternização dos grupos aminos na posição C2 da estrutura polimérica (CURTI e CAMPANA-FILHO, 2003). A TMQ pode ser sintetizada tanto pela adição covalente de um substituinte contendo um grupo amônio quaternário via quaternização dos grupos aminos ou como demonstrado recentemente pelo uso de dimetilsulfato como agente metilante (BRITTO e ASSIS, 2007). A TMQ é solúvel em uma ampla faixa de pHs e sua atividade antimicrobiana tem sido registrada como superior à quitosana

precursora (JIA et al., 2001), na qual o comprimento da cadeia n-alkil revelou-se ser um importante aspecto dessa atividade (QIN et al., 2004). A TMQ, assim como a quitosana tem a habilidade de formar filmes finos e é um potencial material para uso em alimentos, em particular para emprego em revestimentos protetores pós-colheita e filmes para embalagens. O objetivo do presente estudo é determinar o MIC para a TMQ contra *E. coli* sintetizada via reação com dimetilsulfato.

Materiais e métodos

Quitosana da Sigma Aldrich (média massa molar) foi empregada como material inicial para a obtenção da TMQ. A reação de metilação foi conduzida a 70°C com dimetilsulfato da Vetec. A reação básica e proporção de reagentes estão descritas em Britto e Assis (2007). A atividade antimicrobiana do derivado metilado foi examinada contar a bactéria modelo Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 8739). Para tal, inicialmente uma mistura de 7,5 ml de cultura de

bactéria foi transferida para erlenmeiers (500 mL) contendo 142,5 ml de meio sintético (E agar). A pré-cultura de *E. coli* foi incubada a 37°C sob anaerobiose e agitação moderada. O efeito inibitório foi determinado pela alteração de turbidez e por contagem de colônia (CFU). Medidas de absorbância foram realizadas a cada 30 min em comprimento de onda de 600 nm (Novaspec II). Para a contagem de colônia em meio sólido foi empregada o Drop Count Method.

Resultados e discussão

A Figura 1 apresenta o perfil de absorbância para o meio de cultura com e sem TMQ. É possível observar indiretamente o correspondente número de células crescidas ao longo do tempo indicando um comportamento exponencial durante as primeiras 5 hrs uma taxa constante entre 6 e 7 hs (para o meio sem derivado).

Nos meios com adição TMQ os comportamentos são similares embora com a redução da fase Log e um declínio nos valores de absorbância com o tempo (fase de mortalidade celular). A adição de TMQ na concentração de 0,0035 gL⁻¹, apresenta pouco efeito inibitório, com comportamento próximo ao controle. Pelos ensaios de turbidez a melhor inibição a crescimento da *E. coli* se dá em adições de TMQ entre 0,02 e 0,0075 gL⁻¹, sendo essas concentrações próximas à registradas para oligossacarídeos de quitosana contra *E. coli* nos experimentos realizados por Jeon et al. (2001).

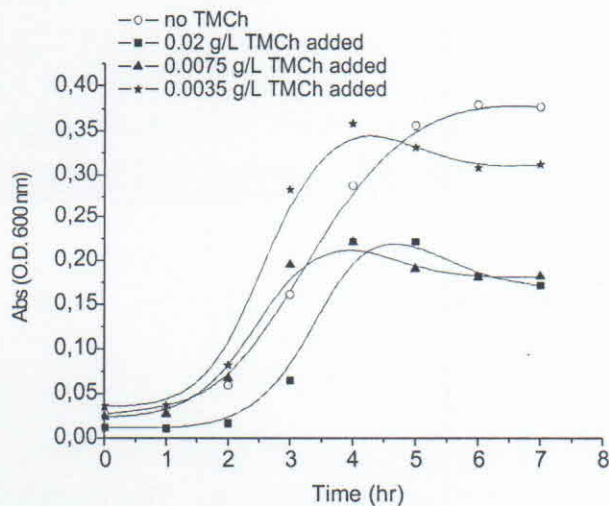


Fig. 1. Perfil de crescimento da *E. coli* (medida de turbidez em 600 nm/ 37° C)

Considerando que cada colônia crescida em meio nutriente sólido resulta em uma única bactéria, a medida paralela do crescimento por mL pode ser diretamente relacionada com a absorbância. Para os materiais avaliados, (Fig. 2), a concentração de TMQ no intervalo de 0,02 a 0,0035 gL⁻¹ resulta em um

relativo aumento da atividade antimicrobiana com proporcional redução não apenas do número total de colônias macroscopicamente visíveis como também da fase estacionária.

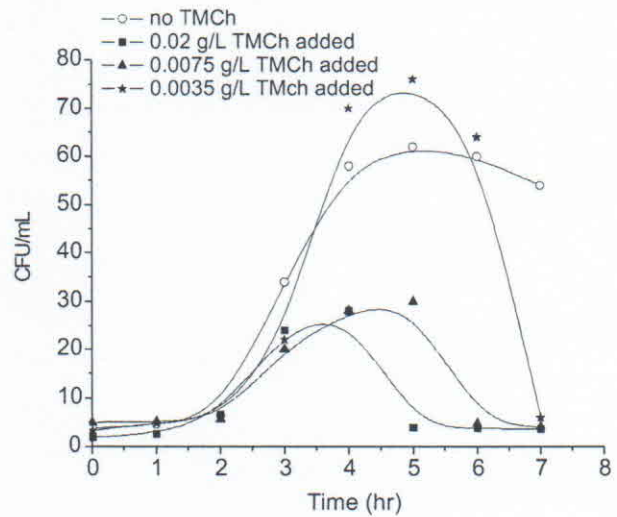


Fig. 2. Perfil em função do tempo de incubação da análise da população de *E.coli* em meio de cultura na presença de TMQ.

Com o objetivo de quantificar essa redução estabelecendo um fator numérico as curvas de absorbância foram derivadas em função do tempo para a identificação de seus crescimentos máximos para cada concentração de TMQ, ou seja:

$$\left(\frac{dY}{dt}\right)_{control} / \left(\frac{dY}{dt}\right)_{culture}$$

O emprego desta relação indica que uma redução em aproximadamente 50% sobre o crescimento para concentrações de TMQ de 0,02 g/L e um pequeno efeito inibitório, de apenas 2%, para a concentração de 0,0075 g/L. Na cultura com 0,0035 g/L de TMQ um aumento no crescimento bacteriano ao redor de 57% com relação ao meio controle é observado, o que pode ser explicado como essa adição sendo convertida em nutriente, favorecendo assim o crescimento da *E. coli*. De uma forma geral, altas concentrações de quitosana não apresentam atividade antimicrobiana, por razões diversas conforme revisadas por Goy et al. (2009).

Conclusões

Derivados trimetilados de quitosana TMQ apresentaram ter importante ação inibitória contra bactéria Gram-negativa conforme testes conduzidos na bactéria *E. coli*. Os resultados indicam que a aparente mínima concentração inibitória está próxima a 0,002 gL⁻¹. de materiais ativos para uso em embalagens ou revestimentos protetores pós-colheita.

Agradecimentos

CNPq, FINEP/MCT, EMBRAPA.

Referências

- BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, p. 305-310, 2007.
- CURTI, E.; BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S.P. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 3, n. 10, p. 571-576, 2003.
- GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. **Polímeros**, 2009. aceito.
- JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 33, p. 1-6, 2001.
- QIN, C.; XIAO, Q.; FANG, H. M.; LIU, Y.; CHEN, X.; LI, Q. **Intern. J. of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 34, n. 2, p. 121-126, 2004.
- KUMAR, M. N. V. R. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 46, p. 1-27, 2000.
- JEON Y-J.; PARK P-J.; KIM S-K. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 44, p. 71-76, 2001.