

**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



AVALIAÇÃO PRELIMINAR, POR ZONA DE INIBIÇÃO, DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANAS HIDROSSOLÚVEIS

Rejane C. Goy¹, Sinara T.B. Morais^{1,2}; Douglas de Britto¹, Odilio B.G. Assis^{1*}

¹Embrapa Instrumentação Agropecuária

²Bolsista CNPq - Brasil *odilio@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC3

Plano de Ação: 01.05.1.01.03.03

Resumo

Estão sendo avaliados experimentalmente os possíveis modelos de interação quitosana- bactérias por técnicas microbiológicas. Os ensaios estão sendo conduzidos *in vitro* através do crescimento de bactérias bacilares gram-negativa (*E.coli*) e gram-positiva (*S. aureus*) e suas interações com derivados trimetilados de quitosana na forma de gel e de filmes avaliados. O objetivo é o de comparar as atividades antibacterianas dos diversos compostos nas bactérias modelos, definindo condições de processamento e grau de trimetilação para o processamento de filmes ativos para emprego em embalagens e coberturas de alimentos. No momento encontra-se em avaliação as melhores condições para o emprego dessa metodologia.

Palavras-chave: Quitosana, derivados hidrossolúveis, atividade antimicrobiana, embalagens.

Introdução

Os derivados hidrossolúveis de quitosana podem ser obtidos pela introdução de cargas positivas permanentes na cadeia polimérica, fazendo com que a solubilidade desses materiais fique independente do pH do solvente. Este aspecto os diferencia da quitosana precursora, que é solúvel somente em pH ácido, abaixo de seu pKa. A presença de cargas permanentes na estrutura polimérica pode ser conseguida através da quaternização dos átomos de hidrogênio nos grupos amino. Para esse objetivo, uma extensiva metilação da quitosana é requerida e pela metodologia desenvolvida pela Embrapa (BRITTO e ASSIS, 2007a; BRITTO e ASSIS, 2007b), esta pode ser conduzida por reação simples em suspensão com dimetilsulfato (DMS), NaOH e NaCl, resultando em N,N,N-trimetilquitosana.

Estudos com sais quaternários têm revelado que a atividade antimicrobiana desses derivados é

sem dúvida superior a atribuída à quitosana não modificada (SADEGHI et al., 2008) inclusive análises preliminares por nós realizadas têm confirmado esta propriedade (CARVALHO, et al., 2007).

Modelos de Interação Bacteriana

Três modelos de interação têm sido propostos na literatura, sendo o mais aceitável a interação que ocorre entre as cargas protonadas da quitosana (positivas) com os sítios negativos das paredes celulares das bactérias. Este modelo é mediado por forças eletrostáticas entre os grupos NH³⁺ e resíduos negativos, provavelmente competindo com os íons Ca²⁺ na membrana microbiana (YOUNG, 1983). Essa interação eletrostática resultou em uma dupla interferência: i) promove alterações na permeabilidade da membrana resultando em desequilíbrios osmóticos que inibem o crescimento

bacteriano (SHAHIDI et al., 1999) e ii) promove a hidrólise dos compostos peptidoglicanos levando ao vazamento de eletrólitos intracelulares (DEVLEIGHIERE, et al., 2004).

Neste mecanismo fica evidenciado que quanto maior o número de aminas cationizadas maior será a atividade antimicrobiana. O segundo mecanismo proposto é a interação da quitosana com o DNA microbiano, que leva a inibição da síntese do mRNA. Esse mecanismo se dá pela penetração da quitosana no interior do microorganismo (SEBTI et al., 2005). Raafat et al. (2008) apontam que embora este seja um mecanismo possível, sua probabilidade de ocorrência é pequena.

O terceiro mecanismo é baseado na capacidade de quelação de metais pela quitosana. As moléculas do polímero se entrelaçariam no entorno das bactérias, gerando uma barreira física para a penetração de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano. Evidentemente, embora possível este não é um mecanismo determinante da quitosana em sua atividade antimicrobiana. Esses serão os possíveis modelos passíveis de detecção neste trabalho.

Materiais e métodos

Quaternização da Quitosana e Preparação dos Filmes

Quitosana comercial (Aldrich) foi submetida à reação de quaternização com dimetilsulfato (VETEC). Partindo de 5g de quitosana purificada, foram adicionados 100mL de dimetilsulfato e 12g de NaOH (0,015 mol) em 250mL de água deionizada e NaCl (0,015 mol) sob agitação branda a 70°C por seis horas. O material a seguir foi dialisado em membranas de celofane, neutralizado e o produto final foi obtido por liofilização, segundo procedimento previamente adotado (BRITTO e ASSIS, 2007a).

Ensaios Microbiológicos

As atividades antimicrobianas dos derivados quaternizados deverão ser inicialmente avaliadas na forma de gel. Sequencialmente as análises foram realizadas diretamente sobre os filmes. A cultura usada para o crescimento bacteriano foi a LB (Lúria Bertani) em composições padrões. As medidas de atividade antimicrobiana tiveram por base duas metodologias adotadas: i) as diferenças na medida proporcional de bactérias diretamente inoculadas sobre placas, ou sobre os filmes, pelo padrão PFU (plaque-forming unit), com contagem direta do número de colônias crescidas e ii) a avaliação pelo método de difusão em agar, que se baseia na

determinação dos halos de inibição do crescimento (PELCZAR et al., 1980). Neste método um disco de filme a ser analisado é colocado na superfície de meio de cultura contido numa placa de Petri e previamente inoculado com o microorganismo. Durante a incubação gerando o crescimento do microorganismo teste, a ação antimicrobiana do filme atua sobre o meio de cultura. Um halo (zona transparente) de inibição é formado há volta do disco, onde não crescem colônias do microorganismo. A medida desse halo de inibição é proporcional a ação antimicrobiana. Estão em avaliação material na forma de gel (concentrações variadas) e em filmes. Resultados realizados com *E.coli* evidenciam a eficiência do método.

Resultados e discussão

Através de medidas de UV-Vis foi monitorado o crescimento das bactérias *E. coli* em função do tempo em meio líquido LB, gerando uma cinética de crescimento conforme a Figura 1 (com alíquotas retiradas de hora em hora e a absorbância medida num comprimento de onda de 640nm), acusando um crescimento do tipo exponencial.

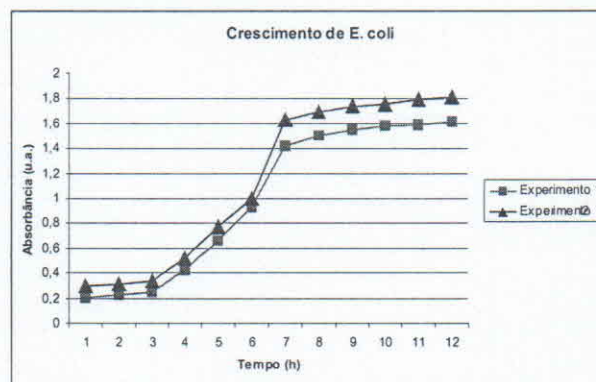


Fig. 1. Curvas de crescimento de *E. coli* em função do tempo.

Para o cálculo do número de bactérias por mL foi utilizada uma expressão que considera o fator de diluição o número de placas e o volume pipetado para espalhamento na placa:

$$CFU = \{(n^\circ \text{ colônias} \times \text{fator de diluição}) / n^\circ \text{ placas}\} \times \{1/\text{volume}\}$$

Na Figura 2 pode ser observado um exemplo de uma região de intensidade diferenciada em uma placa de cultura na presença de gel de quitosana comercial (2g/L) em meio de cultura de *E.coli*. Pode ser observada uma região de menor intensidade ao redor do gel depositado, porém ainda não passível de medidas comparativas. Contudo nos ensaios

realizados até o momento fica evidenciado o efeito inibidor da quitosana o que esperamos seja mais intenso com o uso da TMQ. Testes com bactéria gram-positiva, como a gram-positiva (*S. aureus*) também encontram-se em andamento.

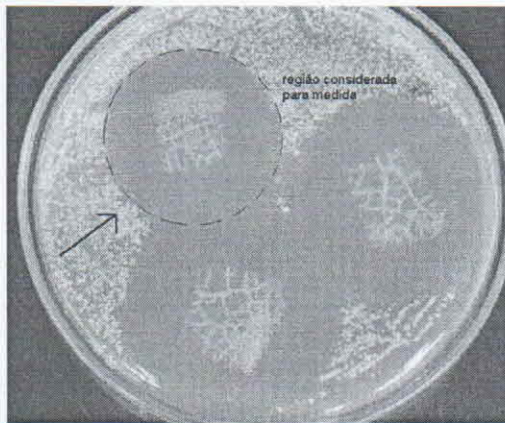


Fig. 2. Meio de cultura inoculado com *S. aureus* e indicio de efeito inibidor de quitosana a 2 g/L.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, da FAPESP e da EMBRAPA, FINEP/MCT.

Referências

- DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A. DEBEVERE, J. *Food Microbiol.*, London, v. 21, p. 703-714, 2004.
- SEBTI, I.; MARTIAL-GROS, A.; CARNET-PANTIEZ, A.; GRELIER, S.; COMA, V. *J. Food Sci.*, Chicago, v. 70, p. M100-M104, 2005.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.; JEON, Y-J. *Trends Food Sci. Technol.*, Cambridge, v. 10, p. 37-51 1999.
- RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A. SAHL, H-G. *Appl. Environ. Microbiol.*, [S. l.], v. 74, p. 37643773, 2008.