

**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](mailto: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 DA INTERAÇÃO BACTERIA/FILMES DERIVADOS DE QUITOSANA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Rejane Celi Goy, Carlos Eduardo de Moraes Vieira, Rubens Bernardes Filho, Odilio B.G. Assis

Embrapa Instrumentação Agropecuária São Carlos, SP; odilio@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC3

Plano de Ação: 01.05.1.01.03.03

### Resumo

Filmes de quitosana e N,N,N-trimetilquitosana foram produzidos por “casting” sobre lâmina de vidro na concentração de 2g/L e as superfícies analisadas por microscopia de força atômica. Sobre os filmes foram depositadas bactérias gram-negativa (*E. coli*) na concentração aproximada de  $2 \times 10^8$  organismos/mL e imagens da interação bactéria/superfícies foram obtidas para observar o comportamento resultante.

**Palavras-chave:** quitosana, trimetilquitosana, *E. coli*, microscopia de força atômica.

### Introdução

Quitosana e seus derivados são materiais conhecidos por sua capacidade de inibição de um grande número de espécies de bactérias e fungos com comprovada eficiência, mesmo em baixas concentrações (SHARIDI et al., 1999; SIMPSON et al., 1997). Quitosanas comerciais, não modificadas, têm sido amplamente empregadas em produtos agrícolas como revestimento protetor com o objetivo de impedir a expansão de fungos, principalmente àqueles que se desenvolvem na condição pós-colheita (ASSIS, 2008). Sua maior aplicação se dá na forma de filmes ou coberturas, que além de sua ação antimicrobiana atua no controle das mudanças fisiológicas e morfológicas reduzindo o tempo de maturação e elevando a vida de prateleira (SHARIDI et al., 1999; ASSIS e PESSOA, 2004; ASSIS et al., 2008). Essas propriedades funcionais da quitosana podem ser melhoradas quando combinados com demais materiais ou agentes ativos (DUTTA et al., 2009). Filmes de quitosana são normalmente obtidos por “casting” a partir de diferentes soluções ácidas e

diversas caracterizações têm sido conduzidas, principalmente quanto às suas propriedades mecânicas e reológicas (BÉGIN e CALSTEREN, 1999; BRITTO et al., 2005). Com respeito a atividade antimicrobiana, o material na forma de filme, em função da distribuição espacial das cadeias, provavelmente possui impedimento espacial que dificulta uma efetiva interação entre os sítios ativos da quitosana e as membranas celulares dos microorganismos, o que, em princípio, diminuiria a eficiência antimicrobiana. Essa deficiência pode ser superada por um aumento na concentração de cargas na cadeia polimérica, elevando assim o número de sítios aptos para a interação. Esse efeito pode ser conseguido com a modificação da quitosana, por reações de quaternização, que incorporam cargas positivas permanentes junto aos grupos aminos, como os compostos de N,N,N-trimetilquitosana (TMQ).

Estudos recentes com sais quaternários de quitosana têm confirmado a superior atividade desses derivados com relação à quitosana de partida (SADEGHI et al., 2008). Em avaliação preliminar também realizada pela Embrapa a superioridade da atividade antimicrobiana da TMQ foi confirmada e

em estudos com *E. coli* em meio aquoso (CARVALHO et al., 2007). Neste trabalho avaliamos por microscopia de força atômica (AFM) as alterações e características superficiais de filmes de quitosana e de seus sais quaternizados após interação com culturas de bactérias *E.coli*.

### Materiais e métodos

Os filmes e o derivado quaternizado foram processados a partir de quitosana comercial da Aldrich, de médio peso molecular. A quaternização foi conseguida por reação com dimetilsulfato, segundo seqüência apresentada anteriormente (BRITTO e ASSIS, 2007). Os filmes avaliados foram preparados por “casting” sob superfície de vidro a partir de géis precursores na concentração de 2,0g/L. Para formulação com quitosana comercial o solvente foi ácido acético a 1% e para o derivado quaternário foi empregada água deionizada em pH 7. Os filmes ficaram acondicionados em dessecador até a total evaporação do solvente.

A interação com meio de *E.coli* se deu pela imersão dos filmes em solução com culturas, na concentração de  $2 \times 10^8$  microorganismos/mL. Após secagem as superfícies foram varridas em sistema AFM (Veeco Dimension V). O objetivo é investigatório procurando comparar ou identificar alterações nas topografias resultantes da interação das bactérias com a quitosana comercial e com o composto quaternizado.

### Resultados e discussão

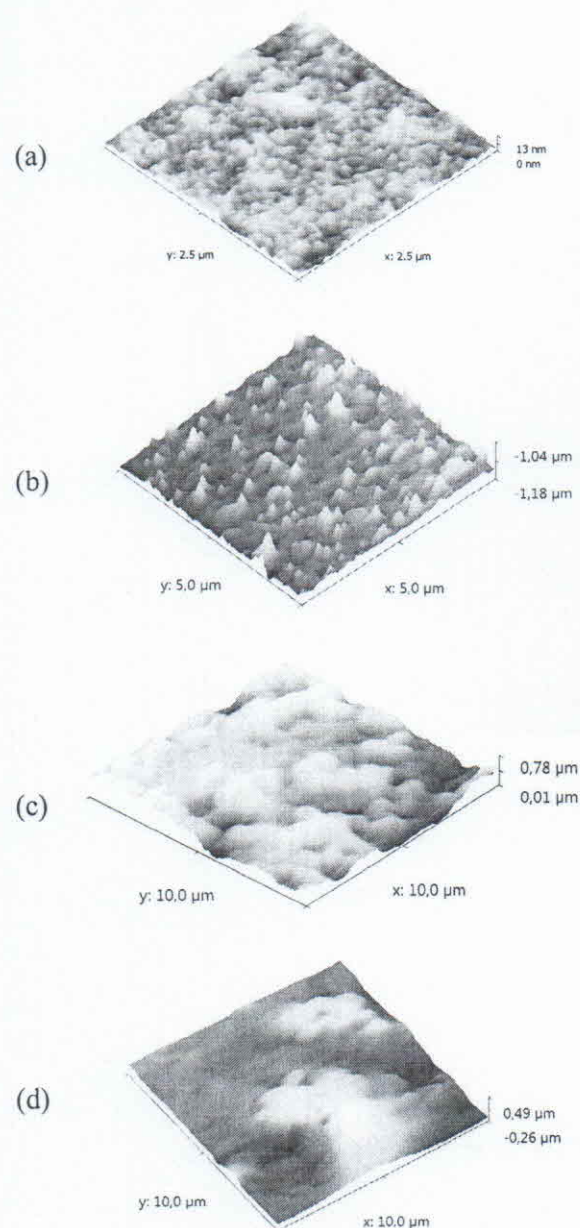
Pelas imagens e pela análise dos dados gerados na Tabela 1, pode-se observar primeiramente, a diferença entre os filmes de quitosana e de TMQ pelas variações na altura média (Z) e na rugosidade. Quitosana, de um modo geral, forma filmes muito finos e uniformes, já a TMQ apresenta uma topografia mais irregular com maior rugosidade. Uma possível causa para este aspecto é a alta concentração de água no polímero, o que gera uma taxa de cura do filme mais lenta e desproporcional entre as diferentes espessuras, formando topografia irregular na condição seca. Associado a esta característica salienta a presença de uma maior densidade de cargas superficiais (grupos  $NH_2$  protonados), que faz com que ocorra uma “repulsão” entre as cadeias que podem levar a formação de filmes menos densos e de espessuras irregulares, este aspecto é depreendido pelas medidas de rugosidade.

Quando temos a presença de bactérias na superfície observamos para ambos os materiais um comportamento semelhante em relação à altura

média e rugosidade (Tabela 1) mostrando que nesses casos a medida topográfica fica sendo governada pelas bactérias adsorvidas.

**Tabela 1.** Valores de altura média (Z) e rugosidade para os filmes de quitosana e TMQ com e sem bactérias adsorvidas.

Filmes	Z (nm)	Rugosidade (nm)
Quitosana	13	1,92
TMQ	140	15,0
Quitosana + <i>E. coli</i>	780	103,0
TMQ + <i>E. coli</i>	750	119,4



**Fig. 1.** Imagens de AFM (a) quitosana; (b) quitosana + *E.coli*; (c) TMQ; (d) TMQ + *E.coli*.

Embora não seja passível de contagem, aparentemente há uma maior concentração de bactérias aderidas ao filme de quitosana do que as encontradas na superfície de TMQ. Duas observações cabem a este comportamento: i) segundo dados da literatura (MORAIS et al., 2009), a aderência de bactérias gram-negativas é maior em superfícies mais hidrofóbicas e neste caso a TMQ é consideravelmente mais hidrofílica que a quitosana e ii) segundo análises realizadas por Silva Jr e Teschke (2005), baseadas em imagens por AFM de *E.coli* imobilizadas sobre mica (um suporte altamente hidrofílico), observou-se que após a interação e ruptura da membrana bacteriana, a capacidade de aderência desses microorganismos são consideravelmente reduzidas, o que interfere em uma amostragem visual. As análises realizadas até o momento parecem confirmar esses resultados indicando, em princípio, uma maior atividade da TMQ.

---

### Conclusões

---

Embora ainda não conclusivas, as imagens geradas por AFM da interação filmes/bactérias indicam uma maior aderência de microorganismos sobre o filme de quitosana do que a observada para o filme de TMQ. Diversos efeitos podem levar a esse comportamento, sendo a hidrofilicidade e a densidade de carga e, conseqüentemente a capacidade de hidrólise, parâmetros que devem ser considerados.

---

### Agradecimentos

---

Fapesp, EMBRAPA, CNPq, FINEP/MCT.

---

### Referências

---

- ASSIS, O. B. G. **Rev. Iber. Tecnología Postcosecha**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 148-152, 2008.
- ASSIS, O. B. G.; FORATO, L. A.; BRITTO, D. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, p. 99-106, 2008.
- ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. **Brazilian J. Food Techn.**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 17-22, 2004.
- BÉGIN, A.; CALSTEREN, M.-R. V. **Int. J. Biological Macromolecules**, Guildford, v. 26, p. 63-67, 1999.
- BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 69, p. 305-310, 2007.

- CARVALHO, C. R.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Estudo da Ação Inibidora do Derivado N,N,N-Trimetilquitosana na Cinética de Crescimento da *E. Coli*. In: SIMPÓSIO EM MICROBIOLOGIA APLICADA, 3., 2007, Rio Claro, SP. **Livro de Resumos...** Rio Claro: UNESP, 2007. v. único. p. 18.
- DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K., DUTTA, J. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 1173-1182, 2009.
- MORAIS, L. C.; BERNARDES-FILHO, R.; ASSIS, O. B. G. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 25, p. 123-129, 2009.
- SADEGHI, A. M. M.; AMINI, M.; AVADI, M. R., SIEDI, F.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H. E. **J. of Bioactive and Compatible Polymers**, [S. l.], v. 23, p. 262-275, 2008.
- SHARIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V; JEON, Y.-J. **Trends in Food Sci. & Technol.**, [S. l.], v. 10, p. 37-51, 1999.
- SILVA JR, A.; TESCHKE, O. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 21, p. 1103-1110, 2005.
- SIMPSON, B. K.; GAGNE, N.; ASHIE, I. N. A. NOROOZI, E. **Food Biotechnol.**, New York, v. 11, p. 25-44, 1997.