

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COBERTURAS DE DERIVADO HIDROSSOLÚVEL DE QUITOSANA SOBRE BROTO DE FEIJÃO

Heloisa Delgado Paulo^{1,2}, Joana Dias Bresolin², Odílio Benedito Garrido Assis²

¹Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. – UFSCar

²Embrapa Instrumentação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, São Carlos, SP. odilio.assis@embrapa.br

Classificação: Processamento de filmes nanoestruturados para embalagens e conservação de alimentos

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a avaliação preliminar do potencial uso do derivado de quitosana (*N,N,N*-trimetilquitosana) na formação de coberturas ativas sobre brotos de feijão. Este derivado apresenta boas características filmogênicas e formação de géis na concentração de 2 gL⁻¹ foram preparados em meio neutro e associados à extratos etanólicos de canela e gengibre. As quantidades de extratos adicionados tiveram por base a determinação prévia dos MICs realizada *in vitro* contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ambos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana com melhor eficiência obtida para o de canela tanto para os ensaios *in vitro* como *in vivo*. As coberturas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, cujas imagens sugerem a ocorrência de certa imiscibilidade entre os compostos, principalmente para a adição de extrato de gengibre a 12 gL⁻¹. Os ensaios de germinação indicaram que, independente da composição, não há efeito das coberturas sobre o vigor das sementes apesar destas comprovadamente ter atividade na redução das contaminações totais. A porcentagem de extrato adicionada na cobertura mostrou-se ser fundamental na redução da contaminação dos grãos.

Palavras-chave: coberturas protetoras; antimicrobiano natural; *N,N,N*-trimetilquitosana; extratos etanólicos de plantas.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HIDROSOLUBLE CHITOSAN COATINGS ON MUNG BEANS

Abstract

The aim of this work was to conduct a preliminary evaluation of the potential use of a water-soluble derivative from chitosan (*N,N,N*-trimethylchitosan) in the formation of an antibacterial active coatings on mung beans. The derivative turns into gel easily and has good film forming ability. Formulations at a concentration of 2 gL⁻¹ were prepared in neutral medium and associated to cinnamon and ginger ethanolic extracts. The amounts of extracts added (6 and 12 gL⁻¹) were based on MIC determinations as *in vitro* measurements performed against *Escherichia coli* (Gram-negative) and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive) strains. Both extracts when incorporated in the coating presented antimicrobial activities with better efficiency for cinnamon either *in vitro* and *in vivo* analysis. The coatings on mung beans were characterized by scanning electronic microscopy, which images suggest some immiscibility between compounds, mainly when ginger extract is added. Germination tests indicated that, independent of the coating composition, there was no interference on beans vigor. The percentage of extract added in the coating showed to be fundamental in reducing total bacterial contamination.

Keywords: protective seed dressing; natural antimicrobial; *N,N,N*-trimethylchitosan; plant ethanolic extracts.

1 INTRODUÇÃO

O termo “quitosana” refere-se a uma família de polímeros resultantes da reação de desacetilação, total ou parcial, da quitina que é considerada o segundo biomaterial mais disponível na

natureza (somente inferior a celulose). A quitosana contudo, é solúvel somente em meio ácido (pH inferior a 6,4) como consequência da protonação dos grupos aminos em sua estrutura. Quando a quitosana é submetida a processo intensivo de metilação (adição de grupos metil – CH₃ no anel glucosamina), um derivado é gerado em consequência da quaternização dos grupos –NH₂. A este derivado damos o nome de *N,N,N*-trimetilquitosana ou TMQ, que apresenta cargas positivas permanentes sendo assim caracterizado como um polímero catiônico, que diferente da quitosana de origem pode ser solubilizada em uma ampla faixa de pHs, inclusive em meio neutro (BRITTO e ASSIS, 2007).

Esse derivado tem características antimicrobianas sendo compatível com a formação de blendas e compostos com demais agentes ativos, sendo já avaliado como coberturas de frutos e grãos (BADAWY e RABEA, 2011) e na encapsulação de nutrientes de interesse alimentar (BRITTO et al., 2012). Coberturas ativas e comestíveis são de particular interesse para aplicações em produtos que são consumidos crus como lentilhas, grãos e brotos de alfafa e feijão por exemplo. Segundo o US Center for Disease Control and Prevention, a cada ano cerca de 48 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo consumo de produtos *in natura* contaminados, sendo o broto de feijão um dos principais responsáveis por infecções de origem bacteriana (CDCP, 2011).

No presente estudo o derivado TMQ foi empregado como matriz de cobertura e avaliado isolado e com adições de extratos hidro-alcoólicos de canela e gengibre como meio de prevenção ao crescimento microbiano sobre brotos de feijão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os extratos foram obtidos a partir de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) disponíveis comercialmente. O processo de extração foi em meio etanólico 70%, conforme procedimentos descritos por Azwanida, 2015. O derivado TMQ foi preparado a partir de quitosana da Aldrich, de média massa molecular, segundo síntese descrita por Britto e Assis, 2007. As coberturas foram conduzidas por imersão em gel preparados na concentração de 2 gL⁻¹ de TMQ em meio água deionizadas com adições de cada extrato separadamente adicionados. As concentrações finais de extrato foram de 6, 25 gL⁻¹ e 12 gL⁻¹, segundo dados previamente obtidos por análise de mínima concentração inibitória (MIC). Brotos de feijão (*Vigna radiata*) foram inicialmente inoculados com *E.coli* e *S.aureus* e depois recobertos com as formulações. Avaliou-se a germinação dos brotos (em papel filtro umedecido) e a ação sobre o crescimento total de bactérias (por crescimento em meio ágar M-H). Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados pelo software Bioestat 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da germinação não revelou variação significativa ($p < 0,05$) nas amostras indicando que as coberturas não tem efeito no vigor das sementes, conforme visualmente ilustradas na Figura 1 e dados numéricos da Figura 2.

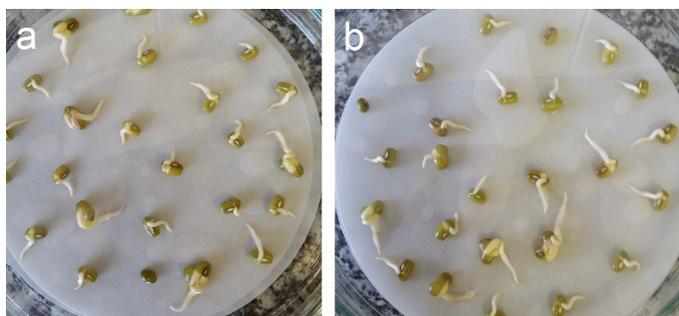


Figura 1. Aspecto dos brotos germinados: (a) sem cobertura. (b) com cobertura de TMQ a 2gL⁻¹

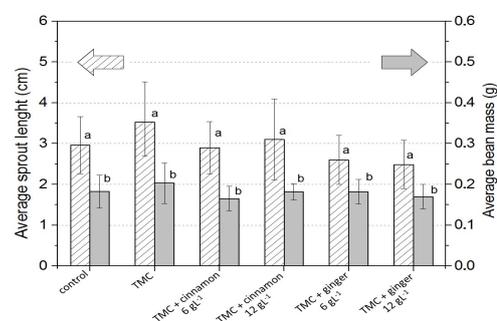


Figura 2. Análise de vigos dos diversos tratamentos

Quando observado sobre microscopia eletrônica foi possível identificar que as superfícies das coberturas formadas não são homogêneas ou planas, sugerindo irregularidades decorrentes de separação de fases ou precipitação de componentes, principalmente com a adição do extrato de

gingibre, indicando possível imiscibilidade entre os componentes. Contudo as coberturas geram proteção antimicrobiana efetiva, como as apresentadas pela contagem de colônias formadas após a deposição, e expressas graficamente na Figura 3 onde é possível observar uma tendência de redução linear no número de contagem bacteriana com o aumento do teor de extrato na cobertura.

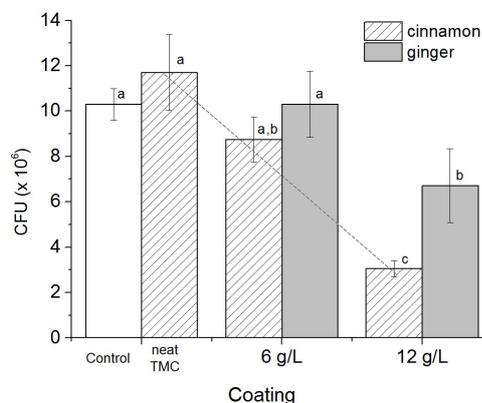


Figura 3 . Contagem de colônias bacterianas em meio de cultura de acordo com inoculação após seis dias de germinação. (Controle = grãos não revestidos). Diferentes letras indicam significância estatística a 5%.

Os resultados das análises microbianas indicam que as coberturas com a presença de extrato de canela são mais efetivas na redução do crescimento total, com uma tendência de redução linear (linha pontilhada, Fig. 3). O ligeiro aumento no número de colônias nos grãos cobertos com somente com TMQ puro é observado e resultados parecidos são encontrados em estudos similares, o e tem sido interpretado pelo fato de quitosana em pequenas quantidades tem ação maior como nutriente do que agente antimicrobiano, resultando em acréscimo na carga bacteriana (ADEKUNLE et al., 2015)

4 CONCLUSÃO

O derivado hidrossolúvel de quitosana TMQ em associação com extratos etanólicos de canela e gengibre apresenta potencial para a formação de coberturas adequadas ao revestimento de grãos. Em particular o extrato de canela apresenta uma melhor atividade conforme análises realizadas contra *E. coli* e *S. aureus in vitro*. As coberturas não alteraram o padrão de germinação quando aplicadas sobre brotos de feijão.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao CNPq (PIBIC), processo 116812/2015 e a Rede AgroNano por auxílios recebidos.

REFERÊNCIAS

- AZWABIDA, N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicine and Aromatic Plants*, v.4, n.3, p.1-6, 2015.
- BADAWY, M.; RABEA, E. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. v. 2011, Article ID 460381, 29p (2011).
- BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. (2007). A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v.69, n.2, p.305-310, 2007.
- BRITTO, D.; MOURA, M.R.; AOUADA, F.A.; MATTOSO, L.H.C.; ASSIS, O.B.G.. N,N,N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles as a Vitamin Carrier System. *Food Hydrocolloids*, v. 27, n.2, p. 487-493, 2012.
- CDCP - Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of foodborne illness in the United States: 2011 analyses. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/#>>. Acesso em 04 fev 2017.