



## Análise da ação de filmes de quitosana e micro/nano partículas de própolis sobre colônias de bactérias gram-positivas

Rejane Celi Goy<sup>1</sup>, Jessica Valéria de Campos<sup>1</sup>, Rubens Bernardes Filho<sup>1</sup>, Humberto de Mello Brandão<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Instrumentação Agropecuária

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite

rejanegoy@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC3

Plano de Ação: PA2

### Resumo

A quitosana é um material muito conhecido pelo seu efeito antibacteriano e pela capacidade de formar filmes. Com o intuito de melhorar as propriedades inibidoras de crescimento bacteriano, estudos com a incorporação da própolis e também de partículas nanoestruturadas dessa matéria prima aos filmes de quitosana foram realizados para observar o comportamento desses novos filmes. A própolis também possui efeito contra bactérias bastante conhecido, sendo amplamente utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas. O objetivo é chegar numa combinação que favoreça a capacidade inibitória do crescimento bacteriano utilizando concentrações adequadas de quitosana e própolis para aplicação em revestimento de alimentos (frutas, por exemplo) que seja eficiente sem alterar sua cor e sabor, bem como não prejudicar as propriedades filmogências da quitosana pela adição da própolis.

**Palavras-chave:** Filmes comestíveis, quitosana, própolis

### Publicações relacionadas

Goy, R. C. ; Britto, D. ; Assis, O. B. G. . A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* (São Carlos. Impresso), v. 19, p. 241-247, 2009.

Britto, D. ; Celi Goy, Rejane ; Campana Filho, Sergio Paulo ; Assis, Odilio B. G. . Quaternary Salts of Chitosan: History, Antimicrobial Features, and Prospects. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, v. 2011, p. 1-12, 2011.

### Introdução

A preocupação com a saúde e a utilização de matérias primas naturais é o foco desse início de século XXI. Após décadas de utilização de matérias sintéticas, defensores agrícolas e materiais altamente poluentes, surgiu a conscientização mundial para preservação do meio ambiente e utilização de produtos de fonte renovável e biodegradáveis. Com grande potencial de aplicação a própolis é muito conhecida por sua ação bactericida pode contribuir com a conservação de alimentos hortifrutis inibindo o desenvolvimento de patógenos. Quitosana é um polissacarídeo que

ocorre na natureza, comumente obtido via desacetilação da quitina em meio alcalino, um abundante subproduto da indústria pesqueira. Ela é composta por co-polímeros com várias frações de unidades acetiladas com estrutura básica poli[(1 → 4)-β-2-amino-2-dioxi-D-glucose] e apresentam boa capacidade de formação de filmes estáveis e com boa plasticidade [1].

A atividade antimicrobiana dessa família de polímeros já é conhecida a bom tempo [2,3], sendo a quitina, a quitosana e seus derivados diversos, testados contra diferentes grupos de microrganismos sempre com resultados positivos [4,5]. A quitosana possui ótima propriedade

SP5759  
P. 186



filmogênica, por isso tem sido muito explorada como membranas e películas, principalmente para o revestimento de produtos agrícolas em processos pós-colheita como embalagens e outros meios de separação. Filmes de quitosana obtidos por *casting* a partir de soluções ácidas têm sido caracterizados quanto às suas propriedades mecânicas com diferentes comportamentos dependentes do solvente empregado na solução precursora [6,7]. A hidrofobicidade dos filmes é uma das propriedades mais importantes, que pode ser relacionada com a transferência de umidade entre o produto e o seu entorno. A perda de água para o meio ambiente nem sempre é desejável considerando que na maioria das aplicações esta característica diminui a qualidade do produto, reduzindo não só sua vida útil, como alterando suas características iniciais [8,1].

Estudos com quitosana para combater a proliferação de bactérias no processo de pós estão sendo desenvolvidos, porém, os mecanismos dessa inibição microbiana ainda está sendo definido, mas os modelos aceitos são os relacionados à natureza policatiónica desses polissacarídeos, que interage com os sítios aniônicos nas proteínas dos micro-organismos. Tal interação é mediada por forças eletrostáticas entre os grupos  $\text{NH}_2$  protonados na quitosana e os resíduos negativos nas paredes celulares. Essa interação interfere com as paredes celulares causando alterações na permeabilidade da membrana, promovendo desbalanços osmóticos internos [2,3]. É igualmente esperado que quanto maior o grau de desacetilação, maior a densidade superficial de cargas que induzirá a atividade antimicrobiana [3,9]. Segundo Jung et al., 1999, o mecanismo por trás dessa atividade antimicrobiana pode ser descrito como dois efeitos atuantes de forma simultânea: i) os grupos amino positivamente carregados ligam-se aos ácidos sialícos nos fosfolípidos e, por conseguinte, inibem o movimento das substâncias microbianas internas; ii) oligômeros de quitosana penetram nas células dos micro-organismos e restringem o crescimento celular através do bloqueio da transcrição do DNA em RNA, segundo modelos adotados por Hadwiger et al., 1989, e mais recentemente descritos em detalhes por Rabea et al., em 2003 [2,10].

Quando aplicada sobre superfície vegetal, a quitosana também ativa enzimas como as quitanases,  $\beta$ -glucanases e lipoxigenases, que estimulam a geração de espécies oxidativas. A ativação desses mecanismos protetores inibe o crescimento de patógenos e organismos

parasitários [11]. Com o objetivo de melhorar as propriedades antimicrobianas dos filmes de quitosana foi acrescentado própolis na composição dos filmes de quitosana. A própolis foi adicionada na forma de nanopartículas.

## Materiais e métodos

Os testes de inibição bacteriana utilizaram filmes de quitosana pura e também combinações desse material com extrato alcoólico de própolis e própolis nanoparticulado. Os filmes foram preparados empregando a técnica de “casting” sob superfície apolar a partir de géis de quitosana na concentração 2,0g/L. A quitosana foi diluída em ácido acético 1% sob agitação magnética constante por 24h. A seguir foram adicionados o extrato puro ou as nanopartículas de própolis nas concentrações de 25 e 15%. As misturas obtidas foram vertidas sobre placas acrílicas e deixadas numa temperatura de 35-45°C sob circulação de ar na máquina para desenvolvimento de filmes comestíveis e recobrimento com sistema não contínuo Mathis LTE-S para evaporação dos solventes. Após a secagem as películas foram destacadas e recortadas em pequenos retângulos e armazenadas em dessecador. A bactéria utilizada foi a gram-positiva *Staphylococcus aureus* em meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth) não seletivo.

## Resultados e discussão

Os testes de inibição foram feitos com os filmes previamente descritos para estudos com a bactéria *S. aureus* numa concentração de  $2 \times 10^8$  bactérias/mL, que foram inoculadas em placas de Petri e partições dos filmes foram colocadas na superfície do meio de cultura. As placas ficaram 24h a 32°C em estufa de circulação para observarmos a inibição ou não dos filmes sobre o crescimento bacteriano. Após esse período de 24h foi observada a formação de halos de inibição de crescimento bacteriano principalmente pela ação dos filmes com 15% de extrato alcoólico e também pelos filmes com 25% de nanopartículas de própolis (Fig.1):

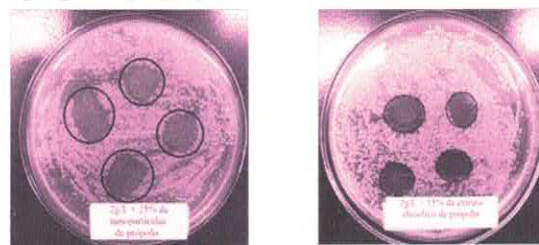


Fig. 1 – Halos de inibição



Foram realizadas análises das nanopartículas de própolis por microscopia de força atômica e foi observada a formação dessas partículas com diâmetro médio de  $447 \pm 141$  nm (Fig. 2).

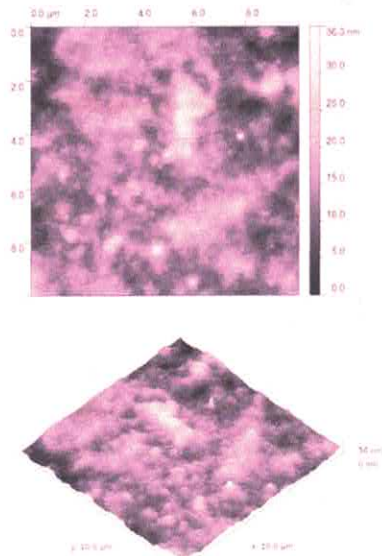


Fig.2– Imagens de MFA de nanopartículas de própolis

### Conclusões

Apesar da eficiência já conhecida da quitosana e da própolis como agentes bactericidas ou bacteriostáticos, a união desses dois materiais para confecção de filmes é um estudo inovador e nas análises preliminares se mostrou eficiente, inibindo o crescimento das bactérias nas proximidades dos filmes observado pela formação dos halos de inibição ao redor das películas e mostrando que essa combinação é favorável para o desenvolvimentos de filmes comestíveis para preservação de frutos pós colheita.

### Agradecimentos

CNPQ, FINEP, EMBRAPA, CAPES, PROJETO COMPONENTE 3 DA REDE AGRONANO.

### Referências

1. ASSIS, O. B. G.; HOTCHKISS, J. H. Surface Hydrophobic Modification of Chitosan Thin-films by HMDS Plasma Deposition: Effects on Water Vapor, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> Permeabilities, *Packaging Technology and Science*, v. 20, p. 293-297, 2007.
2. HADWIGER, L. A., et al. Chitosan both activated genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In: RAA Muzzarelli, C. Jeuniaux, G. W. Gooday (eds.): *Chitin in nature and technology*. Plenum, New York, 209-214, 1981.
3. TSAI, G.J.; SU, W.H. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*, *Journal of Food Protection*, v. 62, p. 239–243, 1999.
4. DEVLIEGHIERE, F., et al. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiology*, v. 21, p. 703–714, 2004.
5. MÖLLER, H., et al. Antimicrobial and Physicochemical Properties of Chitosan-HPMC-Based Films, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 52, p. 6585-6591, 2004.
6. BÉGIN, A.; CALSTEREN, M. R. V. Antimicrobial films produced from chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p.63-67, 1999.
7. BRITTO, D.; et al. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films, *Polímeros*, v. 15, n. 2, p. 129-132, 2005.
8. ASSIS, O. B. G., SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações, *Polímeros*, v.13, n. 4, p. 223-228, 2003.
9. CHUNG, Y.-C.; et al. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens, *Bioresource Technology*, v. 88, p.179-184, 2003.
10. RABEA, E.I.; et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action, *Biomacromolecules*, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.
11. VASYUKOVA, N.I.; et al. Modulation of Plant Resistance to Diseases by Water-Soluble Chitosan, *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 37, n. 1, p.103-109, 2001.