

ISSN 2175-8395

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

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

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

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1a edição

1a impressão (2013): tiragem 50

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

Anais do VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

ESTUDOS DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO PELA AÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E PRÓPOLIS

Rejane Celi Goy^{1*}, Rubens Bernardes Filho¹

¹ Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP, Brazil.
*rejanegy@gmail.com

Projeto Componente: PC3 Plano de Ação: PA3

Resumo

Quitosana é um polímero natural conhecido pela ação contra microorganismos e pela facilidade de formar filmes. A própolis também é um material natural, abundante e de conhecida ação contra vários tipos de bactérias. O intuito do trabalho foi juntar os dois materiais a fim de melhorar a capacidade de inibir a propagação de bactérias gram-positivas. Esta combinação de materiais foi testada com *Staphylococcus aureus* usando diferentes combinações de quitosana e própolis sem alterar as propriedades dos filmes.

Palavras-chave: Quitosana, própolis, filmes finos, filmes antibacterianos.

Introdução

Os tempos atuais mostram uma retomada de interesse pela utilização de produtos orgânicos e conservantes naturais, que preservem a saúde e tragam a natureza para o dia a dia das pessoas.

Sem menosprezar a importância dos produtos sintéticos, o desenvolvimento de novas drogas e materiais originados a partir da biomassa, que são fontes naturais, têm sido amplamente explorados, fornecendo produtos extremamente eficientes para diversos fins. Quitosana e própolis são exemplos de materiais obtidos da natureza e ainda com a vantagem de serem extraídos de fontes antigamente descartadas como rejeitos. A quitosana é um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose de composição variável em função do grau residual de acetilação unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). Sua utilização na forma de filmes tem sido amplamente estudada, principalmente para o revestimento de produtos agrícolas pós colheita.

Propriedades mecânicas e hidrofobicidade são propriedades importantes a serem observadas [BÉGIN; CALSTEREN, 1999; BRITTO et al., 2005]. A transferência de umidade entre o produto e seus arredores não é um fato desejado, pois a perda de água reduz a qualidade do produto, diminuindo sua vida útil e suas qualidades [ASSIS; HOTCHKISS, 2007; ASSIS; PESSOA, 2004]. Os filmes de quitosana são bem conhecidos por sua biofuncionalidade, tolerância pelos tecidos vivos e aplicações como

revestimento comestível para prolongar a vida de prateleira e preservar a qualidade de alimentos frescos [ASSIS; SILVA, 2003]. A própolis é produzida em diferentes regiões do planeta, por isso sua composição química depende da espécie botânica da região e da espécie de abelha que a produz o que resulta também em diferenças de cor e sabor. A própolis é um material complexo, rico em constituintes bioquímicos, com cerca de 300 compostos identificados na sua composição, como o ácido fenólico, terpenos, ácido cinâmico, ácido cafeico, ésteres diversos, e os flavonóides [ZHU et al., 2010]. Os flavonóides são os grupos mais importantes e podem representar cerca de 50% do conteúdo de própolis [TEIXEIRA et al., 2010]. A ação de própolis é atribuída à quantidade de flavonóides, que pode inibir ou matar muitos tipos de bactérias, inibir importantes enzimas virais com a vantagem de uma baixa toxicidade para as células de animais.

Materiais e métodos

Própolis foi fornecido por Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas LTD. O extrato de própolis foi preparado em etanol a 70% a uma concentração de 2,75% de matéria seca, sob agitação constante durante 15 dias à temperatura ambiente e filtrado em membrana de 0,22 μ m para padronização. Quitosana Sigma Aldrich - lote 448877 de médio peso molecular. Os filmes foram preparados por "casting" utilizando o método de superfície não polar. Quatro filmes

foram analisados, todos utilizando quitosana na concentração de 2gL^{-1} : quitosana pura e quitosana com própolis em três concentrações diferentes (10, 15 e 25% de extrato alcoólico). O extrato foi adicionado à solução de quitosana em temperatura ambiente com homogeneização por agitação magnética durante 10 minutos. As misturas obtidas foram vertidas em placas de acrílico os filmes foram obtidos por evaporação do solvente no sistema descontínuo Mathis LTE-S sob ciclos de 40°C .

Foram realizadas caracterizações de hidrofiliidade por ângulo de contato utilizando água deionizada utilizando o medidor de ângulo CAN101 Optical Contact (KSV Instruments®). Os filmes também foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho no Espectrometro Perkin Elmer Paragon 1000 para observar as modificações que a própolis promove na interação com a quitosana.

Testes de inibição foram realizados utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus* em meio TSB (Tryptic Soy Broth de CEFAR Ltda (ATCC 25923/CCCD S007)). Foi utilizado o método de difusão em agar com base na determinação das zonas de inibição de crescimento para identificar o efeitos inibidor dos filmes sobre as bactérias cultivadas [PELCZAR et al., 1980]. No procedimento pedaços retangulares dos filmes foram colocados sobre a superfície do meio sólido em placa de Petri previamente inoculado com o microorganismo. As placas foram incubadas a 32°C por um período de 24 horas. A atividade antimicrobiana filmes aparece com a formação de uma zona de inibição (zona clara) em torno do filme no qual as colônias não crescem. A inibição de crescimento é proporcional à ação antimicrobiana.

Resultados e discussão

Os testes de molhabilidade por ângulo de contato mostram que a própolis modifica os filmes de quitosana, tornando-os menos hidrofílicos. Esse aumento de resistência à absorção é um comportamento desejado, já que dificulta a absorção de água do meio ambiente pelo filme, preservando o conteúdo envolvido por ele. Os flavonóides são compostos com caráter hidrofóbico sendo, provavelmente, os responsáveis pelo aumento da hidrofobicidade dos filmes com mais própolis incorporado (Fig.1), pois é sabido que anéis aromáticos conjugados

presentes em sua estrutura principal têm caráter hidrofóbico.

Nas medidas de ângulo de contato pôde ser observado que no tempo inicial de 20 segundo todos os filmes apresentaram uma queda significativa no ângulo medido, que mostra um comportamento dinâmico (receding angle) atribuído ao caráter hidrofílico da quitosana que é a base dos filmes (Fig. 1). Filmes de quitosana e própolis se mostraram menos hidrofílicos, como observado pelo filme de quitosana com 25% de própolis que mostrou uma variação de menos de 10° nos primeiros 20 segundos e variação total menor que 20° , enquanto a quitosana teve uma variação total maior que 30° no mesmo intervalo de tempo.

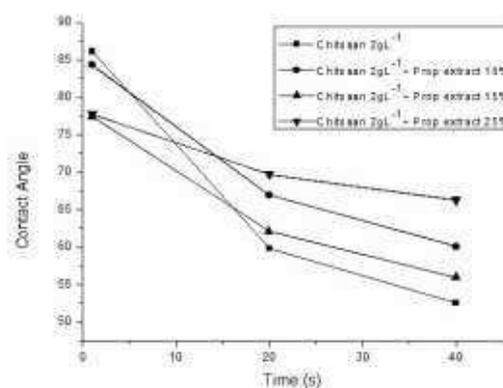


Fig 1 – Medidas de ângulo de contato para os filmes de quitosana e quitosana/própolis.

As análises de espectroscopia por infravermelho mostraram que a adição da própolis modificou as bandas de absorção da quitosana de partida devido a introdução dos grupos flavonóides. Os flavonóides são compostos fenólicos biossintetizados precursores de vários grupos de substâncias, como aminoácidos alifáticos, terpenos, ácidos graxos entre outros. Pode-se observar o aparecimento de bandas diferentes após a adição da própolis devido a presença dos flavonóides, como no caso das bandas em 1637 , 1269 e 1043cm^{-1} . Esta última banda pertence a própolis e não aparece no filme de quitosana pura, exceto em 1033cm^{-1} que também está presente na quitosana devido a presença de álcoois primários.

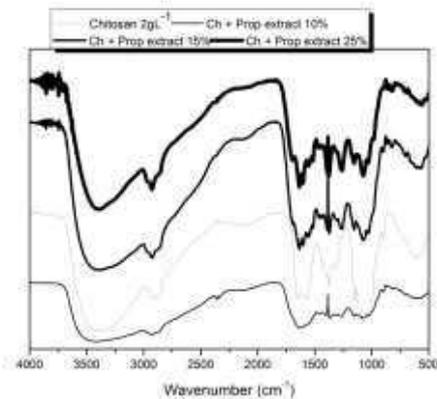


Fig. 2 – Espectro de IV de quitosana e quitosana/própolis.

Nos testes de inibição do crescimento bacteriano a incorporação da própolis favoreceu a atividade bacteriostática dos filmes. Os filmes com 15 e 25% mostraram os melhores resultados. Já o filme de quitosana pura não promoveu a formação dos halos. As medidas foram qualitativas. A continuidade do trabalho será com medidas quantitativas através dos ensaios de MIC (minimum inhibitory concentration).

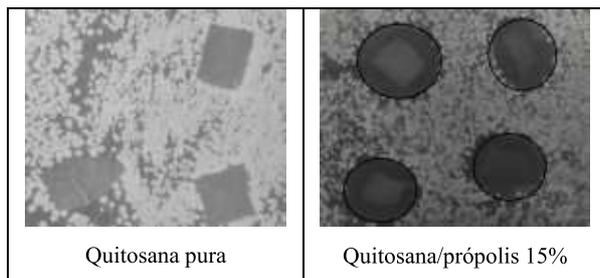


Fig. 3 – Imagens da interação dos filmes com *S. aureus*.

Conclusões

Apesar da conhecida eficiência da quitosana e da própolis contra microorganismos em diversas aplicações, a junção desses dois materiais na forma de filmes é um estudo novo e promissor. Foi observado que a adição do extrato de própolis aos filmes de quitosana favoreceu a inibição do crescimento bacteriano além de reduzir a molhabilidade dos filmes, que é uma característica importante e desejada para possíveis aplicações como de revestimentos pós colheita. Os filmes com maiores proporções de própolis promoveram a formação de zonas de inibição mais eficazes, devido a maior quantidade de flavonóides presentes, que são os sítios responsáveis pela ação contra as bactérias. Conhecendo a capacidade

inibitória dos filmes a etapa seguinte é a realização de medições quantitativas de inibição.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

Referências

- ASSIS, O. B. G.; HOTCHKISS, J. H. Surface Hydrophobic Modification of Chitosan Thin films by HMDS Plasma Deposition: Effects on Water Vapor, CO₂ and O₂ Permeabilities, *Packaging Technology and Science*, v. 20, p. 293-297, 2007.
- ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Chitosan thin-film preparation for use as edible and fungi growth inhibitor coating on sliced fruits”, *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 7, e. 1, p. 17-22, 2004.
- 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.
- BÉGIN, A.; CALSTEREN; M.R.V. Antimicrobial films produced from chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p.63-67, 1999.
- BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P.; ASSIS, O.B.G. Mechanical properties of N,N,N-trimethylchitosan chloride films, *Polímeros*, v. 15, n. 2, p. 129-132, 2005.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. Vol. 1 - Mac Graw-Hill, 1980.
- TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Própolis Samples, *eCAM Advance Access*, 7(3) 307–315, 2010.
- ZHU, W.; CHEN, M.; QIYANG, S.; YINGHUA, L.; FULIANG, H., Biological Activities of Chinese Propolis and Bazilian Propolis on Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats”, *eCAM Advance Access*, Article ID 468529, 2010.