

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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA N,N,N-TRIMETILQUITOSANA E DA QUITOSANA COMERCIAL CONTRA CEPAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

Leandro Prezotto da Silva¹, Tamíres Aparecida Bitencourt², Douglas de Britto³, Ana Lucia Fachin², Mirna Helena Regali Selegim¹ e Odílio Benedito Garrido Assis³

¹Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – Laboratório de Microbiologia

²Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP – Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Instrumentação

*lepresil@hotmail.com, tabitencourt@yahoo.com.br, dougbritto@gmail.com, afachin@unaerp.com, pmhrs@iris.ufscar.br e odilio.assis@embrapa.br

Projeto Componente: PC3 Plano de Ação: PA2

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) e da Quitosana Comercial (QC) sobre cepas padrões gram-positivas e gram-negativas. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) foram determinadas a partir do método de microdiluição em caldo recomendado pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), de acordo com a norma M7-A6 (NCCLS, 2003). Os resultados demonstraram que ambas as substâncias apresentam atividade antibacteriana. Entretanto, a TMQ apresentou maior atividade antibacteriana para as seguintes cepas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; N,N,N-trimetilquitosana; quitosana comercial

Introdução

A necessidade do prolongamento da vida de prateleira de produtos alimentícios tem estimulado a procura por substâncias naturais que, quando combinadas aos alimentos, diminuem suas taxas de senescência e de atividade microbiana, aumentando o período de conservação. Dentre os produtos avaliados como conservantes naturais a quitosana, um biopolímero derivado da quitina, tem se mostrado eficaz na formação de coberturas comestíveis, com resultados satisfatórios tanto em atividade antimicrobiana como na manutenção estrutural de alimentos. Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina na quitina, enquanto na quitosana há a predominância de unidades D-glicosamina. Estruturas básicas apresentadas na Fig. 1.

Por ser um material de origem natural, a quitosana tem sido aplicada como filmes de revestimento comestíveis para prolongar a vida de

prateleira e preservar a qualidade de alimentos frescos.

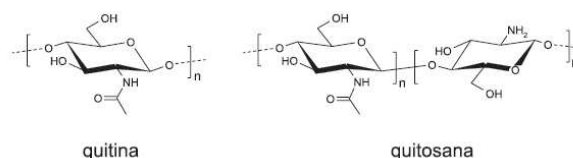


Fig 1. Estruturas da quitina e quitosana .

Além disso, frequentes são os esforços para o desenvolvimento, por modificações químicas, de derivados funcionais solúveis em um maior intervalo de pH, principalmente, aqueles que permitam uma maior solubilidade em água.

Derivados Hidrossolúveis de Quitosana

A insolubilidade em água, a viscosidade elevada e a facilidade de coagulação com proteínas em pH elevado, são características que têm dificultado a manipulação da quitosana e sua utilização em experimentos laboratoriais. O aumento da solubilidade da quitosana pode ser conseguido pela introdução permanente de cargas positivas em sua cadeia polimérica resultando em

um polieletrólito catiônico independente do pH do meio aquoso. Este processo pode ser conduzido pela quaternização dos átomos de nitrogênio presentes nos grupos amino. Para efetuar esta reação, é realizado um processo extensivo de metilação, representado pela Fig. 2 por Britto e Assis (2007). Dessa forma obtém-se a N,N,N-trimetilquitosana, um derivado de quitosana com G.D de aproximadamente 52,5% e que, segundo avaliações preliminares, apresenta alta solubilidade, elevada capacidade de formação de filmes e boa atividade antimicrobiana (BRITTO; ASSIS, 2007).

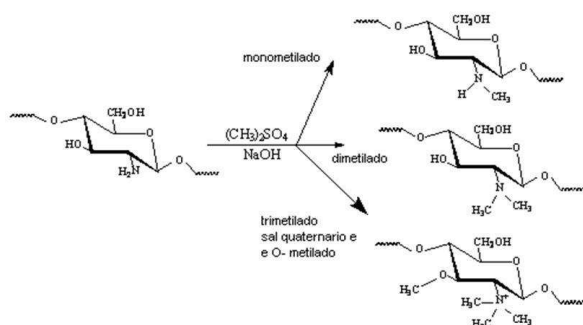


Fig. 2. Representação esquemática da reação de quaternização dos grupos amino da quitosana gerando o derivado hidrossolúvel N,N,N-trimetilquitosana.

Atividade Antimicrobiana da Quitosana

A atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados frente aos diferentes grupos de microrganismos, tais como as bactérias, recebeu considerável atenção nos últimos anos. De acordo com Rabea et al. (2003), a quitosana apresenta atividade antibacteriana contra diversas cepas. Silva et al. (2010) observaram a presença de atividade antibacteriana da N,N,N-trimetilquitosana contra *E. coli*, com concentração inibitória mínima de aproximadamente 0,075%. Entretanto, as aplicações da quitosana são multidimensionais e estudos tem mostrado que este polímero também apresenta ação antimicrobiana na forma de filmes (GOY et al., 2009). Portanto, estudos que ampliem o conhecimento a cerca das potencialidades dos derivados de quitosana e seus mecanismos de ação antimicrobianos, são necessários, tendo em vista a demanda técnico-científica pela identificação e desenvolvimento de agentes inibidores do crescimento microbiano aplicados à conservação de alimentos.

Materiais e métodos

Cepas e Caracterização das Quitosanas

As seguintes cepas foram utilizadas nos experimentos: *Enterococcus faecalis* (ATCC

29212), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 6380) e *Salmonella entérica* (ATCC 13076). A N,N,N-trimetilquitosana é um derivado hidrossolúvel de quitosana trimetilada e apresenta G.D de aproximadamente 52,5 %, segundo características apresentadas por Britto e Assis (2007) e Britto e Assis (BRITTO; ASSIS, 2007). A Quitosana Comercial foi adquirida de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) e apresenta como características, médio peso molecular e G.D de aproximadamente 78%.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi baseada no teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos, recomendado pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), de acordo sua norma M7-A6 (NCCLS, 2003). Placas de 96 poços foram preparadas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro com valores de absorbância entre 0.100 e 0.125, em comprimento de onda de 550nm. A TMQ foi diluída em água com concentração de 2mg/mL. A QC foi diluída em ácido acético 0,1% com concentração idêntica à TMQ. A leitura dos resultados foi realizada através da identificação visual dos poços com crescimento bacteriano (presença de pellets), sendo a CIM, a menor concentração a não apresentar crescimento (ausência de pellets).

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada a partir do plaqueamento das suspensões bacterianas presentes nos poços em que a CIM foi identificada. Foram retirados 100µL de cada poço referente à CIM, 2x CIM e CIM/2, plaqueados e incubados durante 24 horas a 37°C. Após a incubação, as placas foram avaliadas de acordo com a presença ou ausência de crescimento bacteriano. No caso da presença de crescimento, a respectiva suspensão plaqueada representa uma concentração bacteriostática, enquanto que as demais concentrações, na ausência do crescimento, foram consideradas como concentrações bactericidas. A CBM representa a menor concentração da substância em solução que, após inoculação e plaqueamento, não apresente crescimento bacteriano.

Resultados e discussão

Os resultados demonstraram a presença de atividade antibacteriana da TMQ e da QC contra todas as cepas analisadas. De acordo com a Tab. 1, a QC apresentou Concentrações Inibitórias e

Bactericidas Mínimas inferiores a 1mg/mL para todas as cepas, enquanto a TMQ apresentou valores maiores que 1mg/mL, de CIM e CBM para *P. vulgaris*, e de CBM para *E. faecalis*.

Apesar de a TMQ apresentar uma maior amplitude de CIMs em relação à QC, ela se mostrou mais eficiente contra a maioria das cepas analisadas.

Tab 1. Concentrações Inibitórias e Bactericidas Mínimas por microrganismo.

Microrganismo	Reação de Gram	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CBM ($\mu\text{g/mL}$)	
		TMQ	QC	TMQ	QC
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	63	250	>1000	1000
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	250	125	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	63	250	63	250
<i>Escherichia coli</i>	-	250	500	250	500
<i>Proteus vulgaris</i>	-	>1000	500	>1000	500
<i>Salmonella enterica</i>	-	63	500	125	500

Foi observado que, com exceção das cepas *E. faecalis* e *S. enterica*, as CIMs foram equivalentes às CBMs. A Fig. 3 representa uma comparação das CIMs entre TMQ e QC. Verificou-se que a TMQ apresentou, em relação à QC, CIMs menores para quatro das seis cepas analisadas, sendo duas gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*) e duas gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*).

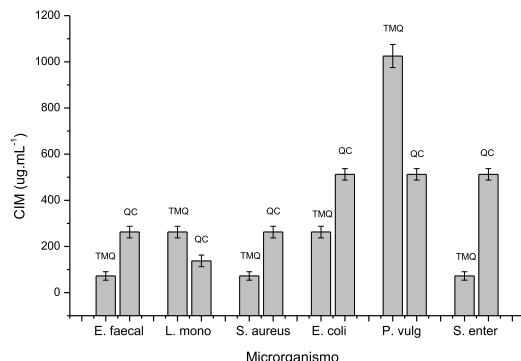


Fig 3. Concentração Inibitória Mínima por microrganismo.

P. vulgaris foi considerada a cepa mais resistente aos agentes antimicrobianos testados

Por outro lado, duas das cepas analisadas foram mais sensíveis à TMQ e à QC, *E. faecalis* e a *S. aureus*. Durante os testes foi notado que soluções de ácido acético, o solvente utilizado para a dissolução da QC, em concentrações maiores que 0,1%, inibem o crescimento das cepas analisadas. Dessa forma, a dissolução da QC foi realizada com AC. Acético a 0,1%. Portanto, a TMQ e a QC são substâncias com relevante potencial antibacteriano tanto contra

cepas gram-positivas quanto para cepas gram-negativas.

Conclusões

A N,N,N-trimetilquitosana e a Quitosana Comercial são compostos que apresentam atividade antibacteriana contra cepas gram-positivas e gram-negativas. A atividade antibacteriana da TMQ em relação à QC foi superior para a maioria das cepas analisadas. No entanto, ambas apresentaram CIMs e CBMs inferiores a 1mg/mL, o que indica que tais quitosanas são promissores agentes antibacterianos.

Agradecimentos

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

Referências

- BRITTO, D. E ASSIS, O.B.G. A new method for obtaining of quaternary salt of chitosan. Carbohydrate Polymers, v. 69, p. 305-310, 2007.
- BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Synthesis and mechanical properties of quaternary salts of chitosan-based films for food application. International Journal of Biological Macromolecules, v. 41, p. 198-203, 2007.
- RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules, v.4, n.6, p.1457-1465, 2003.
- SILVA, L. P.; BRITTO, D.; SELEGHIM, M. H. R.; ASSIS, O. B. G. In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan choride salt against *E. coli*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, p. 2089-2092, 2010.
- GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. Polimeros: Ciência e Tecnologia, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.
- NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.