

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

LEANDRO PREZOTTO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA N,N,N-TRIMETILQUITOSANA
E DA QUITOSANA COMERCIAL SOBRE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS GRAM-
POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS E DE FUNGOS FILAMENTOSOS.

São Carlos/SP
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

LEANDRO PREZOTTO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA N,N,N-TRIMETILQUITOSANA
E DA QUITOSANA COMERCIAL SOBRE O CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS GRAM-
POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS E DE FUNGOS FILAMENTOSOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia
do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
da Universidade Federal de São Carlos, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

Orientador: Dr. Odilio Benedito Garrido de Assis

Colaboradora: Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto

São Carlos/SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586aa Silva, Leandro Prezotto da.
Avaliação da atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana e da quitosana comercial sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos filamentosos / Leandro Prezotto da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
67 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Alimentos - microbiologia. 2. Agentes antimicrobianos naturais. 3. Concentração inibitória mínima. 4. Alimentos - conservação. I. Título.

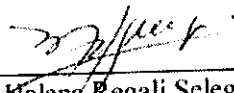
CDD: 576.163 (20^a)

Leandro Prezotto da Silva

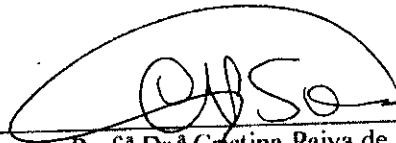
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 16/04/2014

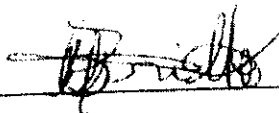
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Mirna Helena Regali Seleghim (Orientadora)
(UFSCar)



Prof.ª Dr.ª Cristina Paiva de Sousa
(UFSCar)



Prof. Dr. Douglas de Britto
(EMBRAPA Instrumentação)

*Dedico esta obra aos meus professores, amigos
e familiares que me apoiaram e contribuíram
para mais esta conquista em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Mirna Helena Regali Selegim e Dr. Odilio Benedito Garrido de Assis pela oportunidade concedida, pela orientação, pelos conselhos e confiança no meu trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto do Laboratório de Biociências da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), pelo apoio técnico e científico, pela colaboração e disponibilização dos laboratórios necessários para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Douglas de Britto, Dr. Daniel Corrêa e à Profa. Dra. Cristina Paiva pela leitura, correção e acréscimo de idéias e conteúdo ao texto.

À Tamires Bitencourt, Doutoranda em Biotecnologia pela UNAERP, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos, pela receptividade, paciência, dedicação e principalmente, pela solicitude, imprescindíveis para o desenvolvimento do projeto.

Ao pessoal do Laboratório de Biociências da UNAERP, em especial à Taty, ao Felipe, à Natty, ao Gabriel, à Mari, ao Vitor e à todos aqueles que me ajudaram durante a realização da pesquisa.

Aos meus pais, pelo carinho, compreensão, educação e incentivo na busca de meus sonhos.

Aos meus irmãos, por toda a amizade e por serem essas pessoas maravilhosas às quem eu sempre me espelharei.

À minha esposa, pelo amor, companherismo, pelo acolhimento e conforto durante os momentos mais difíceis.

À minha querida filha, por ser minha fonte inesgotável de motivação e inspiração.

À todos os meus amigos, pelos vários momentos de descontração e felicidade.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!!!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido
e não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Muitos têm sido os esforços pela procura de substâncias naturais que possam ser aplicadas à conservação de alimentos. Dentre as substâncias em estudo, a quitosana tem apresentado resultados promissores tanto com relação à atividade antimicrobiana quanto na manutenção estrutural de alimentos e redução da senescência em frutos. No entanto, a quitosana, em sua forma comercial, é solúvel apenas em soluções ácidas diluídas, o que dificulta sua plena utilização como conservante alimentício. Dessa forma, derivados de quitosana que apresentem capacidade de solubilização em pH neutro têm sido desenvolvidos. Dentre esses derivados a N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), um polímero hidrossolúvel derivado da quitosana, tem sido avaliado como promissor agente antimicrobiano e conservador de alimentos frescos. Assim, o presente projeto teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de fungos filamentosos. A atividade antimicrobiana da TMQ foi avaliada mediante comparação com a Quitosana Comercial (QC) pela determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) a partir de testes padronizados pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), segundo suas normas M7-A6 (NCCLS, 2003) e M38-A (NCCLS, 2002), ambas reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, a avaliação da atividade antifúngica das substâncias foi realizada mediante leitura visual e estimada a partir do percentual de amostras infectadas pelos fungos sobre fatias de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* variedade *cerasiforme*) revestidas e não revestidas, ao longo de sete dias de incubação. Os resultados indicaram uma maior atividade antibacteriana da TMQ em relação à QC para quatro das seis cepas bacterianas analisadas: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. No entanto, a atividade antifúngica da QC superou a da TMQ para os três fungos testados: *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus* padrão e *Aspergillus flavus* selvagem. Entretanto, ambos os polímeros avaliados apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica satisfatória sendo, portanto, considerados como agentes naturais com potencial antimicrobiano relevante para a conservação de alimentos frescos.

Palavras-chave: Agentes Antimicrobianos Naturais; Concentração Inibitória Mínima; Conservação de Alimentos Frescos.

ABSTRACT

Many efforts have been dedicated in the searching of natural compounds which are suitable to be applied in food conservation. Among them, the chitosan has presented promising results concerning the antimicrobial activity, structural preservation and delay of fruits senescence. However, the chitosan, as found commercially, is soluble only in acidic medium solutions what is considered a hindrance for fully applications as food conservative. In this sense, chitosan derivations which are able to be solubilized in neutral pH have been developed. The N,N,N – Trimethylchitosan (TMC) is one of them, characterized as a hydrosoluble derivative of chitosan, which has been considered as an efficient antimicrobial agent with positive action as fresh food conservative. The aim of the present was the evaluation of the antimicrobial activity of the TMC against Gram-positive and Gram-negative bacteria and filament fungi. The TMC antimicrobial activity was assessed by comparing with the Commercial Chitosan (CC), by means of the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) according to M7-A6 (NCCLS, 2003) and M38-A (NCCLS, 2002) standards, both recognized by the “Agência Nacional de Vigilância Sanitária” (ANVISA). Additionally, the TMC and CC antifungal activity was carried out by recoding the visual fungi growth and estimated from the percentage of infected samples by the fungus on cut faces of grape-tomatoes (*Solanum lycopersicum* variety *cerasiforme*), in coated and non-coated conditions, along seven days of incubation. The results concerning antibacterial activity points to a greater action of the TMC when comparing to some analysis performed on CC coating against four of the six strains analyzed: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Nevertheless the CC antifungal activity was considerable superior to that observed to TMC for three different fungi tested: *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus* standard and *Aspergillus flavus* wild. However, both polymers showed high antibacterial and antifungal activity and are therefore considered as natural agents with relevant antimicrobial potential for the fresh food conservation.

Key-words: Natural Antimicrobial Agents; Minimum Inhibitory Concentration; Fresh Food Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas da quitina e quitosana (COSTA SILVA, 2006).....	2
Figura 2. Espectro de RMN ^1H de quitosana dissolvida em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1 v/v) (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).....	4
Figura 3. Espectro de RMN ^1H do derivado 1 dissolvido em D_2O (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).....	4
Figura 4. Espectro de RMN ^1H do derivado 2 dissolvido em D_2O (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).....	4
Figura 5. Espectro de RMN ^1H de quitosana [10 mg.mL^{-1}] dissolvida em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1 v/v) (A) e da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) [10 mg.mL^{-1}] dissolvida em D_2O (B) (BRITTO <i>et al.</i> , 2005).....	5
Figura 6. Representação esquemática da reação de quaternização dos grupos amino da quitosana gerando o derivado hidrossolúvel N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) (BRITTO e ASSIS, 2007a).....	7
Figura 7. Topografia típica de filme de quitosana formado sobre uma superfície de fruta, adquirida por microscopia de força atômica. Quitosana em concentração de 20 mg.mL^{-1} (ASSIS e PESSOA, 2004).....	8
Figura 8. Aparência de faces de uma mesma maçã (A) revestida com quitosana e (B) não revestida, após 8 dias de armazenamento (ASSIS e PESSOA, 2004).....	9
Figura 9. Digitalização de imagens de microscopia eletrônica de filme de quitosana controle (A) e (B), e filme contendo OEC a 15 mg.mL^{-1} (C) e (D) nas superfícies e seções, respectivamente, segundo apresentadas por MATAN <i>et al.</i> (2006).....	10
Figura 10. Fotomicrografia eletrônica de células de <i>S. simulans</i> (controle) (a), tratadas com quitosana [$10 \times \text{CIM}$ ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$)] por 5 min (b), 20 min (c) e 60 min (d) (RAAFAT <i>et al.</i> , 2008).....	14
Figura 11. Representação esquemática da placa de 96 poços após incubação para <i>E. faecalis</i> e <i>S. aureus</i>	29
Figura 12. Preparação das placas: (a) controle com fatias de tomate-cereja imersas em H_2O destilada, (b) em solução de ácido acético 1%, (c) em solução de TMQ ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e (d) em solução de QC ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$).....	31
Figura 13. Incubação em estufa a 35°C das placas com fatias de tomate-cereja inoculadas. ...	31

Figura 14. Comparação entre os valores de CIM da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.	35
Figura 15. Comparação entre os valores de CBM da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.	38
Figura 16. Comparação entre os valores de CIM e CBM da TMQ contra as bactérias testadas.	39
Figura 17. Comparação entre os valores de CIM e CBM da QC contra as bactérias testadas. .	40
Figura 18. Filmes de TMQ e QC contra <i>E. faecalis</i> : (a) controle, (b) filme de TMQ (2,0 mg.mL ⁻¹) (c) controle (d) filme de QC (2,0 mg.mL ⁻¹). As setas indicam a posição do filme....	42
Figura 19. Filmes de TMQ e QC contra <i>E. faecalis</i> : (a) controle, (b) filme de TMQ (2,0 mg.mL ⁻¹) (c) filme de QC (2,0 mg.mL ⁻¹).	42
Figura 20. Filmes de TMQ e QC contra <i>S. enterica</i> : (a) filme de TMQ (2,0 mg.mL ⁻¹) e (b) filme de QC (2,0 mg.mL ⁻¹).	43
Figura 21. Atividade antifúngica da solução de TMQ contra <i>Penicillium</i> sp.	46
Figura 22. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra <i>Penicillium</i> sp. (Controle = fatias imersas em H ₂ O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ ; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹).	47
Figura 23. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra <i>A. flavus</i> padrão (Controle = fatias imersas em H ₂ O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ ; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹).	47
Figura 24. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra <i>A. flavus</i> selvagem (Controle = fatias imersas em H ₂ O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ ; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹).	48
Figura 25. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com <i>Penicillium</i> sp. após 7 dias de incubação: (a) fatias imersas em H ₂ O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	49
Figura 26. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com <i>A. flavus</i> padrão após 7 dias de incubação: (a) imersas em H ₂ O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	49
Figura 27. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com <i>A. flavus</i> selvagem após 7 dias de incubação: (a) imersas em H ₂ O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	50

Figura 28. Atividade inibitória dos filmes de QC sobre fatias de tomate-cereja inoculadas com <i>Penicillium</i> sp., após 7 dias de incubação.	51
Figura 29. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do <i>Penicillium</i> sp. após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) com solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	52
Figura 30. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do <i>A. flavus</i> padrão após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) com solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	52
Figura 31. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do <i>A. flavus</i> selvagem após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a 2,0 mg.mL ⁻¹ e (d) com solução de QC a 2,0 mg.mL ⁻¹	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grau médio de desacetilação (GD) a partir de quitosana e grau médio de quaternização (GQ) de amostras de TMQ determinadas por RMN ¹ H (adaptado de BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).....	5
Tabela 2. Aplicações da quitina, quitosana e seus derivados na indústria de alimentos, baseado em Shahidi <i>et al.</i> (1999).	11
Tabela 3. Principais agentes biológicos que contaminam alimentos (adaptado de ACHESON, 1999).....	13
Tabela 4. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de diferentes quitosanas contra bactérias, baseado em Silva <i>et al.</i> (2010).....	16
Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias (adaptado de RABEA <i>et al.</i> , 2003).	17
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos, baseado no levantamento realizado por Goy <i>et al.</i> (2009).	18
Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos (adaptado de RABEA <i>et al.</i> , 2003).	19
Tabela 8. Características comparativas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (adaptado de TORTORA <i>et al.</i> , 2005).	20
Tabela 9. Linhagens bacterianas utilizadas nos experimentos.	24
Tabela 10. Linhagens fúngicas utilizadas nos experimentos.....	24
Tabela 11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.	34
Tabela 12. Determinação da Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.	37
Tabela 13. Comparação entre os valores de CIM e CBM para cada cepa bacteriana analisada.	39
Tabela 14. Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra os fungos testados.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - “American Type Culture Collection”

BHI - “Brain Heart Infusion”

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CECT - Coleção de Culturas da Espanha

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”

DNA - “Deoxyribonucleic Acid”

GD - Grau de Desacetilação

GQ - Grau de Quaternização

LPSs - Lipopolissacarídeos

ME - Membrana Externa

MFA - Microscopia de Força Atômica

MH - “Mueller Hinton”

NaOH - Hidróxido de Sódio

NMP - N-metil-2-pirrolidona

OEC - Óleo Essencial de Canela

pH - potencial Hidrogeniônico

pKa - Constante de Dissociação Ácida

PM - Peso Molecular

PP - Filmes de Polipropileno

ppm - partes por milhão

QC - Quitosana Comercial

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA_m - “Ribonucleic Acid” mensageiro

RPMI - “Roswell Park Memorial Institute”

TMQ - N,N,N,-trimetilquitosana

TTC - Cloreto de Trifeniltetrazólio

v/v - vólum por vólum

YPG - Extrato de Peptona e Glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1 Quitosana	1
2.2 Derivados Hidrossolúveis de Quitosana.....	3
2.3 Filmes Comestíveis de Quitosana	7
2.4 Atividade Antimicrobiana da Quitosana	10
2.5 Caracterização dos Microrganismos.....	19
2.5.1 Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	19
2.5.2 Fungos Filamentosos	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Linhagens Microbianas.....	23
4.2 Meios de Cultura	24
4.3 Caracterização da TMQ e da QC.....	25
4.4 Preparação dos Inóculos para Determinação da CIM	26
4.5 Concentração do Solvente para Solubilização da QC	27
4.6 Preparação das Soluções de TMQ e QC.....	27
4.7 Preparação das Placas para Determinação da CIM	28
4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
4.9 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	30
4.10 Determinação da Atividade Antifúngica dos Filmes de TMQ e QC.....	30
4.11 Preparação dos Filmes de TMQ e QC	32

4.12 Verificação de Halo de Inibição das Soluções e Filmes de TMQ e QC.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Atividade Antibacteriana da TMQ e da QC	33
5.2 Atividade Antifúngica da TMQ e da QC	45
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	56
7. CONCLUSÃO.....	57
8. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em função das características de processamento, os alimentos classificados como prontos para o consumo (“ready to eat”) apresentam curta vida de prateleira, necessitando de tecnologias apropriadas para elevar o tempo para o transporte e/ou armazenamento desses produtos. Neste sentido, substâncias naturais que, quando aplicadas a esses alimentos, diminuem suas taxas de senescência e de atividade microbiana têm sido alvo de pesquisa. 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 na atividade antimicrobiana como na manutenção textural de alimentos (BRITTO *et al.*, 2012).

Entretanto, a quitosana é um composto insolúvel em água, apresenta viscosidade elevada e facilidade de coagulação com proteínas em pH elevado. Tais características têm dificultado sua plena utilização como conservador de alimentos. O desenvolvimento, por modificações químicas, de derivados funcionais solúveis de quitosana em um maior intervalo de pH, principalmente em pH próximo a 7,0, tem sido objeto de pesquisa, o que eleva a biocompatibilidade e a aplicabilidade deste material em alimentos.

Ainda não estão definidos claramente quais são os mecanismos de ação antimicrobiano da quitosana e seus derivados, mas seu potencial antimicrobiano já é reconhecido e sua aplicação em alimentos tem sido bastante avaliada (SHAHIDI *et al.*, 1999; RABEA *et al.*, 2003; RAAFAT *et al.*, 2008; GOY *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUITOSANA

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 (RINAUDO, 2006) (Figura 1).

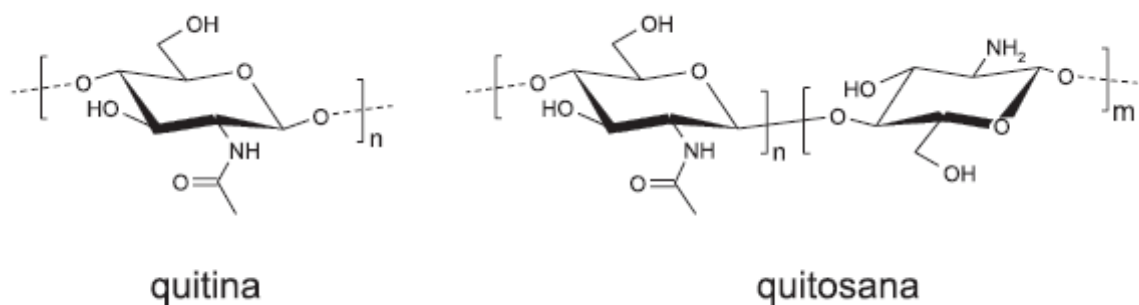


Figura 1. Estruturas da quitina e quitosana (COSTA SILVA, 2006).

A quitosana pode ser obtida a partir da desacetilação da quitina fazendo-se uso de um álcali, como o hidróxido de sódio (NaOH), por exemplo. Entretanto, a quitosana também pode ser encontrada naturalmente, em menor quantidade, na parede celular de alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KHOR, 2002).

As propriedades físicas e químicas da quitina e de seus derivados N-desacetilados (quitosana) são distintas. Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, a quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas (ácido acético, fórmico, láctico), na faixa de pH próxima a 4,0 (CHATELET *et al.*, 2001; RABEA *et al.*, 2003).

A solubilidade em soluções ácidas diluídas e suas características filmogênicas tem possibilitado a utilização da quitosana no desenvolvimento de filmes para fins diversos (ASSIS *et al.*, 2002; ASSIS e SILVA, 2003). Dessa forma, por ser um material de origem natural, a quitosana tem sido largamente avaliada como formadora de coberturas comestíveis para prolongar a vida de prateleira e preservar a qualidade de alimentos frescos e fatiados (ASSIS e PESSOA, 2004).

O potencial antimicrobiano de alguns derivados de quitosana (soluções, filmes e compostos) sobre uma série de organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos também vem sendo reportado por diversos pesquisadores (RABEA *et al.*, 2003; RAAFAT *et al.*, 2008; GOY *et al.*, 2009; KONG *et al.*, 2010), indicando ação inibitória contra cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas e sobre o crescimento de alguns fungos (WANG, 1992; DARMADJI e IZUMIMOTO, 1994; RABEA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2005; SILVA *et al.*, 2010), sendo assim, sugeridos como conservantes naturais de alimentos.

2.2 DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DE QUITOSANA

De um modo geral a solubilidade da quitosana em pH neutro talvez seja o parâmetro mais difícil de ser controlado, uma vez que este é diretamente influenciado por outras variáveis, tais como: o grau de desacetilação (GD), a concentração iônica, natureza do ácido usado para a protonação, distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia, as condições de extração e a secagem do polissacarídeo (RINAUDO, 2006). A quitosana, na sua forma comercial, possui geralmente grau de desacetilação (GD) variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de $104 - 106 \text{ g.mol}^{-1}$ de cada monômero. Como muitas das propriedades destes polissacarídeos estão intimamente relacionadas a estes dois parâmetros (MIMA *et al.*, 1983; DOMARD, 1987), torna-se fundamental a determinação precisa do teor de grupos N-desacetilados (GD) e, conseqüentemente, de grupos NH_2 , assim como qualquer outra modificação química introduzida (SANNAN *et al.*, 1976; DAVIES e HAYES, 1988). Geralmente, a dificuldade de obter quitosana com elevado GD, decorre da degradação que o polímero sofre no processo de desacetilação (KUMAR, 2005). As principais técnicas para determinar essas características estruturais envolvem a espectroscopia na região do infravermelho e do ultravioleta, a cromatografia gasosa, a titulometria e a ressonância magnética (TAN *et al.*, 1998; NO *et al.*, 2002; BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004). Dentre essas, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada a melhor por proporcionar um maior número de resultados confiáveis. Segundo espectro de RMN ^1H da quitosana disponível na literatura (Figura 2), os seguintes sinais característicos são identificáveis para a quitosana e dois de seus derivados (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004): (a) $\delta = 4,5 < \delta < 5,0$ atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono anomérico 1 (b) $\delta = 3,4 < \delta < 4,0$ devido ao hidrogênio ligado aos carbonos 3, 4, 5 e 6 da unidade glicopirranose; (c) $\delta = 3,18$ atribuído ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel glicopirranose e (d) $\delta = 1,99$ correspondente aos átomos de hidrogênio dos radicais metilo do grupo acetamido. A evidência para a ocorrência de N-metilação é vista na região $2,47 < \delta < 3,37$ no espectro de RMN ^1H de derivados sintetizados à temperatura ambiente, durante 6 horas (Figura 3) e a 70°C durante 15 minutos (Figura 4).

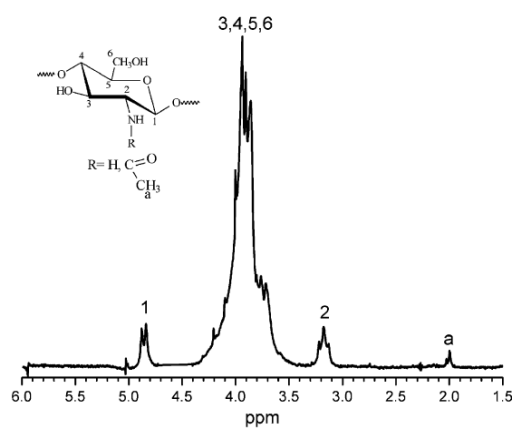


Figura 2. Espectro de RMN ^1H de quitosana dissolvida em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1 v/v) (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).

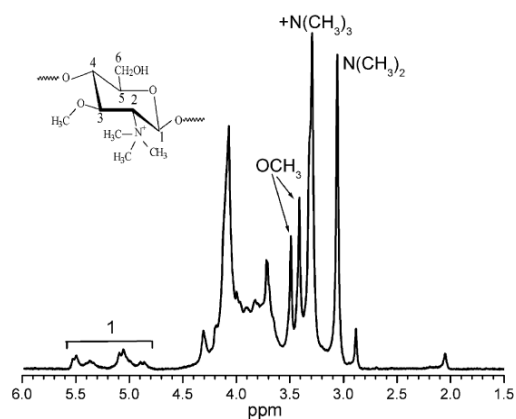


Figura 3. Espectro de RMN ^1H do derivado 1 dissolvido em D_2O (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).

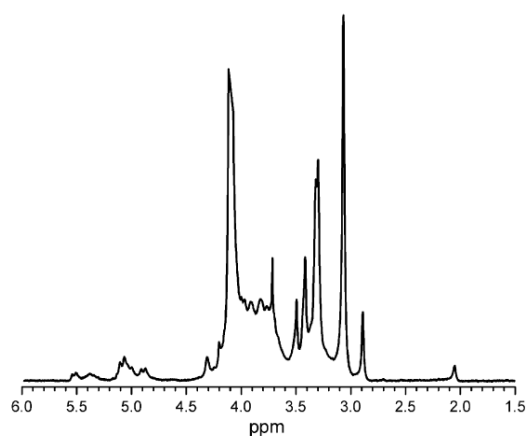


Figura 4. Espectro de RMN ^1H do derivado 2 dissolvido em D_2O (BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).

De acordo com Britto e Campana-Filho (2004), os derivados de quitosana caracterizados por esses espectros de RMN ^1H , foram produzidos a partir da exposição de quitosana a diferentes condições de reação, gerando compostos com grau de desacetilação (GD) diferenciados (Tabela 1).

Tabela 1. Grau médio de desacetilação (GD) a partir de quitosana e grau médio de quaternização (GQ) de amostras de TMQ determinadas por RMN ^1H (adaptado de BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004).

Amostra	GD (%)	GQ (%)
Quitosana	96	—
Derivado 1	—	52,5
Derivado 2	—	36,8

A partir de demais dados de RMN ^1H , Britto *et al.* (2005) determinaram o grau médio de desacetilação de uma quitosana purificada com GD = 78%. As evidências para a ocorrência de N-metilação são vistas na região $2,47 < \delta < 3,37$ (Figura 5B), sendo que o sinal centrado em 3,31 ppm corresponde aos locais quaternizados e o sinal centrado em 2,76 ppm é atribuído aos locais N,N-dimetilados. Este espectro mostra também dois sinais na região $3,37 < \delta < 3,56$, ambos correspondentes aos locais O-metilados. A partir deste espectro o grau médio de quaternização do derivado, neste caso a N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), foi determinado com GQ = 37%. A Figura 5 permite a comparação entre os espectros obtidos por uma quitosana comum (Figura 5A) e pela N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) (Figura 5B).

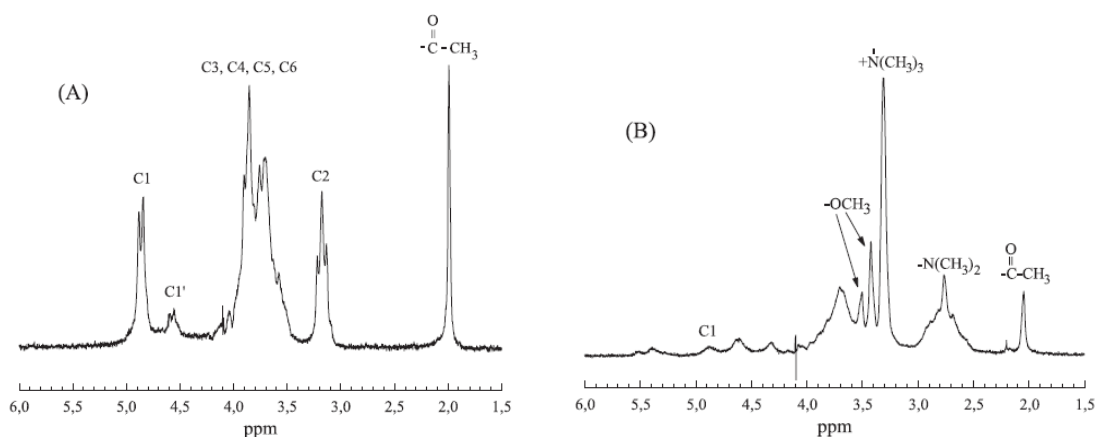


Figura 5. Espectro de RMN ^1H de quitosana [$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$] dissolvida em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100:1 v/v) (A) e da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) [$10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$] dissolvida em D_2O (B) (BRITTO *et al.*, 2005).

Outros estudos podem ser encontrados nos quais foram avaliados a influência de modificações das condições reacionais, tais como temperatura (MIMA *et al.*, 1983; CHEN *et al.*, 1994; CHEN e HWA, 1996), concentração da base (CHEN *et al.*, 1994; DUNG *et al.*, 1994) e número de etapas de reação (MIMA *et al.*, 1983; CHEN *et al.*, 1994; DUNG *et al.*, 1994) na obtenção de derivado hidrossolúvel com alto GD. Kubota e Eguchi (1997) demonstraram que amostras de quitosana com GD em torno de 50% já apresentam solubilidade em água, encontrando-se naturalmente carregadas em pH próximo a 7,0 (SCHULZ *et al.*, 1998).

Alguns autores (SCHULZ *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2003; GOMES, 2007) estabelecem uma relação direta entre a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica de quitosana e sua solubilidade, ou seja, quanto maior a quantidade destes grupos maior a repulsão eletrostáticas entre as cadeias e, conseqüentemente, maior a solvatação em água. Quimicamente, 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. Este processo pode ser conduzido pela quaternização dos átomos de nitrogênio presentes nos grupos amino, realizada através de um processo extensivo de metilação (BRITTO e ASSIS, 2007a).

A metilação extensiva da quitosana gera o derivado N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), que é caracterizado por possuir cargas positivas permanentes em cadeias, como consequência da quaternização dos grupos amino na posição C-2 da estrutura da quitosana (DUNG *et al.*, 1994; SIEVAL *et al.*, 1998; CURTI *et al.*, 2003; BRITTO e CAMPANA-FILHO, 2004). A aplicação da TMQ como agente antibacteriano tem sido relatada na literatura (JIA *et al.* 2001), com atividade superior a da quitosana em função da maior interação iônica entre cargas positivas do derivado e resíduos presentes na superfície das células bacterianas negativamente carregados. TMQs podem ser sintetizadas tanto por adição covalente de um substituinte contendo um grupo de amônio quaternário quanto por quaternização dos grupos amino do polímero principal (CURTI *et al.*, 2003). Este último método é o que tem recebido mais atenção com agentes de alquilação tais como o haleto de alquilo, alquilo normalmente empregado. Graus de quaternização (GQ) superiores a 53% foram alcançados pela reação da quitosana com iodometano (como agente de alquilação) na presença de N-metil-2-pirrolidona (NMP). Este processo (DUNG *et al.*, 1994) mostrou-se menos agressivo do que as reações de quaternização habituais, degradando menos o composto final e com uma redução da

intensidade de despolimerização do polímero principal. Apesar de ser eficiente, o iodometano é altamente volátil, cancerígeno, além de ser um reagente relativamente caro.

Numa tentativa de superar estas desvantagens, uma sequência alternativa para a síntese da quitosana quaternizada foi proposta através do uso de dimetilsulfato como agente alquilante. O dimetilsulfato é consideravelmente menos dispendioso que o iodometano e é menos tóxico. Além disso, tem um ponto de ebulição elevado e nenhum solvente é requerido para a reação, ou seja, não há necessidade de utilização do NMP. A partir dessa nova rota de síntese (Figura 6) obteve-se a N,N,N-trimetilquitosana (TMQ), um derivado de quitosana com GD de aproximadamente 52,5%, que, segundo avaliações apresenta alta solubilidade, elevada capacidade de formação de filmes e boa atividade antimicrobiana (BRITTO e ASSIS, 2007b).

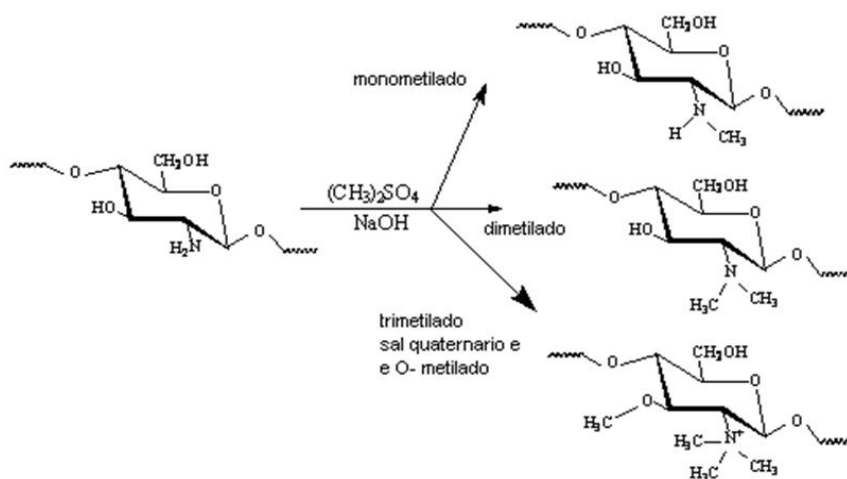


Figura 6. Representação esquemática da reação de quaternização dos grupos amino da quitosana gerando o derivado hidrossolúvel N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) (BRITTO e ASSIS, 2007a).

2.3 FILMES COMESTÍVEIS DE QUITOSANA

O uso de biopolímeros na formação de filmes e revestimentos comestíveis vem se tornando tópico de grande interesse devido ao potencial para minimizar a deterioração dos alimentos e pelas características de biodegradabilidade e atividade antimicrobiana (McHUGH *et al.*, 1996; ASSIS e PESSOA, 2004). Materiais como proteínas, polissacarídeos e lipídeos são os mais avaliados (McHUGH *et al.*, 1996), sendo, como já comentado, a quitosana um material promissor para a conservação de frutas e hortaliças (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004).

A quitosana e seus derivados são polímeros semi-cristalinos que apresentam cristalinidade variável de acordo com o grau de desacetilação. A cristalinidade é máxima para a quitina (polímero 0% desacetilado) e completamente ausente para a quitosana 100% desacetilada. A cristalinidade mínima é alcançada em graus intermediários de desacetilação (FRANCIS SUH e MATTHEW, 2000).

A formação do filme de quitosana ocorre por meio da evaporação do solvente e as características finais de espessura, de certo modo, estão relacionadas à quantidade de polímero no gel precursor, ou seja, a concentração da solução de quitosana (ASSIS e SILVA, 2003). Após a secagem, a deposição torna-se um revestimento resistente e flexível. Análises realizadas por Microscopia de Força Atômica (MFA), sobre filmes de quitosana, indicam uma superfície microscopicamente formada por uma série de aglomerados poliméricos. Tais características são mais evidentes em altas concentrações (Figura 7) (ASSIS E SILVA, 2003).

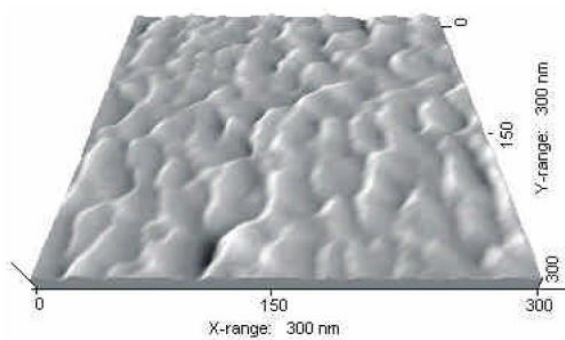


Figura 7. Topografia típica de filme de quitosana formado sobre uma superfície de fruta, adquirida por microscopia de força atômica. Quitosana em concentração de 20mg.mL^{-1} (ASSIS e PESSOA, 2004).

Assis e Pessoa (2004) testaram filmes de quitosana quanto a sua atividade antifúngica através de análise qualitativa a partir de um acompanhamento visual do crescimento espontâneo de fungos sobre a superfície de maçãs fatiadas. Os filmes foram formados por imersão de maçãs fatiadas (*Malus domestica*, cv. Gala) em diferentes soluções de quitosana. Frutos não revestidos mostraram maior proliferação de fungos, como pode ser visto quando comparados a aparência de um fruto revestido (quitosana a 20mg.mL^{-1}), após 8 dias de armazenamento em estufa (28°C e 80% de umidade relativa) (Figura 8).

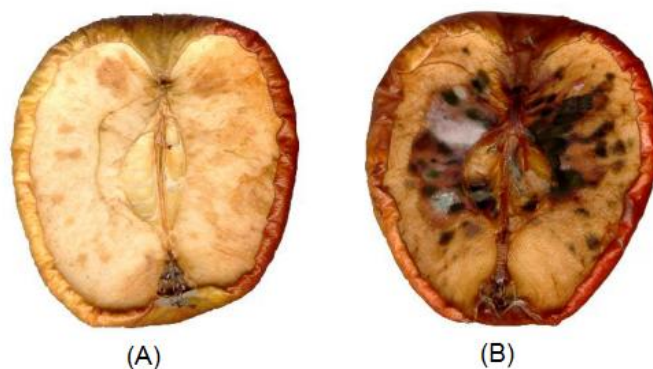


Figura 8. Aparência de faces de uma mesma maçã (A) revestida com quitosana e (B) não revestida, após 8 dias de armazenamento (ASSIS e PESSOA, 2004).

Ambas as amostras apresentaram desidratação e coloração marrom, mas com diferenças notáveis na proteção fúngica. Devlieghere *et al.* (2004) também investigaram a atividade antimicrobiana da quitosana, suas interações com os componentes alimentícios e sua aplicabilidade no recobrimento de frutas e hortaliças. Os resultados mostraram que houve o retardamento do crescimento microbiano, embora as coberturas tenham provocado um leve gosto amargo para as verduras.

Ojagh *et al.* (2010) avaliaram o efeito da adição de óleo essencial de canela (OEC) em filmes à base de quitosana e verificaram que esta promove um aumento da atividade antimicrobiana, enquanto diminuiu o teor de umidade e a solubilidade do polímero. Os autores afirmaram que há uma forte interação entre o polímero e o OEC, produzindo um efeito de reticulação, o que diminui o volume livre e a mobilidade entre as moléculas do polímero, elevando assim suas propriedades mecânicas. Este fenômeno produziu a estrutura de uma folha, como visto na Figura 9A. Um arranjo de camadas empilhadas de OEC sobre o filme de quitosana pode ser visualizada na Figura 9D (MATAN *et al.*, 2006).

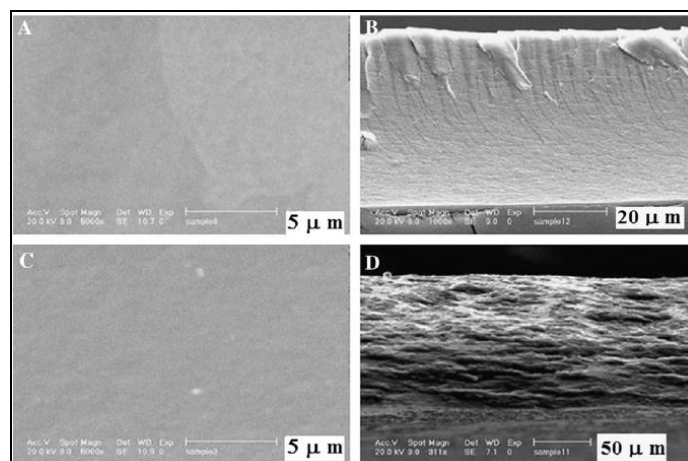


Figura 9. Digitalização de imagens de microscopia eletrônica de filme de quitosana controle (A) e (B), e filme contendo OEC a 15mg.mL^{-1} (C) e (D) nas superfícies e seções, respectivamente, segundo apresentadas por MATAN *et al.* (2006).

Vu *et al.* (2011) desenvolveram um revestimento comestível baseado na modificação da quitosana para aumentar a vida de prateleira de morangos com bons resultados na redução da infestação fúngica. De forma similar, Elsabee *et al.* (2013) usaram filmes de polipropileno (PP) modificados por multicamadas alternadas de quitosana e quitosana / pectina como um dispositivo de embalagem para o armazenamento de tomates. Eles observaram que as amostras embaladas em recipientes com quitosana mantiveram-se intactas, sem infecções ou apodrecimento aparente, após 13 dias de armazenamento sob refrigeração a 4°C , diminuindo a senescência dos frutos.

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA QUITOSANA

Por ser um biopolímero versátil, o potencial de aplicação da quitosana é diversificado. Algumas das principais áreas de emprego são: na agricultura (como mecanismos defensivos e adubo para plantas) (BERGER *et al.*, 2011), no tratamento de água (como floculante para clarificação, remoção de íons metálicos e redução de odores) (SPINELLI, 2001), na indústria de cosméticos (como esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar e creme dental) (KURITA, 1997) e na biofarmacêutica e biomédica (como imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante) (KOIDE, 1998) e em suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, liberação controlada de drogas e encapsulamento de materiais (RINAUDO e DOMARD, 1989). Sua principal aplicação, contudo, é na indústria alimentícia

(como fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida e claro, como coberturas para conservação de alimentos) (SHAHIDI *et al.*, 1999; FAI *et al.*, 2008; GOY *et al.*, 2009) (Tabela 2).

Tabela 2. Aplicações da quitina, quitosana e seus derivados na indústria de alimentos, baseado em Shahidi *et al.* (1999).

Área de aplicação	Atividade esperada
Agente antimicrobiano	Bactericida Fungicida Medida de molde de contaminação em commodities agrícolas
Indústria de filmes comestíveis	Transferência controlada de umidade entre alimentos e o ambiente Liberação controlada de substâncias antimicrobianas Liberação controlada de antioxidantes Liberação controlada de nutrientes, flavorizantes e drogas Redução da pressão parcial de oxigênio Taxa controlada da respiração Controle de temperatura Escurecimento enzimático controlado em frutas Membranas de osmose reversa
Aditivos	Clarificação e deacidificação de frutas e bebidas Extensor natural de sabor Agente de controle de textura Agente emulsificante Espessante e agente estabilizador Estabilização de cor
Qualidade nutricional	Presença de fibras Efeito hipocolesterolêmico Aditivo para alimento de bovinos e peixes Redução na absorção de lipídios Produção de proteína unicelular Agente contra gastrite Ingrediente para alimentos infantis
Recuperação de materiais sólidos de resíduos de processamento de alimentos	Afinidade em floculação Fracionamento de Agar
Purificação de água	Recuperação de íons metálicos, pesticidas e fenóis Remoção de corantes
Outras aplicações	Imobilização de enzimas Encapsulamento de nutracêuticos Cromatografia Reagentes analíticos

No Brasil, o uso de aditivos alimentares é norteado pelo Ministério da Saúde e regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que considera como aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, porém, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento, de acordo com as diretrizes preconizadas pela Portaria nº 540/97 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/BRASIL, 1997). De acordo com esta mesma Portaria, os aditivos alimentares são classificados quanto à função que exercem sobre os alimentos. Um desses aditivos são os agentes conservantes, substâncias que têm a finalidade de impossibilitar ou minimizar a deterioração microbiana ou enzimática dos alimentos. Compatível a tal definição está a quitosana, uma fibra natural solúvel em meio ácido, cuja característica permite que este polímero seja utilizado na indústria de alimentos, uma vez que as enzimas envolvidas nos processos de hidrólise deste polissacarídeo (lisozima, quitina desacetilase, quitinase e quitosanase) estão presentes nos organismos animais e vegetais (KOTZE *et al.*, 1998). Segundo Rabea *et al.* (2003), a quitosana tem demonstrado eficiência no controle do crescimento das principais bactérias e fungos encontrados em alimentos, tais como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, além de vírus como os da hepatite A e Norwalk e parasitas, como *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum*, que estão entre os principais microrganismos relacionados à infecção alimentar (BEUCHAT, 2002). Temos na Tabela 3 o resumo dos principais agentes biológicos comprovadamente patogênicos para o homem, capazes de contaminar os alimentos.

Tabela 3. Principais agentes biológicos que contaminam alimentos (adaptado de ACHESON, 1999).

Agentes Biológicos	
<p>Bactérias</p> <p><i>Produtoras de toxinas pré-formadas</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i></p> <p><i>Produtoras de toxinas na luz intestinal</i> <i>Vibrio spp</i> <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga <i>E. coli</i> enterotoxigênica</p> <p><i>Invasoras do epitélio intestinal</i> <i>Salmonella spp</i> <i>Campylobacter spp</i> <i>Yersinia spp</i> <i>Shigella spp</i> <i>E. coli</i> enteroinvasiva <i>Listeria monocytogenes</i></p> <p><i>Outras</i> <i>Aeromonas spp</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>E. coli</i> enteropatogênica</p>	<p>Vírus Vírus da hepatite A Vírus da hepatite B Rotavírus Adenovírus (entérico) Parvovírus</p> <hr/> <p>Protozoários <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Isospora belli</i> <i>Dientamoeba fragilis</i> <i>Blastocystis hominis</i></p> <hr/> <p>Parasitas <i>Taenia solium</i> <i>Taenia saginata</i> <i>Hymenolepis nana</i> <i>Ascaris</i> <i>Trichuris</i> <i>Trichinella spiralis</i></p> <hr/> <p>Toxinas Tetrodotoxina Micotoxinas Aflatoxinas</p>

Vários mecanismos de atividade antimicrobiana da quitosana têm sido sugeridos, entretanto, ainda não se conhece completamente a forma de ação desse polímero (RABEA *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2007; GOY *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Dentre os mecanismos propostos, o mais aceito se refere às interações entre cargas positivas da quitosana, presentes nos grupos protonados NH_3^+ , com moléculas aniônicas da superfície celular (GOMES, 2007). Estes grupos NH_3^+ possivelmente competem com Ca^{2+} pelos sítios eletronegativos da membrana (YOUNG, 1983). Raafat *et al.* (2008) investigaram este modelo através da exposição de células de *Staphylococcus simulans* a cargas positivas de quitosana, o que possibilitou a visualização microscópica de mudanças nas ultraestruturas da parede das células após a interação das cargas com a superfície celular (Figura 10).

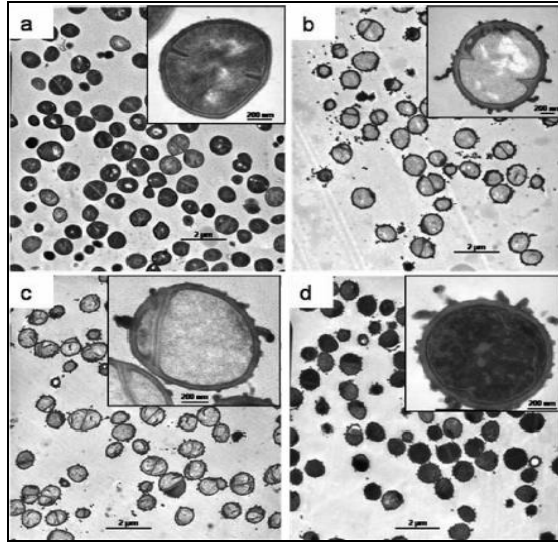


Figura 10. Fotomicrografia eletrônica de células de *S. simulans* (controle) (a), tratadas com quitosana [10 x CIM ($125\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)] por 5 min (b), 20 min (c) e 60 min (d) (RAAFAT *et al.*, 2008).

Esta interação entre moléculas de quitosana positivamente carregadas e as membranas negativamente carregadas sugerem consequências distintas às células microbianas. A primeira seria a hidrólise de peptidoglicanos na parede celular dos microrganismos, levando ao vazamento de eletrólitos, íons potássio e outros constituintes protéicos de baixo peso molecular citoplasmático (PAPINEAU *et al.*, 1991; SEO *et al.*, 1992; FANG *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1998; JUNG *et al.*, 1999). A outra promoveria mudanças nas propriedades de permeabilidade da membrana, causando desequilíbrio osmótico interno e consequente inibição do crescimento dos microrganismos (HADWIGER *et al.*, 1986; SHAHIDI *et al.*, 1999). Entretanto, há um modelo de ação antimicrobiano que sugere a ligação da quitosana ao DNA microbiano, o que acarretaria na inibição da produção de RNAm e consequente síntese protéica, a partir da penetração do biopolímero no núcleo celular (SUDARSHAN *et al.*, 1992; SEBTI *et al.*, 2005). Contudo, sabe-se que a quitosana também apresenta a função de agente quelante de íons metálicos, e dessa forma é sugerido ainda que a molécula interfira na produção de toxinas e no crescimento microbiano (AMORIM *et al.*, 2005).

Outros pesquisadores atribuem a atividade antimicrobiana da quitosana a seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e consequente inibição do crescimento (RAVI KUMAR, 2000; OLSEN e SCHWARTZMILLER, 2000). Estudos recentes, entretanto, revelam que o mecanismo da

atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero, concentração, tempo de exposição e às características da membrana do microrganismo (COSTA SILVA *et al.*, 2006). Zheng e Zhu (2003) demonstraram que a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias Gram-negativas, quanto menor a massa molecular da quitosana, maior a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das Gram-positivas, a hipótese é de que a quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que a quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos. Fang *et al.* (1994) demonstraram que a atividade antimicrobiana da quitosana é elevada com o aumento do grau de desacetilação. Vários estudos têm mostrado que essa atividade depende significativamente do seu peso molecular (PM) e do grau de desacetilação (GD). Ambos os parâmetros afetam a atividade antimicrobiana da quitosana, porém são independentes, embora tenha sido sugerido por Sekiguchi *et al.* (1994), que a influência do PM sobre a atividade antimicrobiana é maior que a influência do GD. Para citar exemplos recentes, estudos realizados em *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* (ZIVANOVIC *et al.*, 2004; JING *et al.*, 2007), provaram que para a quitosana de menor peso molecular, maior é o efeito observado na redução do crescimento e multiplicação de microrganismos.

Estudos com quitina e quitosana com diferentes GDs foram realizados sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*). Em todos os casos, a atividade antimicrobiana foi superior com o aumento do GD (TSAI *et al.*, 2002; ANDRES *et al.*, 2007). Como já foi mencionado, o GD é determinante na solubilidade do polímero, onde os grupos livres $-NH_2$ e $-OH$ são considerados como sítios reativos dominantes. Assim como o GD é superior, maiores serão os grupos amino livres presentes na quitosana e maior será o efeito antimicrobiano (ANDRES *et al.*, 2007). Demais estudos sobre a atividade antimicrobiana da quitosana (WANG, 1992; DARMADJI E IZUMIMOTO, 1994; OLIVEIRA, 2004; SILVA,

2005; SILVA *et al.*, 2010) evidenciam o fato de que, quitosanas com diferentes graus de desacetilação, podem apresentar diferentes Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), dados esses resumidamente apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de diferentes quitosanas contra bactérias, baseado em Silva *et al.* (2010).

Microrganismo	Reação de Gram	Meio de Cultura	Características da Quitosana	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	pH	Autor(es)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Caldo nutritivo	Quitosana Comercial G.D: 78%	25.000	5.5	Wang (1992)
<i>Escherichia coli</i>	-	Caldo nutritivo	Quitosana Comercial G.D: 78%	5.000	5.5	Wang (1992)
<i>Escherichia coli</i>	-	Extrato de peptona e glicose (YPG)	Quitosana Comercial G.D: 78%	1.000	6.0	Darmadji e Izumimoto (1994)
<i>Streptococcus mutans</i>	+	Mueller Hinton	Quitosana G.D: 24% e PM 400.000 g/mol	1.500	5.0	Oliveira (2004)
<i>Shigella sonnei</i>	-	McConkey	Quitosana G.D: 24% e PM 600.000 g/mol	300	5.0	Silva (2005)
<i>Shigella sonnei</i>	-	McConkey	Quitosana G.D: 17% e PM 10^7 g/mol	600	5.0	Silva (2005)
<i>Salmonela enterica</i>	-	McConkey	Quitosana G.D: 24% e PM 600.000 g/mol	300	5.0	Silva (2005)
<i>Salmonela enterica</i>	-	McConkey	Quitosana G.D: 17% e PM 10^7 g/mol	600	5.0	Silva (2005)
<i>Escherichia coli</i>	-	Sintético	N,N,N-trimetilquitosana G.Q: 52,5%	75	6.9	Silva <i>et al.</i> , (2010)

Esses dados indicam que a quitosana em determinados casos apresenta um largo espectro de ação, superando a de alguns agentes químicos (GOMES, 2007), conforme compilação apresentada por Rabea *et al.* (2003) e disposta na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias (adaptado de RABEA *et al.*, 2003).

Bactéria	Reação de Gram	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	100
<i>Bacillus cereus</i>	+	1000
<i>Corynebacterium michiganence</i>	+	10
<i>Erwinia sp.</i>	-	500
<i>Erwinia carotovora</i>	-	200
<i>Escherichia coli</i>	-	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	700
<i>Micrococcus luteus</i>	+	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	500

Derivados quaternários de quitosana como o N,N,N-trimetilquitosana, o N-propil-N,N-dimetilquitosana e o N-furfuril-N,N-dimetilquitosana apresentam elevada atividade antimicrobiana quando diluídos em meio ácido (JIA *et al.*, 2001), sendo igualmente estabelecido que a atividade antibacteriana desses sais, contra *E. coli*, é mais forte do que as medidas para a quitosana (JIA *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2010) identificaram a presença de atividade antibacteriana da N,N,N,-trimetilquitosana, com GQ de aproximadamente 52,5%, contra a mesma bactéria, *E. coli*. Tin *et al.* (2009) testaram a influência do ácido acético no crescimento de *P. aeruginosa* e verificaram que concentrações de íons acetato acima de 0,06% diminuiriam consideravelmente a presença do microrganismo em comparação à solução controle (TIN *et al.*, 2009). Por outro lado, pesquisadores têm identificado também a ação da quitosana contra fungos. GOY *et al.* (2009) sumarizaram as Concentrações Inibitórias Mínimas apresentadas na literatura para a ação antifúngica da quitosana, aqui reproduzidas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos, baseado no levantamento realizado por Goy *et al.* (2009).

Fungo	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000	(TSAI <i>et al.</i> , 2002)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	>2000	(TSAI <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fusarium oxysporum</i>	100	(LIU <i>et al.</i> , 2001)
<i>Botrytis cinerea</i>	10	(LIU <i>et al.</i> , 2001)
<i>Byssochlamys</i> spp.	1000 - 5000	(ROLLER e COVILL, 1999)
<i>Candida albicans</i>	500	(TSAI <i>et al.</i> , 2002)
	600	(BALICKA-RAMISZ <i>et al.</i> , 2005)
	>1250	(HONGPATTARAKERE <i>et al.</i> , 2008)
<i>Drechstera sorokiana</i>	10	(LIU <i>et al.</i> , 2001)
<i>Microsporium canis</i>	1100	(BALICKA-RAMISZ <i>et al.</i> , 2005)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2200	(BALICKA-RAMISZ <i>et al.</i> , 2005)

Os mecanismos de atividade antifúngica da quitosana em frutas e hortaliças, em alguns casos, são distintos dos discutidos para bactérias e estão relacionados com o estímulo da produção de enzimas quitinolíticas pelo tecido vegetal, tais como a quitinase, que degradam as paredes celulares de fungos e induzem a produção de agentes antimicrobianos, como a fitoalexina e o pisatin (COMA *et al.*, 2002). Entretanto, pesquisas demonstram que essas atividades antifúngicas são raramente afetadas pelo pH do meio (HIRANO *et al.*, 1989; COMA *et al.*, 2002). Alguns autores atribuem a atividade da quitosana como fungistática em vez de fungicida (ASSIS; RAAFAT *et al.*, 2008). Além disso, a quitosana tem sido relatada como eficaz na inibição da germinação de esporos, do alongamento do tubo germinativo e do crescimento micelial radial de fungos (EL GHAOUTH *et al.*, 1992; SASHAI e MANOCHA, 1993). A maioria dos estudos tem sido realizada com bolores e leveduras associados com a deterioração de alimentos e plantas. Na presença da quitosana vários processos biológicos são ativados no tecido vegetal, onde a produção de quitinases é induzida e agem sobre micoparasitas biotróficos e necrotróficos, fungos entomopatogênicos e micorrizas (SASHAI e MANOCHA, 1993). Outro mecanismo antifúngico da quitosana envolve a morfogênese da parede celular com moléculas de quitosana que interferem diretamente no crescimento dos fungos, neste caso, de modo semelhante aos efeitos observados em células bacterianas (EL GHAOUTH *et al.*, 1992). Observações microscópicas identificaram a difusão de oligômeros de quitosana dentro de hifas e a interferência na atividade de enzimas responsáveis pelo

crescimento dos fungos (EWEIS *et al.*, 2006). A intensidade da ação de degradação da quitosana sobre paredes celulares de fungos também é dependente da concentração e do grau de desacetilação do polímero (STÖSSEL e LEUBA, 1984). Assim como em bactérias, a atividade antifúngica da quitosana foi reportada como superior com o aumento do GD contra fungos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *F. oxysporum* e *C. albicans*) (TSAI *et al.*, 2002; ANDRES *et al.*, 2007). Segundo Rabea *et al.* (2003) o pH tem importância na atividade antifúngica, sendo otimizada quando aplicada em pH próximo a 6,0. Os dados de Concentrações Inibitórias Mínimas da quitosana contra algumas linhagens fúngicas estão apresentados na Tabela 7. Nesse sentido, a quitosana tem sido também indicada no controle de infestações fúngicas em pós-colheita de frutos minimamente processados (EL GHAOUTH *et al.*, 1997; JIANG e LI, 2001).

Tabela 7. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos (adaptado de RABEA *et al.*, 2003).

Fungo	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Drechstera sorokiana</i>	10
<i>Micronectriella nivalis</i>	10
<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Trichophyton equinum</i>	2500

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

2.5.1 BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS

As bactérias são classificadas como Gram-positivas e Gram-negativas devido ao método de coloração de Gram desenvolvido pelo microbiologista dinamarquês Hans Christian Joachin Gram (1853-1938). Este método de coloração baseia-se, principalmente, nas características da superfície celular bacteriana. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída por ácido teicóico, além do peptidoglicano, que corresponde a uma fração maior que a encontrada na parede das bactérias Gram-negativas. No entanto, a parede das bactérias Gram-negativas é mais complexa que a parede das Gram-positivas, pois possui uma membrana externa cobrindo uma camada fina de peptidoglicano. Esta membrana externa é constituída por fosfolipídeos,

proteínas e lipopolissacarídeos (LPSs) (MADINGAN *et al.*, 2004). A constituição da parede esta relacionada a certas características da bactéria como, por exemplo, sua sensibilidade à ação de antibióticos. A Tabela 8 apresenta algumas comparações entre as características das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Tabela 8. Características comparativas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (adaptado de TORTORA *et al.*, 2005).

Característica	Gram-positivo	Gram-negativo
Reação de Gram	Retém o corante violeta	Aceita o contracorante (safranina)
Camada de peptidoglicano	Espessa - múltiplas	Fina – camada única
Ácidos teicóicos	Presentes em muitas	Ausentes
Espaço periplasmático	Ausente	Presente
Membrana externa	Ausente	Presente
Conteúdo de LPS	Nenhum	Alto
Conteúdo de lipídeos e lipoproteínas	Baixo	Alto (devido a ME)
Toxinas produzidas	Exotoxinas	Endotoxinas
Resistência a ruptura física	Alta	Baixa
Ruptura de parede por lisozima	Alta	Baixa
Sensibilidade à penicilina e sulfonamidas	Alta	Baixa
Sensibilidade à estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina	Baixa	Alta

2.5.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e α -glucano e não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos esporos (reprodução sexuada) ou conídios (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfologicamente semelhantes a estas. Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos (MADINGAN *et al.*, 2004). Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada micélio, que constitui o sistema vegetativo responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos nutrientes. Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados hifas.

Com a formação dos esporos ou conídios é necessário que estes tenham acesso ao ar livre, para assegurar sua disseminação e realizar, então, uma diferenciação para hifas vegetativas, geralmente levantadas verticalmente sobre o plano do micélio, conhecido como esporóforo ou conidióforos, e sobre estes se originarem novos esporos ou conídios. As hifas, por sua vez, podem ser apocíticas (com septo) ou cenocíticas (sem septo). O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases: uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. Em ambos os casos, um grande número de estruturas é formado, dependendo da espécie. As estruturas assexuadas, como também as sexuadas, podem ser formadas isoladamente ou em grupos, neste caso, formando corpos de frutificação. Assim, conídios podem ser formados em conidióforos isolados ou agrupados, constituindo então os conidiomas. Os esporos podem ser formados em ascomas (onde são formados os ascos) ou basidiomas (onde são formados os basídios) (MURRAY *et al.*, 2006).

A classificação dos fungos é baseada principalmente nas características dos esporos sexuais e dos corpos de frutificação, na natureza de seus ciclos de vida e nas características morfológicas de seus micélios vegetativos ou de suas células. Entretanto, muitos fungos produzem esporos sexuais sob certas condições ambientais. Aqueles que possuem todos os estágios sexuais conhecidos são denominados “fungos perfeitos” e os que não possuem “fungos imperfeitos”. Os fungos imperfeitos são classificados arbitrariamente, num primeiro momento, e são colocados provisoriamente em uma classe especial denominada Deuteromycetes. Quando o seu ciclo sexual é descoberto posteriormente, são então reclassificados entre outras classes e recebem novos nomes. Há em torno de 25.000 fungos que são classificados como deuteromicetos, também conhecidos como "fungos imperfeitos". Assim são chamados porque não se observa o estágio sexuado em seu ciclo de vida (PRESCOTT *et al.*, 1996). A maioria dos deuteromicetos reproduz-se somente por esporos assexuais ou conídios. Neste aspecto, lembram os estágios assexuais de ascomicetos e basidiomicetos, que também produzem esporos assexuais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) e da Quitosana Comercial (QC) na forma de gel e de filmes sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e de fungos filamentosos de interesse alimentício.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a TMQ e a QC sobre o crescimento das bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Salmonella enterica*) e dos fungos filamentosos (*Aspergillus flavus* selvagem, *Aspergillus flavus* padrão e *Penicillium sp.*);
- Determinar os valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) para a TMQ e a QC sobre o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Comparar os valores de CIM entre a TMQ e a QC para cada microrganismo;
- Comparar os valores de CBM entre a TMQ e a QC para cada bactéria;
- Desenvolver filmes de TMQ e QC a partir da metodologia em literatura;
- Verificar a presença de halos de inibição a partir dos filmes de TMQ e QC para cada microrganismo;
- Verificar a presença de atividade antifúngica das soluções e filmes de TMQ e QC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) e da Quitosana Comercial (QC) foi avaliada pela determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) sobre o crescimento de nove linhagens microbianas e de testes *in vivo* sobre o crescimento de três linhagens de fungos filamentosos. A determinação das CIMs foi realizada a partir de testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos padronizados pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), segundo suas normas M7-A6 (NCCLS, 2003) para as bactérias e M38-A (NCCLS, 2002) para os fungos filamentosos, ambas reconhecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) também foram determinadas para as bactérias em estudo. Além disso, a avaliação da atividade antifúngica das substâncias foi realizada mediante leitura visual e quantificada a partir do percentual de amostras infectadas com cada linhagem fúngica sobre fatias de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* variedade *cerasiforme*) revestidas e não revestidas, incubadas durante sete dias a 35°C.

4.1 LINHAGENS MICROBIANAS

Foram utilizadas para os testes de sensibilidade à TMQ e à QC nove linhagens microbianas. Dentre estas, seis linhagens eram bacterianas, sendo três Gram-positivas (*E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*) e três Gram-negativas (*E. coli*, *P. vulgaris* e *S. enterica*), além de três linhagens de fungos filamentosos (*A. flavus* selvagem, *A. flavus* padrão e *Penicillium sp.*). Essas linhagens microbianas apresentadas nas Tabelas 9 e 10 foram obtidas de diferentes instituições. As cepas bacterianas são todas padrões e identificadas pelos seus respectivos números de ATCC. No entanto, apenas uma linhagem de fungo é padrão e com numeração ATCC, sendo as outras duas selvagens, isoladas a partir de alimentos contaminados. *L. monocytogenes* e *S. enterica* foram adquiridas da fundação André Tosello (www.fat.org.br), fornecidas na forma liofilizada e reativadas para os experimentos. *E. faecalis* e *Penicillium sp.* foram cedidos pelo grupo de pesquisa em “Revestimentos Comestíveis” da Embrapa – Instrumentação de São Carlos, SP. *P. vulgaris* foi doada pela Profa. Dra. Mirna Helena Regali Selegim, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). *S. aureus*, *E. coli*, *A. flavus* selvagem e o *A. flavus* padrão foram cedidos pela Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da

Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), instituição colaboradora do presente projeto de pesquisa e local de realização dos experimentos.

Tabela 9. Linhagens bacterianas utilizadas nos experimentos.

Bactéria	Reação de Gram	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	29212
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	7644
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	6538
<i>Escherichia coli</i>	-	25922
<i>Proteus vulgaris</i>	-	6380
<i>Salmonella enterica</i>	-	13076

*ATCC – “American Type Culture Collection”

Tabela 10. Linhagens fúngicas utilizadas nos experimentos.

Fungo	ATCC / Origem
<i>Aspergillus flavus</i>	14108
<i>Aspergillus flavus</i>	Selvagem (Isolado de Amendoim)
<i>Penicillium sp.</i>	Selvagem (Isolado de Maçã)

*ATCC – “American Type Culture Collection”

4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para o crescimento microbiano foram o *Brain Heart Infusion* (BHI), para o crescimento dos fungos e da *L. monocytogenes*, e o *Mueller Hinton* (MH), para o crescimento das demais linhagens bacterianas. O meio utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre as bactérias também foi o MH, de acordo com a norma M7-A6 da “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (NCCLS, 2003), enquanto que para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre os fungos foi o meio desenvolvido pelo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI – 1640), de acordo com a norma M38-A da “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI)

(NCCLS, 2002). A composição dos respectivos meios é: **BHI** (Infusão de Cérebro de Bezerra: 200 mg.mL⁻¹, Infusão de Carne e Coração: 250 mg.mL⁻¹, Peptona Proteose: 10 mg.mL⁻¹, Dextrose: 2 mg.mL⁻¹, Cloreto de Sódio: 5 mg.mL⁻¹, Fosfato Dissódico: 2,5 mg.mL⁻¹, Agar: 15 mg.mL⁻¹ e pH de 7,4 ± 0,2 a 25°C); **MH** (Infusão de Carne: 300 mg.mL⁻¹, Caseína Hidrolisada: 17,5 mg.mL⁻¹, Amido: 1,5 mg.mL⁻¹, Agar: 17 mg.mL⁻¹ e pH de 7,0 ± 0,2 a 25°C); **RPMI-1640** (Sais Inorgânicos: Nitrato de Cálcio Tetraidratado 0,1 mg.mL⁻¹, Sulfato de Magnésio Anidro: 0,048 mg.mL⁻¹, Cloreto de Potássio: 0,4 mg.mL⁻¹, Cloreto de Sódio: 6 mg.mL⁻¹, Fosfato de Sódio Dibásico Anidro: 0,8 mg.mL⁻¹; Aminoácidos: L-Arginina (base livre): 0,2 mg.mL⁻¹, L-Asparagina: 0,05 mg.mL⁻¹, Ácido L-Aspártico: 0,02 mg.mL⁻¹, Diidrocloreto L-Cistina: 0,065 mg.mL⁻¹, Ácido L-Glutâmico: 0,02 mg.mL⁻¹, L-Glutamina: 0,3 mg.mL⁻¹, Glicina: 0,01 mg.mL⁻¹, L-Histidina (base livre): 0,015 mg.mL⁻¹, L-Hidroxiprolina: 0,02 mg.mL⁻¹, L-Isoleucina: 0,05 mg.mL⁻¹, L-Leucina: 0,05 mg.mL⁻¹, Hidrocloreto de L-Lisina: 0,04 mg.mL⁻¹, L-Metionina: 0,015 mg.mL⁻¹, L-Fenilalanina: 0,015 mg.mL⁻¹, L-Prolina: 0,02 mg.mL⁻¹, L-Serina: 0,03 mg.mL⁻¹, L-Treonina: 0,02 mg.mL⁻¹, L-Triptofano: 0,005 mg.mL⁻¹, L-Tirosina: 0,02 mg.mL⁻¹, L-Valina: 0,02 mg.mL⁻¹; Vitaminas: D-Biotina: 0,0002 mg.mL⁻¹, D-Ca-Pantotenato: 0,00025 mg.mL⁻¹, Cloreto de Colina: 0,003 mg.mL⁻¹, Ácido Fólico: 0,001 mg.mL⁻¹, i-Inositol: 0,035 mg.mL⁻¹, Niacinamida: 0,001 mg.mL⁻¹, Ácido p-Amino Benzoico: 0,001 mg.mL⁻¹, Hidrocloreto de Piridoxina: 0,001 mg.mL⁻¹, Riboflavina: 0,0002 mg.mL⁻¹, Hidrocloreto de Tiamina: 0,001 mg.mL⁻¹, Vitamina B12: 0,000005 mg.mL⁻¹; Outros: D-Glicose: 2 mg.mL⁻¹, Glutathione Reduzida: 0,001 mg.mL⁻¹, Tampão HEPES: 5,958 mg.mL⁻¹, Vermelho Fenol: 0,005 mg.mL⁻¹, Bicarbonato de Sódio: 2 mg.mL⁻¹ e pH de 7,0 ± 0,3 a 25°C). Vale ressaltar que para a preparação dos caldos não foi adicionado agar e os meios foram previamente autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA TMQ E DA QC

A N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) é um derivado de quitosana processado pelo grupo de pesquisa de “Revestimento Comestíveis” da Embrapa – Instrumentação em São Carlos, SP., e apresenta como principal característica o grau de quaternização (GQ) de aproximadamente 52,5%. Este é um derivado hidrossolúvel de quitosana trimetilada (trimetilação realizada a partir de dimetilsulfato), segundo características apresentadas por Britto e Assis (2007a) e Britto e Assis (2007b). Cabe salientar que a N,N,N-trimetilquitosana não é um produto

disponível comercialmente e que seu desenvolvimento, assim como a caracterização de suas propriedades, são atividades de pesquisa atuais e com poucas referências na literatura.

A Quitosana Comercial (QC) foi adquirida de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) e apresenta, como principais características, aspecto granular ligeiramente amarelado, médio peso molecular ($400.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e grau de desacetilação (GD) de aproximadamente 78%, segundo dados apresentados pelo fabricante.

4.4 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS PARA DETERMINAÇÃO DA CIM

Solução bacteriana: As culturas bacterianas mantidas em estoque à -80°C foram repicadas em placas de Petri e incubadas durante 24 horas a 37°C . Após a incubação, uma alça-padrão foi utilizada para retirar parte da massa bacteriana das placas e colocá-las em um tubo de centrifugação de 50mL de capacidade contendo 10mL de solução salina 0,9%. A suspensão foi agitada em vórtex até sua completa homogeneização. Em seguida, foram pipetados 3mL da suspensão e colocados em uma cubeta para determinação da concentração por absorvância em espectrofotômetro (modelo Spectrum série SP-2000UV). A concentração da suspensão foi ajustada entre 0.100 e 0.125 de absorvância com comprimento de onda em 550nm, comparada à solução salina 0,9% (controle). Por fim, 1mL da suspensão final obtida foi diluída em 49mL (diluição 1:50 v/v) de caldo MH, o que corresponde a uma quantidade aproximada de 1 a 2×10^8 UFC.mL⁻¹, de acordo com o inóculo padrão descrito na norma M7-A6 pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (NCCLS, 2003).

Solução de conídios: As linhagens dos fungos mantidas em estoque às condições ambiente foram repicadas em placas de Petri e incubadas durante 7 dias a 35°C . Após esse período uma nova repicagem em meio BHI sólido foi realizada para garantir a reativação e o crescimento das culturas. Após o crescimento, as placas foram raspadas com uma espátula e a massa micelial colocada em um tubo de centrífuga de 50mL de capacidade contendo 10mL de solução salina 0,9%. A solução foi homogeneizada em vórtex e o conteúdo filtrado em lã de vidro para que apenas os conídios ficassem em suspensão. A concentração da suspensão foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer e seu valor ajustado para uma concentração de 10^4 conídeos.mL⁻¹. Para a determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas a solução de conídios foi padronizada com auxílio de espectrofotômetro (Spectrum série SP-2000UV), com concentração definida entre 0.125 e 0.155 de absorvância com comprimento de onda em 530nm. Neste caso, 1mL da suspensão final obtida foi diluída em

49mL (diluição 1:50 v/v) de meio RPMI-1640, o que corresponde a uma quantidade aproximada de $0,4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, de acordo com o inóculo padrão descrito na norma M38-A pela “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) (NCCLS, 2002).

4.5 CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE PARA SOLUBILIZAÇÃO DA QC

O gel de Quitosana Comercial foi preparado pela dissolução em ácido acético 1%. Testes para verificar a influência deste solvente sobre o crescimento dos microrganismos em estudo também foram conduzidos. Os ensaios consistiram na preparação de soluções com diferentes concentrações de ácido acético e inoculação dos microrganismos. Três diferentes soluções de ácido acético foram testadas: 1%, 0,5% e 0,1%. As diferentes concentrações de ácido acético foram distribuídas em microplacas contendo 96 poços para inoculação. As microplacas inoculadas com bactérias foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas e as inoculadas com fungos foram incubadas a 35°C durante 7 dias. Todas as três concentrações do solvente foram testadas anteriormente à determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs). Os resultados foram obtidos pela leitura visual das microplacas e análise da variação de turbidêz das soluções presentes em cada poço. O aumento de turbidêz nos poços comparados à turbidêz padrão indicou a presença de crescimento microbiano. A concentração do solvente utilizada para solubilização da QC foi de 0,1%, já que esta concentração, após as inoculações, não interferiu no crescimento dos microrganismos testados.

4.6 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE TMQ E QC

Para determinação da CIM sobre as bactérias: A TMQ e a QC foram pesadas e 20mg de cada substância colocadas em tubos de centrifugação de 15mL de capacidade para solubilização. A TMQ foi dissolvida em 4mL de água destilada e 6 mL de caldo MH. O pH do meio MH com água destilada (4 mL de água destilada + 6 mL de caldo MH) utilizado para a solubilização da TMQ foi de 7,3 a 25°C. Para a solubilização da QC, foram adicionados ao tubo 1mL de solução de ácido acético 1% e 9 mL de caldo MH, para que o solvente apresentasse uma concentração de 0,1%. O pH do meio MH com ácido acético 0,1% (1mL de ácido acético 1% + 9mL de caldo MH) utilizado na solubilização da QC foi de 4,8 a 25°C. Ambas as soluções foram agitadas em vórtex e, após completa homogeneização, a concentração final da TMQ e da QC em cada tubo foi de 2,0 mg.mL⁻¹. As soluções foram

preparadas para que a concentração máxima de cada substância após inoculação fosse de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, valor limite de concentração para que a atividade inibitória fosse considerada relevante.

Para determinação da CIM sobre os fungos: A TMQ e a QC foram pesadas e 40mg de cada substância colocadas em tubos de centrifugação de 15mL de capacidade para solubilização. A TMQ foi dissolvida em 4mL de água destilada e 6 mL de meio RPMI-1640. O pH do meio RPMI-1640 com água destilada (4 mL de água destilada + 6 mL de meio RPMI-1640) utilizado na solubilização da TMQ foi de 7,16 a 25°C . Para a solubilização da QC, foram adicionados ao tubo 1mL de solução de ácido acético 1% e 9 mL de meio RPMI-1640, para que o solvente apresentasse uma concentração de 0,1%. O pH do meio RPMI-1640 com ácido acético 0,1% (1mL de ácido acético 1% + 9mL de meio RPMI-1640) utilizado na solubilização da QC foi de 4,92 a 25°C . Ambas as soluções foram agitadas em vórtex e, após completa homogeneização, a concentração final da TMQ e da QC em cada tubo foi de $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. As soluções foram preparadas para que a concentração máxima de cada substância após inoculação fosse de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, valor limite de concentração para que a atividade inibitória fosse considerada relevante.

4.7 PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA DETERMINAÇÃO DA CIM

Placas estéreis de polipropileno, contendo 96 poços com fundo em U distribuídos em 12 colunas e 8 linhas, foram organizadas da seguinte forma (Figura 11): a primeira coluna (poços 1A a 1H) foi separada para o teste de esterilidade, que verifica a presença de contaminação durante a manipulação da placa; a segunda coluna (poços 2A a 2H) foi utilizada como controle de crescimento microbiano e verificação da qualidade do inóculo; as demais colunas foram utilizadas para a microdiluição em série, partindo da concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ até $1,95 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias e de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ até $3,9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os fungos.

Para determinação da CIM sobre as bactérias: As placas foram preparadas adicionando-se 100 μL de caldo MH a cada poço, exceto nos poços da terceira coluna (poços 3A a 3H). Os três primeiros poços da terceira coluna (poços 3A, 3B e 3C) foram preenchidos com 200 μL da solução de Quitosana Comercial (QC). Os dois poços subsequentes da terceira coluna (poços 3D e 3E) foram preenchidos com 200 μL da solução solvente utilizada na solubilização da QC (ácido acético 0,1%). Os últimos três poços da terceira coluna (poços 3F, 3G e 3H) foram preenchidos com 200 μL da solução de N,N,N-trimetilquitosana (TMQ). Após o completo

preenchimento dos poços, iniciou-se a microdiluição em série, partindo-se da terceira em direção à décima segunda coluna. Para a realização da microdiluição, 100µL foram retirados de cada poço da terceira coluna (poços 3A a 3H), com auxílio de pipeta multicanal, e introduzidos na coluna seguinte (poços 4A a 4H). Tal procedimento foi realizado consecutivamente até a décima segunda coluna. Os 100µL restantes da décima segunda coluna (poços 12A a 12H) foram colocados nos poços da primeira coluna (poços 1A a 1H), para avaliar a presença de contaminação durante a microdiluição (teste de esterilidade). Em seguida, 100µL do inóculo foram adicionados aos poços da placa, exceto nos poços da primeira coluna (teste de esterilidade). Após a adição do inóculo, cada poço continha 200µL de solução. Por fim, as placas foram incubadas em estufa durante 24 horas a 37°C, para posterior leitura dos resultados.

Para determinação da CIM sobre os fungos: o procedimento realizado para o preparo das placas e determinação da CIM sobre os fungos foi o mesmo utilizado para as bactérias. Porém, no caso dos fungos, o caldo MH foi substituído pelo meio RPMI-1640 e as placas foram incubadas durante 7 dias a 35°C para a leitura dos resultados.

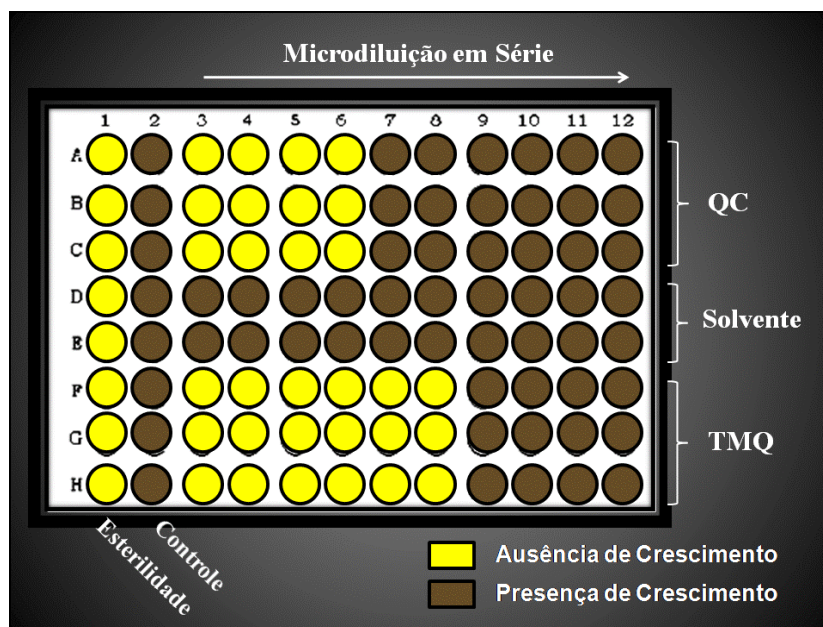


Figura 11. Representação esquemática da placa de 96 poços após incubação para *E. faecalis* e *S. aureus*.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A leitura dos resultados foi realizada pela identificação visual dos poços com crescimento microbiano (presença de turbidêz nos poços), sendo a CIM, a menor concentração a não apresentar crescimento (ausência de turbidêz nos poços). Nos casos em que não foi possível visualizar o crescimento microbiano, o corante 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) foi adicionado aos poços para facilitar a realização da leitura visual. A quantidade do corante adicionado a cada poço foi de 40µL com concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ e as placas foram incubadas durante 2 horas a 37°C.

4.9 DETERMINAÇÃO DA 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, 2 x CIM e 4 x CIM, plaqueados em meio MH sólido 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 representava 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 inoculada que, após plaqueamento, não apresente crescimento bacteriano.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS FILMES DE TMQ E QC

A determinação da atividade antifúngica dos filmes de revestimento a base de N,N,N-trimetilquitosana e de Quitosana Comercial foi realizada pela imersão de fatias de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) em soluções de TMQ e QC com concentração de 2mg.mL⁻¹, com metodologia semelhante a proposta por Assis e Pessoa (2004). Os controles foram preparados a partir da imersão de fatias do tomate-cereja em água destilada e ácido acético 1%. As soluções filmogênicas foram preparadas dissolvendo-se 80mg de TMQ em 40mL de água destilada e 80mg de QC em 40mL de ácido acético 1%. As soluções foram agitadas em vórtex até completa homogeneização. Inicialmente, os tomates-cereja foram higienizados em solução de hipoclorito de sódio (200ppm de cloro ativo) e secos em condições

ambiente. Os frutos foram fatiados sob condições assépticas e imersos nas soluções de revestimento de TMQ e QC por aproximadamente 10 segundos. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O excesso da solução foi escorrida e cada fatia colocada em placas de Petri (90 x 15mm) (Figura 12). Em seguida, as fatias foram deixadas secar por 24 horas em condições ambiente. A formação do filme de revestimento ocorreu pela evaporação do solvente. Após a formação do filme, 100 μ L de inóculo (10^4 conídios.mL⁻¹) de cada linhagem fúngica foi adicionado às fatias revestidas e não revestidas (controles). As placas foram cobertas com filme de PVC para evitar o ressecamento das amostras e incubadas em estufa durante 7 dias a 35°C (Figura 13). Todos os testes foram realizados em triplicata e o crescimento fúngico monitorado diariamente. Um total de 45 (15 x triplicata) amostras foi avaliado para cada condição.

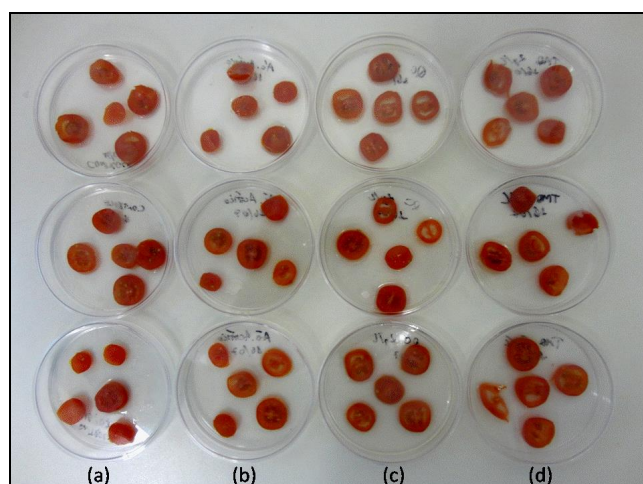


Figura 12. Preparação das placas: (a) controle com fatias de tomate-cereja imersas em H₂O destilada, (b) em solução de ácido acético 1%, (c) em solução de TMQ (2,0 mg.mL⁻¹) e (d) em solução de QC (2,0 mg.mL⁻¹).



Figura 13. Incubação em estufa a 35°C das placas com fatias de tomate-cereja inoculadas.

4.11 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE TMQ E QC

Os filmes foram preparados a partir de soluções da N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) e da Quitosana Comercial (QC) pelo método de *casting*, de acordo com metodologia adotada por Assis e Pessoa (2004). A concentração das soluções filmogênicas de TMQ e QC foi de 2,0 mg.mL⁻¹, segundo resultados prévios obtidos por Goy *et al.* (2012). As soluções foram preparadas dissolvendo-se 80mg da TMQ em 40mL de água destilada e 80mg da QC em 40mL de ácido acético 1%. O pH da solução de TMQ em concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 6,4 a 25°C. O pH da solução de QC em concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foi de 3,1 a 25°C. As soluções foram divididas em volumes de 20mL, colocadas em placas de Petri (60 x 15mm) e expostas para secagem durante aproximadamente 48 horas em estufa a 37°C. Os filmes foram formados após a evaporação completa do solvente e removidos das placas com o auxílio de uma espátula.

4.12 VERIFICAÇÃO DE HALO DE INIBIÇÃO DAS SOLUÇÕES E FILMES DE TMQ E QC

Os filmes de TMQ e QC foram utilizados para verificação da presença de halos de inibição por difusão em ágar, segundo metodologia sugerida na literatura (SALLET *et al.*, 2007; TRIPATHI *et al.*, 2008; GOY *et al.*, 2012; LECETA *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TMQ E DA QC

Nossos resultados confirmam que tanto a N,N,N,-trimetilquitosana quanto a Quitosana Comercial são polímeros que apresentam atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados indicaram que ambos os polímeros inibiram o crescimento de todas as cepas analisadas. De acordo com a Tabela 11, a QC apresentou concentrações inibitórias e bactericidas mínimas inferiores a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ para todas as cepas, enquanto que a TMQ apresentou valor de CIM superior a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *P. vulgaris* e de CBM superior a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ para *E. faecalis*. Os resultados de CIM para a TMQ partiram de $63 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ até valores superiores a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Já os resultados de CIM para a QC variaram entre 125 e $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, apesar de a TMQ ter apresentado CIMs superiores a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, a comparação dos dados de CIM entre a TMQ e a QC mostrou uma maior atividade antibacteriana da TMQ para a maioria das cepas analisadas. Verificou-se que a TMQ apresentou CIMs menores em relação à QC para quatro das seis cepas analisadas, sendo duas Gram-positivas (*E. faecalis* e *S. aureus*) e duas Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*). Por outro lado, a QC apresentou CIMs menores em relação à TMQ contra uma cepa Gram-positiva (*L. monocytogenes*) e uma cepa Gram-negativa (*P. vulgaris*).

A comparação dos valores de CIM obtidos neste estudo com aqueles contidos na literatura demonstram que tanto a TMQ quanto a QC apresentam um amplo espectro de ação antibacteriana. No entanto, foi possível encontrar na literatura dados de CIM inferiores aos obtidos no presente estudo para ambos os polímeros (RABEA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2010). No caso da TMQ, Silva *et al.* (2010) verificaram que a CIM do polímero contra a cepa *E. coli* foi de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a QC, de acordo com o trabalho conduzido por Rabea *et al.* (2003), a menor concentração inibitória identificada foi de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contra *E. coli* e *S. aureus*. No presente estudo, a menor concentração inibitória observada foi a de $63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para TMQ contra *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. enterica*. Outros estudos determinaram CIMs entre 300 e $25.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a Quitosana Comercial, o que mostra uma notável variação de potencial antibacteriano entre os diferentes tipos de quitosana. Nesse sentido, a TMQ e a QC têm se destacado por apresentarem CIMs abaixo de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a maioria das cepas testadas. Entretanto, deve-se ressaltar que a utilização de diferentes metodologias para a determinação da

CIM pode apresentar dados diferenciados de um composto sobre uma mesma cepa bacteriana. Isso também pode ocorrer com a utilização de diferentes tipos de quitosanas, pois sabe-se que linhagens bacterianas podem apresentar diferentes graus de sensibilidade a cada agente antimicrobiano. Nota-se, portanto, que a comparação da CIM entre diferentes estudos é dificultada se houver diferença na metodologia, na substância utilizada ou na cepa analisada em cada estudo. Dessa forma, além de fornecer a origem de cada cepa, o presente estudo utilizou uma metodologia padronizada pela “CLSI” (NCCLS, 2003) e reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o intuito de permitir a comparação destes dados com os obtidos por outros autores.

Tabela 11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.

Microrganismo	TMQ	QC
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	63	250
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	63	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	250	500
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380	>1000	500
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 13076	63	500

A comparação dos valores de CIM entre a TMQ e a QC é representada na Figura 14. A seta no gráfico indica que a CIM da TMQ para a cepa *P. vulgaris* apresentou valor acima de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Esta cepa foi considerada a mais resistente aos dois compostos analisados. A resistência de *P. vulgaris* à TMQ pode ser explicada através dos estudos realizados por Stumpf e Greem (1944), que relataram a capacidade desta cepa em oxidar compostos nitrogenados. Eles verificaram que esta cepa produz uma enzima (L-amino oxidase) que catalisa a oxidação de alguns aminoácidos. Nesse sentido, tal enzima poderia estar relacionada à degradação dos grupos amino da quitosana conferindo à cepa menor sensibilidade ao polímero. Outra hipótese para tal resistência seria a complexidade da parede celular das bactérias Gram-negativas e sua seletividade por determinados compostos, o que permite à este microrganismo, por exemplo, maior resistência ao antibiótico penicilina (MADINGAN *et al.*, 2004). Portanto, existem

algumas propostas para explicar a baixa atividade antibacteriana da TMQ sobre *P. vulgaris*, porém ainda não se sabe qual é o mecanismo exato de resistência desta cepa ao polímero. Por outro lado, *E. faecalis* e *S. aureus* foram consideradas as cepas mais sensíveis à TMQ, enquanto que para a QC a cepa mais sensível foi a *L. monocytogenes*. Notou-se que sobre *E. faecalis* e *S. aureus* a TMQ apresentou CIM de $63\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo este mesmo valor obtido para a QC sobre *L. monocytogenes*.

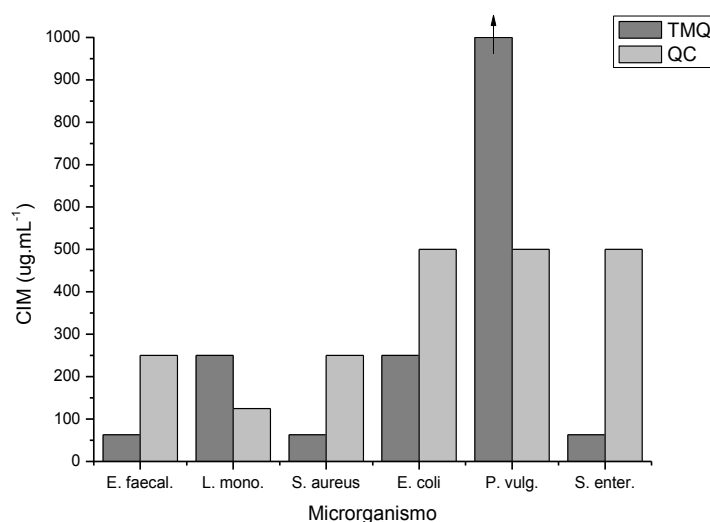


Figura 14. Comparação entre os valores de CIM da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.

Previamente à determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas observou-se que a solução de ácido acético 1% (solvente utilizado para a solubilização da QC) inibiu o crescimento das cepas bacterianas analisadas. Dessa forma, a solubilização da QC foi realizada utilizando-se solução de ácido acético a 0,1% para que, após a inoculação, a concentração do solvente fosse de 0,05%. Apesar da solubilização da Quitosana Comercial em ácido acético 1% ter sido frequentemente citada na literatura por Gomes (2007), tornou-se necessária a utilização de concentrações mais baixas do solvente para que não houvesse influência sobre o crescimento bacteriano. Neste caso, para facilitar a solubilização da QC, o pH da solução teve que ser ajustado para valores próximos a 4,0, de acordo com relatos prévios na literatura (CHATELET *et al.*, 2001; RABEA *et al.*, 2003). Os testes realizados com o solvente demonstraram que concentrações de ácido acético superiores a 0,05% inibiram o crescimento das bactérias. Estes resultados estão em concordância com os dados publicados por Tin *et al.*

(2009), os quais registram que concentrações de íons acetato acima de 0,06% diminuíram consideravelmente a turbidez do meio com *P. aeruginosa*, em comparação à solução controle. Além disso, foram realizados testes para verificar se a solução de ácido acético 1% potencializava a atividade antibacteriana da TMQ e da QC. *P. vulgaris* e *S. enterica* foram utilizadas para tais testes e os resultados não demonstraram o aumento da atividade antibacteriana dos polímeros quando solubilizados em ácido acético 1%. Portanto, o solvente nesta concentração não potencializou a atividade antibacteriana dos agentes antimicrobianos testados. No entanto, Jia *et al.* (2001) relataram que a atividade antibacteriana do sal quaternário de quitosana, em meio com ácido acético, é mais forte do que em água. Os autores descobriram que a atividade antibacteriana do sal aumenta à medida que a concentração de ácido acético fica maior, o que não foi visualizado no presente estudo. A explicação para esta incompatibilidade de resultados pode estar relacionada à diferença no grau de desacetilação entre os polímeros analisados e a consequente distinção entre seus potenciais antimicrobianos. Porém, ambos os estudos identificaram uma maior atividade antibacteriana do sal quaternário comparados à Quitosana Comercial contra *E. coli*.

Os resultados de CBM obtidos neste estudo mostraram um equilíbrio entre as atividades bactericidas da TMQ e da QC. Neste caso, cada substância apresentou maior atividade para três das seis cepas analisadas. A Tabela 12 apresenta os valores de CBM da TMQ e da QC para cada cepa testada. Verificou-se que a TMQ apresentou maior atividade bactericida contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. enterica*. No entanto, a QC mostrou-se mais eficaz contra *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *P. vulgaris*. Dessa forma, a TMQ apresentou maior atividade bactericida contra cepas Gram-negativas (*E. coli* e *S. enterica*), enquanto que a QC apresentou maior atividade bactericida contra cepas Gram-positivas (*E. faecalis* e *L. monocytogenes*).

Tabela 12. Determinação da Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.

Microrganismo	TMQ	QC
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1000	1000
<i>Listeria monocytogenes</i>	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	63	250
<i>Escherichia coli</i>	250	500
<i>Proteus vulgaris</i>	>1000	500
<i>Salmonella enterica</i>	125	500

Os resultados de CBM obtidos estão em concordância com a maior parte dos estudos realizados sobre a ação antibacteriana da Quitosana Comercial, os quais apontam para uma maior atividade deste material contra as cepas Gram-positivas (SUDARSHAN *et al.*, 1992; ZHONG *et al.*, 2008). Tal susceptibilidade pode ser atribuída às características da membrana das bactérias. Como apresentado na revisão, microrganismos Gram-positivos possuem parede celular externa composta de polissacarídeos acídicos (ácido teicóico) e peptidoglicano com abundância de poros, que promove a adesão de moléculas estranhas que acabam entrando na célula (KONG *et al.*, 2010). Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é constituída por um par de estruturas, uma membrana exterior constituída por lipopolissacarídeo (LPS), lípidos e proteínas, e uma estrutura interna citoplasmática de peptidoglicano. Nestes microrganismos, a bicamada da membrana externa tem um elevado peso molecular e funciona como uma barreira contra as moléculas estranhas (alta seletividade pelo glicocálix). Além disso, de acordo com Kong *et al.* (2010) a composição da membrana externa de bactérias Gram-negativas proporciona uma superfície hidrofílica, ou seja, um fator importante para as interações de curto alcance, por meio de forças que causam fortes ligações hidrofílicas com consequente repulsão de substâncias hidrofóbicas. Por outro lado, em espécies Gram-positivas, os modelos de estado de superfície sugerem que, na parede celular, há uma predominância de cargas em suas extremidades N-terminais com domínios hidrófobos dispersos (NAVARRE E SCHNEEWIND, 1999). Tal configuração de domínios hidrofóbicos e caudas carregadas resultam em locais definidos adequados para incorporação do polímero sobre a superfície celular. Isso facilita uma

clivagem proteolítica de entrada para as células que inibem ou destroem as funções celulares (SCHNEEWIND e MIHAYLOVA, 1993). A comparação entre os valores de CBM para a TMQ e a QC estão representados na Figura 15. Estes dados indicam que a inibição de *E. faecalis* e *P. vulgaris* pela TMQ foram bacteriostáticas, já que os valores de CBM foram superiores a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, diferente dos valores obtidos de CIM para as respectivas cepas. As setas indicam que as CBMs foram superiores a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo esta concentração, o valor máximo analisado nestes testes de sensibilidade.

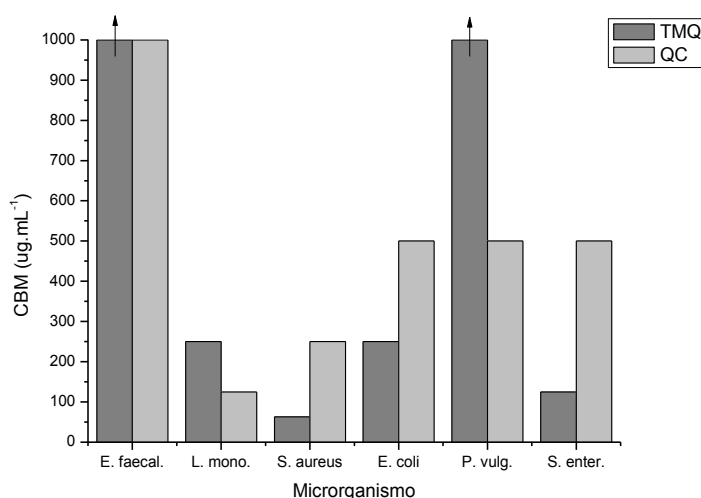


Figura 15. Comparação entre os valores de CBM da TMQ e da QC contra as bactérias testadas.

A Tabela 13, por sua vez, apresenta uma comparação dos valores de CIM e CBM entre a TMQ e a QC. Foi observado que, com exceção das cepas *E. faecalis* e *S. enterica*, as CIMs foram equivalentes às CBMs. Quando os valores de CIM são equivalentes aos valores de CBM, a ação do polímero para a respectiva cepa representa um efeito bactericida. Por outro lado, efeitos bacteriostáticos são visualizados quando os valores de CIM são inferiores aos valores de CBM. Entende-se que, quando uma solução que representa uma CIM é plaqueada e apresenta crescimento bacteriano, a inibição em tal concentração ocorre por um efeito bacteriostático. Caso contrário, se a solução que representa a CIM para uma determinada cepa for plaqueada e não apresentar crescimento bacteriano, a inibição contida nesta concentração é considerada bactericida.

Tabela 13. Comparação entre os valores de CIM e CBM para cada cepa bacteriana analisada.

Microrganismo	Reação de Gram	CIM		CBM	
		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

A comparação dos valores de CIM e CBM entre a TMQ e a QC demonstrou que ambos os polímeros apresentaram efeito bactericida e bacteriostático. Observou-se que concentrações mais altas tendem a ser bactericidas, enquanto que as mais baixas tendem a ser bacteriostáticas. A TMQ apresentou efeito bactericida para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. vulgaris* e efeito bacteriostático contra *S. enterica* e *E. faecalis*. Em contrapartida, a QC apresentou efeito bactericida para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* e *S. enterica* e efeito bacteriostático somente contra *E. faecalis*. A Figura 16 apresenta a comparação entre os valores de CIM e CBM obtidos para a TMQ. As setas indicam que as concentrações superaram o valor máximo analisado ($1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$), ou seja, as CIMs e as CBMs não foram determinadas para tais cepas.

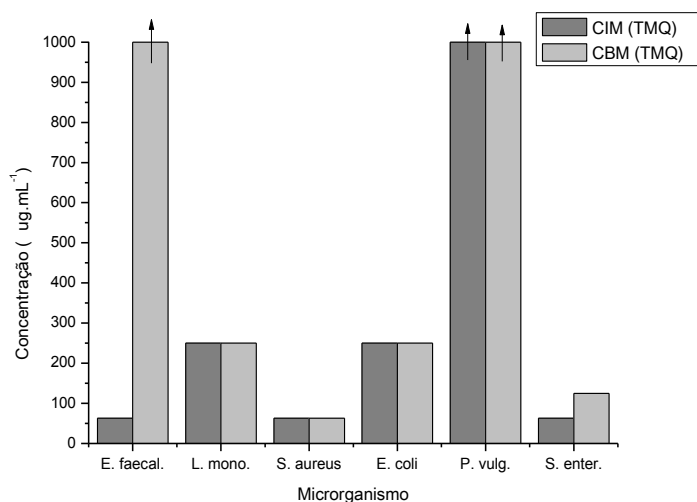


Figura 16. Comparação entre os valores de CIM e CBM da TMQ contra as bactérias testadas.

A comparação entre os valores de CIM e CBM para a TMQ (Figura 16) confirmaram que a cepa mais resistente ao polímero foi a *P. vulgaris*, enquanto que a mais sensível foi a *S. aureus*. A Figura 17 mostra a comparação entre os valores de CIM e CBM obtidos para a QC. Neste caso, também ficou confirmado que a cepa mais resistente à QC foi a *E. faecalis*, enquanto que a mais sensível foi a *L. monocytogenes*. Vale ressaltar que os testes com *L. monocytogenes* foram realizados em meio BHI, já que esta cepa não apresentou crescimento em meio MH. A norma M7-A6 da “CLSI” (NCCLS, 2003) estabelece que o meio utilizado para os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos sobre bactérias seja o MH. No entanto, verificou-se que a utilização do meio BHI não foi um fator determinante para o baixo crescimento e alta atividade antimicrobiana dos polímeros sobre *L. monocytogenes*. Portanto, a substituição do meio MH pelo BHI não influenciou os resultados obtidos neste estudo.

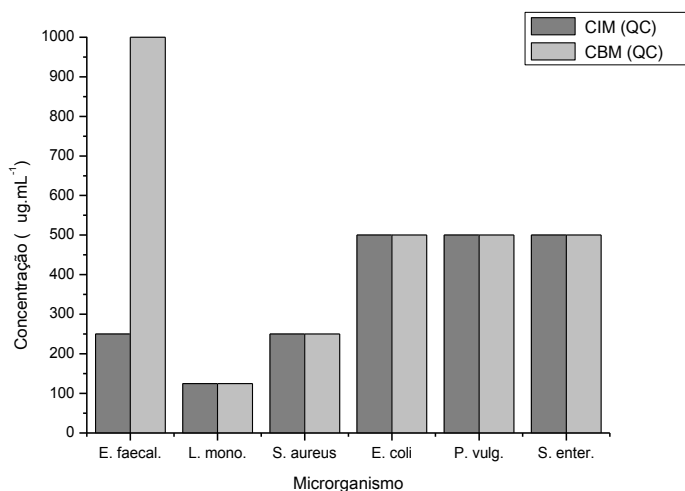


Figura 17. Comparação entre os valores de CIM e CBM da QC contra as bactérias testadas.

Além da determinação da CIM e da CBM, foram realizados testes para verificar a existência de efeitos sinérgicos entre a associação da TMQ com a QC. Zago *et al.* (2009) testaram o sinergismo de óleos essenciais com drogas antimicrobianas e verificaram a intensificação da atividade antibacteriana através de algumas associações de substâncias contra linhagens de *S. aureus* e *E. coli*. Também já havia sido verificado que o uso associado de plantas medicinais, além dos seus compostos derivados, e drogas antimicrobianas pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico das drogas antimicrobianas convencionais (NASCIMENTO

et al., 2000). Além disso, Chi *et al.* (2006) afirmaram haver efeito sinérgico sobre a propriedade bactericida de filmes de quitosana enriquecidos com extrato puro de óleo de orégano, observando-se uma redução do número de células de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 comparada a aplicação de somente o filme de quitosana. Apesar dos óleos essenciais e outras drogas antimicrobianas já terem sido testadas quanto às suas atividades sinérgicas, estudos sobre o sinergismo entre a TMQ e a QC ainda não haviam sido conduzidos. Nesse sentido, a fim de verificar a presença do efeito sinérgico, testes sobre a associação dos dois polímeros foram realizados contra *S. enterica*. A metodologia utilizada para tais testes foi a mesma realizada para a determinação das CIMs. Os resultados não demonstraram diferenças entre a atividade antibacteriana da associação com a de cada polímero isolado. Portanto, não houve efeito sinérgico da associação entre a TMQ e a QC contra *S. enterica*.

Com relação à atividade inibitória dos filmes de TMQ e QC, não foram observados halos de inibição contra as cepas bacterianas em estudo. As Figuras 18 e 19 ilustram os resultados obtidos para os filmes de TMQ e QC comparados ao controle sobre *E. faecalis*. No entanto, foi verificado que não houve crescimento bacteriano sob o filme de QC (Figura 19c), enquanto sob o filme de TMQ houve crescimento (Figura 19b). Esta falta de crescimento bacteriano sob o filme de QC sugere que apenas o contato da cepa com o material é que produz efeito antimicrobiano. O mesmo foi observado por Leceta *et al.* (2013) que estudaram os filmes de quitosana e não identificaram a presença de atividade antimicrobiana. Neste estudo, os testes também foram realizados pelo método de difusão em ágar e os resultados mostraram que não houve halo de inibição em meio sólido, independentemente do peso molecular da quitosana, teor de glicerol, amostras utilizadas (soluções ou filmes), ou das condições de secagem utilizadas para preparar os filmes (LECETA *et al.*, 2013).

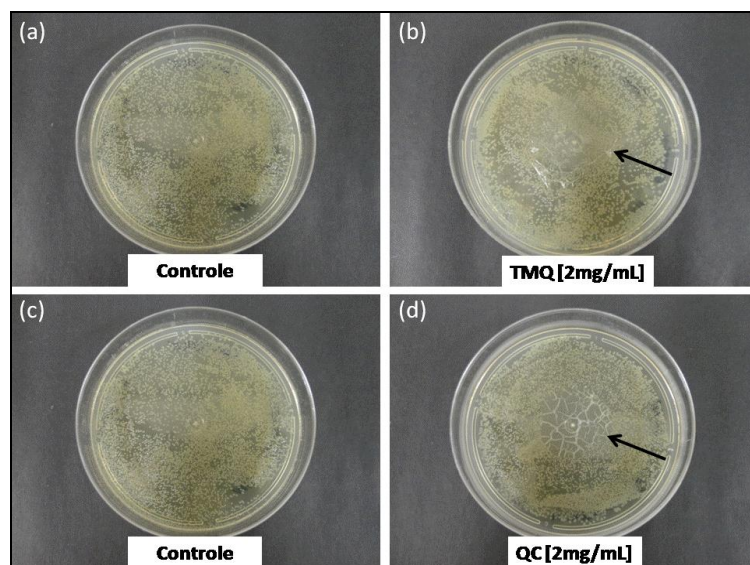


Figura 18. Filmes de TMQ e QC contra *E. faecalis*: (a) controle, (b) filme de TMQ ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) (c) controle (d) filme de QC ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). As setas indicam a posição do filme.

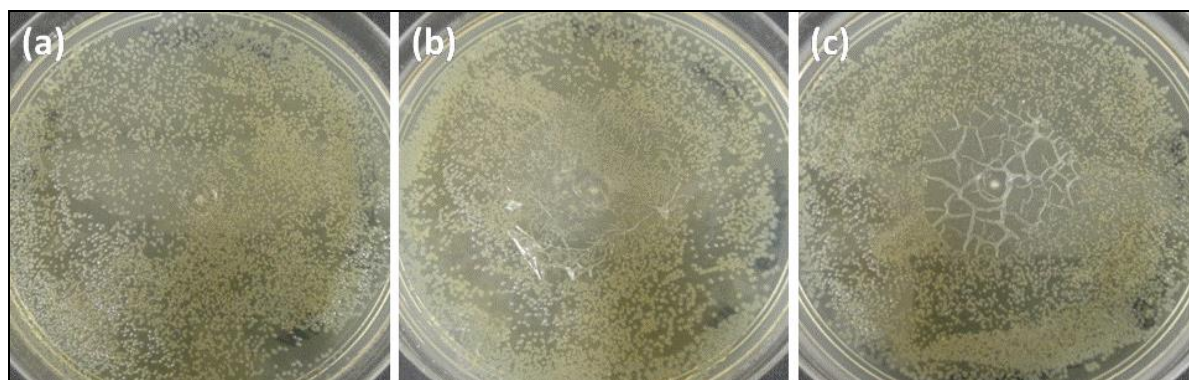


Figura 19. Filmes de TMQ e QC contra *E. faecalis*: (a) controle, (b) filme de TMQ ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) (c) filme de QC ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$).

A Figura 20 ilustra os resultados obtidos para os filmes de TMQ e QC contra a cepa *S. enterica*. Os resultados também indicaram não haver crescimento bacteriano sob os filmes de QC. Entretanto, a ausência de halos de inibição para ambos os polímeros indicou que a atividade dos filmes não foi influenciada pela característica da parede celular bacteriana, já que não houve efeito inibitório tanto contra a cepa Gram-positiva (*E. faecalis*) quanto para a Gram-negativa (*S. enterica*). Portanto, não houve halos de inibição dos filmes sobre as cepas testadas.

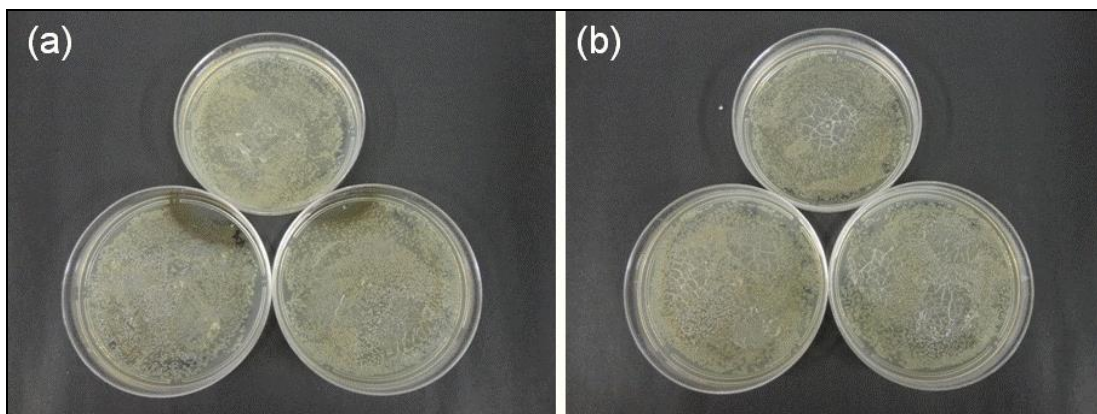


Figura 20. Filmes de TMQ e QC contra *S. enterica*: (a) filme de TMQ ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e (b) filme de QC ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$).

A ausência do efeito inibitório dos filmes poderia ser explicada pela limitação da difusão da quitosana no meio sólido, como já foi relatado por outros autores (COMA *et al.*, 2002). No entanto, Leceta *et al.* (2013) também perceberam a ausência de crescimento bacteriano sob os filmes de quitosana e afirmaram que os filmes a base deste material podem apresentar efeito bacteriostático. Isso foi visualizado contra *E. coli* 0517H e *Lactobacillus plantarum* CECT748 (Coleção de Culturas da Espanha). Da mesma forma que o ocorrido com os filmes de QC, eles notaram que os filmes secos à temperatura ambiente encolheram com o passar do tempo, apresentando uma aparência rugosa. Por outro lado, a aparência do filme de TMQ sobre a placa indicou haver grande afinidade do polímero pelo meio sólido, possivelmente devido à sua hidrofília. Dessa forma, o crescimento bacteriano observado sob os filmes de TMQ sugere que a propriedade hidrossolúvel deste derivado e seu contato com o meio de cultura a base de água (solvente) pode ter causado a dissolução do filme e consequente diminuição de sua propriedade antibacteriana. Tal como os resultados anteriores, este estudo demonstra que o método de difusão em ágar não é um método adequado para caracterizar as propriedades antimicrobianas da quitosana, sendo necessária a realização de testes complementares em meio de cultura líquidos.

Goy *et al.* (2012) também estudaram a atividade antibacteriana dos filmes de N,N,N-trimetilquitosana (TMQ) e de Quitosana Comercial (QC) contra duas cepas bacterianas, uma Gram-positiva (*S. aureus*) e uma Gram-negativa (*E. coli*). Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana do filme de QC foi inferior ao observado para o filme de TMQ, com resultados semelhantes àqueles relatados previamente na literatura (TSAI *et al.*, 2004; GOY *et*

al., 2009). No entanto, halos de inibição dos filmes foram observados somente contra a cepa *S. aureus*. Os autores relatam que a principal diferença entre a Quitosana Comercial e seu derivado TMQ é a densidade de cargas, o que reafirma o papel da interação eletrostática como um mecanismo determinante na atividade antibacteriana destes polímeros. A Quitosana Comercial tem um valor intrínseco de pKa em torno de 6,5 e apenas cerca de 24% dos seus grupos amino primários são carregados positivamente nesta condição, enquanto que todos os grupos amino primários e quaternários da TMQ são protonados, mesmo em solução de caráter neutro (MAO *et al.*, 2006). De acordo com a literatura, a interação eletrostática entre as cadeias de polissacarídeos e a superfície do microrganismo cria uma interferência dupla: a) promove mudanças na permeabilidade da membrana celular e, assim, provoca desequilíbrios osmóticos internos, inibindo o crescimento bacteriano; b) causa a hidrólise do peptidoglicano na parede do microrganismo, o que leva ao vazamento de eletrólitos intracelulares, que podem incluir íons potássio e outros constituintes proteicos de baixo peso molecular (por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos, glicose e lactato desidrogenase) (SHAHIDI *et al.*, 1999). A literatura também evidencia que estudos de filmes de quitosana incorporados com outros materiais tem sido alvo de pesquisa nos últimos anos (SALLET *et al.*, 2007; TRIPATHI *et al.*, 2008).

Salleh *et al.* (2007) testaram filmes a base de amido incorporado com quitosana e ácido láurico e identificaram a presença de atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Neste estudo, a incorporação de quitosana e ácido láurico apresentaram efeito sinérgico comparado à incorporação de cada substância isolada ao filme. A atividade antimicrobiana do filme incorporado foi medida com base no diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, também pelo método de difusão em ágar. Foi observada uma ampla zona clara correspondente ao halo de inibição contra *B. subtilis*, enquanto que para *E. coli* a atividade não foi tão eficaz, assim como no resultado obtido por Goy *et al.* (2012).

Tripathi *et al.* (2008) também avaliaram a atividade antibacteriana de filmes incorporados com quitosana e de soluções de mesma composição pelo método de difusão em ágar. A atividade antibacteriana do filme e das soluções foi avaliada contra três diferentes linhagens bacterianas: *E. coli* (Gram-negativa), *S. aureus* e *B. subtilis* (Gram-positivas). Estes autores verificaram que as soluções compostas por amido e quitosana mostraram um discreto efeito inibitório contra as três cepas, porém também não houve atividade antibacteriana para os filmes. Tais resultados comprovam que a atividade antimicrobiana da quitosana e seus derivados têm sido amplamente estudada nesses últimos anos (SALLET *et al.*, 2007;

TRIPATHI *et al.*, 2008; GOY *et al.*, 2012; LECETA *et al.*, 2013). Os filmes produzidos a base deste polímero são promissores agentes antimicrobianos e têm apresentado atividade antibacteriana satisfatória, com resultados que variam de acordo com a composição do filme, solução e o microrganismo analisado. Além disso, foi observado que a quitosana é um composto que pode apresentar efeito sinérgico quando associado a determinadas substâncias. Nesse sentido, materiais a base de quitosana vem apresentando propriedades antimicrobianas contra uma série de linhagens bacterianas.

5.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TMQ E DA QC

Nossos resultados demonstraram que os fungos foram mais resistentes à TMQ e à QC do que as bactérias analisadas. Os dados de CIM observados contra as três linhagens fúngicas são apresentados na Tabela 14. Neste caso, como a resistência dos fungos foi maior do que para as bactérias, a concentração máxima analisada sobre os dois compostos foi aumentada para 2,0 mg.mL⁻¹. Dessa forma, tanto a determinação da CIM como os testes sobre as fatias de tomate-cereja para os dois polímeros foram realizados a partir da concentração de 2,0mg.mL⁻¹.

Tabela 14. Determinação da Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da TMQ e da QC contra os fungos testados.

Microrganismo	TMQ	QC
<i>Aspergillus flavus</i> selvagem	>2000	>2000
<i>Aspergillus flavus</i> padrão	>2000	>2000
<i>Penicillium sp.</i>	>2000	>2000

De acordo com a Tabela 14, observou-se que as CIMs para as três linhagens fúngicas foram superiores ao valor máximo analisado de 2,0 mg.mL⁻¹. De acordo com o levantamento de CIMs realizado por GOY *et al.* (2009), a quitosana também apresentou CIM acima de 2,0 mg.mL⁻¹ contra duas linhagens de *Aspergillus* (*A. fumigatus* e *A. parasiticus*). Entretanto, os resultados de CIM obtidos neste estudo demonstraram haver atividade inibitória da TMQ contra *Penicillium sp.*, o que ainda não havia sido relatado na literatura (RABEA *et al.*, 2003; GOY *et al.*, 2009). A inibição não foi completa, mas a solução de TMQ diminuiu consideravelmente o crescimento do fungo em concentrações abaixo de 2,0mg.mL⁻¹ (Figura

21). Estes resultados mostraram a presença de atividade fungistática da TMQ sobre o *Penicillium sp.*, já que houve a diminuição de crescimento sem a completa inibição do fungo. Alguns autores também consideram a atividade da quitosana como fungistática em vez de fungicida (ASSIS; RAAFAT *et al.*, 2008).

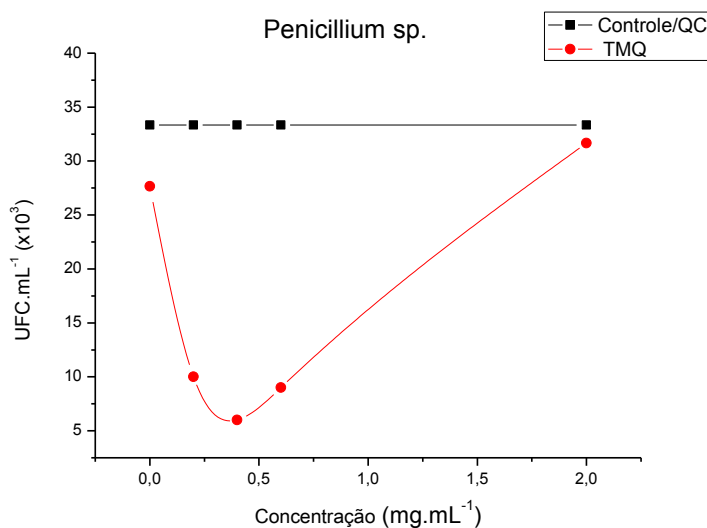


Figura 21. Atividade antifúngica da solução de TMQ contra *Penicillium sp.*

Constatou-se também que concentrações mais baixas de TMQ foram mais eficazes que as concentrações mais altas, o que sugere a existência de uma faixa de concentração ótima para a atividade antifúngica do polímero sobre o referido fungo. Neste caso, é proposto ainda que, concentrações acima ou abaixo de tal faixa sejam isentas de efeito inibitório.

Os testes realizados com fatias de tomate-cereja confirmam a atividade fungistática da QC e seu derivado TMQ sobre o *Penicillium sp.* Houve diminuição de aproximadamente 75% da infecção pelo fungo em amostras revestidas pela QC e aproximadamente 20% da infecção das amostras revestidas por TMQ, ambas comparadas às fatias controle (Figura 22). Apesar desta porcentagem de diminuição, os polímeros não inativaram completamente o fungo.

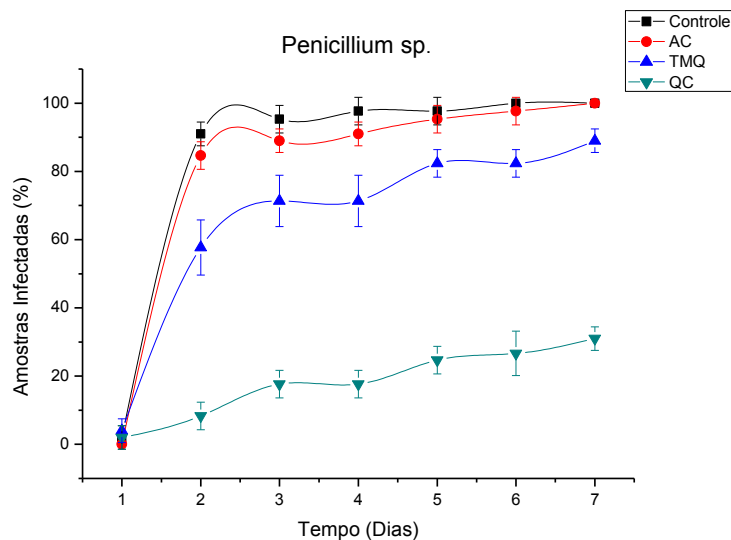


Figura 22. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra *Penicillium sp.* (Controle = fatias imersas em H₂O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹).

Os resultados destes testes mostraram a presença de atividade inibitória dos filmes de QC contra as três linhagens fúngicas analisadas. O mesmo não foi observado para os filmes de TMQ. Apesar de haver uma pequena atividade inibitória dos filmes de TMQ sobre as duas linhagens de *A. flavus* nos primeiros dias de tratamento, observou-se que após sete dias de incubação, aproximadamente 100% das fatias revestidas pelo polímero haviam sido infectadas (Figuras 23 e 24).

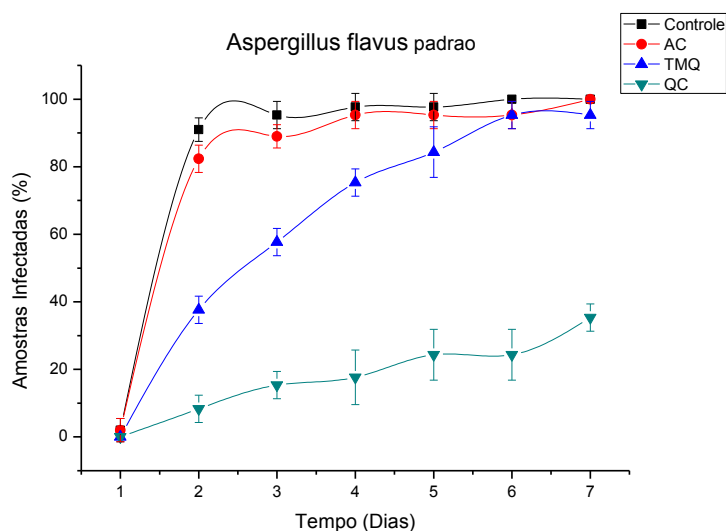


Figura 23. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra *A. flavus* padrão (Controle = fatias imersas em H₂O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹).

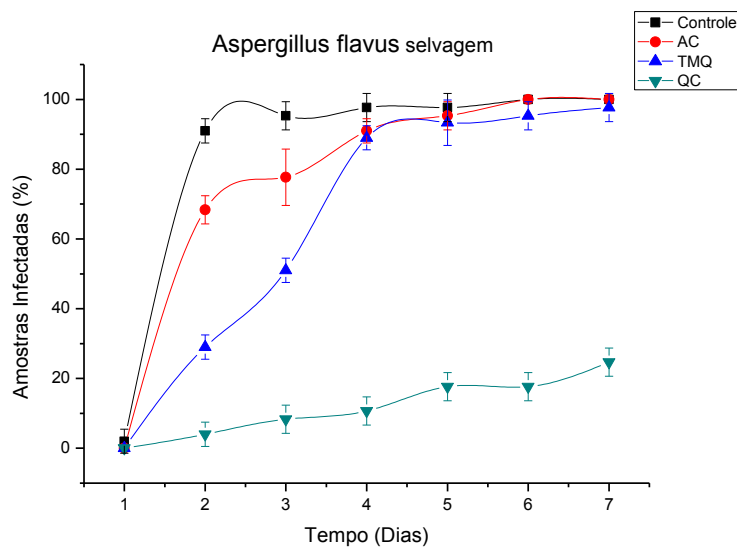


Figura 24. Atividade antifúngica dos filmes de TMQ e QC contra *A. flavus* selvagem (Controle = fatias imersas em H₂O destilada; AC = imersas em ácido acético 1%; TMQ = imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹; QC = imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹).

A falta de atividade inibitória do filme de TMQ também pode ser explicada pelo fato deste polímero ser solúvel em água. Notou-se que as fatias de tomate-cereja, quando fatiadas, apresentavam superfície de contato extremamente úmida, o que pode ter comprometido a formação do filme e contribuído para a diminuição da atividade antifúngica do polímero. Em contrapartida, verificou-se que a solução de ácido acético diminuiu o crescimento dos fungos nos primeiros dias de tratamento. No entanto, esta diminuição não foi considerada significativa ou determinante para a atividade inibitória dos filmes de QC. Portanto, não houve influência do ácido acético sobre o crescimento dos fungos analisados. Tais resultados corroboram alguns estudos que demonstram que as atividades antifúngicas da quitosana são raramente influenciadas pelo pH do meio (HIRANO *et al.*, 1989; COMA *et al.*, 2002). Alguns autores defendem, como já relatado na revisão, que a atividade antifúngica da quitosana está relacionada com o estímulo da produção de enzimas quitinolíticas pelo próprio tecido vegetal tratado, tais como a quitinase, que degradam as paredes celulares de fungos e induzem a produção de agentes antimicrobianos pela planta, como a fitoalexina e o pisatin (COMA *et al.*, 2002). As Figuras 25, 26 e 27 ilustram os testes realizados sobre a imersão de fatias de tomate-cereja em soluções filmogênicas de TMQ e QC, ambas a 2,0 mg.mL⁻¹, sobre o crescimento dos três fungos analisados.

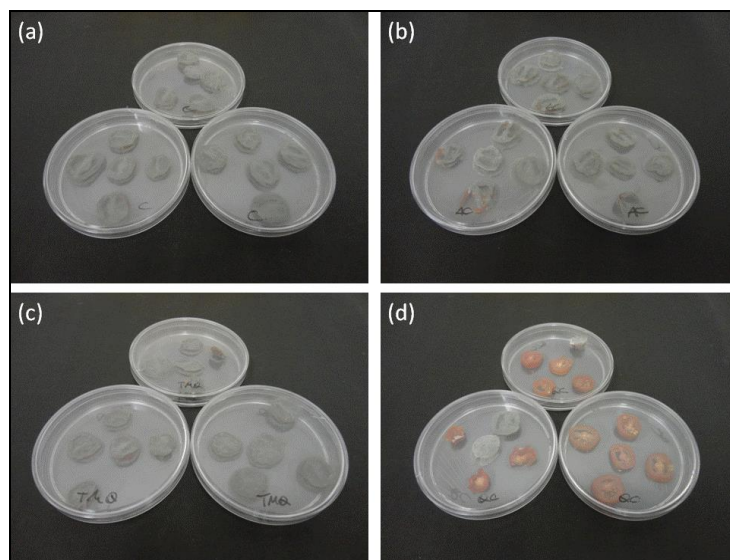


Figura 25. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com *Penicillium* sp. após 7 dias de incubação: (a) fatias imersas em H₂O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹.

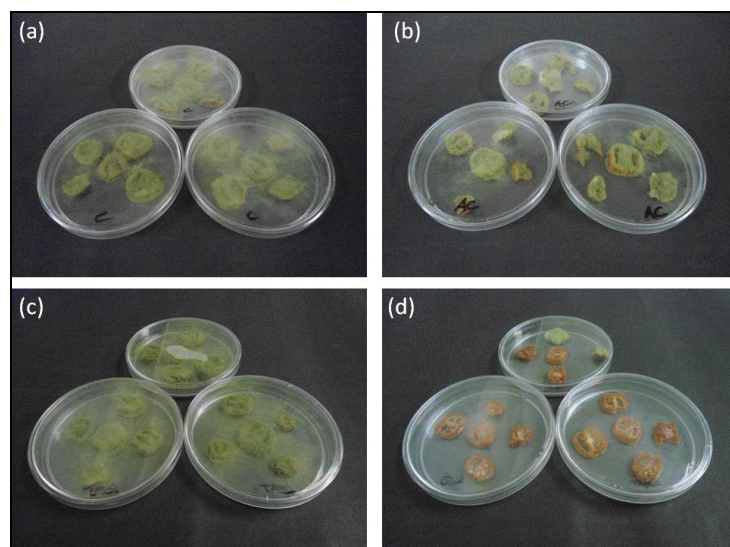


Figura 26. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com *A. flavus* padrão após 7 dias de incubação: (a) imersas em H₂O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹.

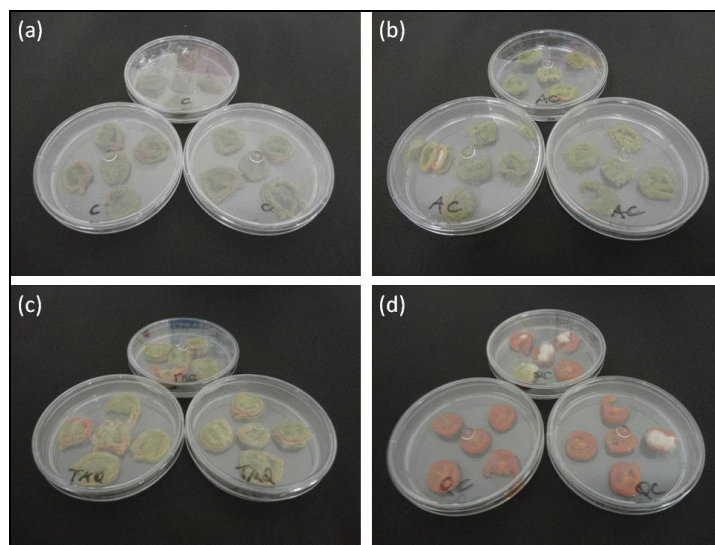


Figura 27. Placas com fatias de tomate-cereja inoculadas com *A. flavus* selvagem após 7 dias de incubação: (a) imersas em H₂O destilada, (b) imersas em ácido acético 1% (c) imersas em solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹ e (d) imersas em solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹.

Os resultados também demonstraram que a inibição dos filmes de QC contra todas as linhagens fúngicas não foi completa. Observou-se, pelas Figuras 25d, 26d e 27d, que algumas fatias foram infectadas mesmo com a presença do revestimento. Isso reafirma a ação do filme de quitosana como fungistática em vez de fungicida. Em estudos anteriores, Plascencia-Jatomea *et al.* (2003) descobriram que a quitosana de médio peso molecular em concentrações de 3,0 e 5,0 mg.mL⁻¹ inibiu o crescimento micelial radial de *Aspergillus niger* em 73% comparado ao controle, mas também não observaram a completa inibição do fungo. Da mesma forma, tem sido relatado que a quitosana e seus derivados não são capazes de inibir totalmente (100%) o crescimento de fungos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus stolonifer* (RABEA *et al.*, 2006). A Figura 28 ilustra com maior clareza a atividade inibitória do filme de QC sobre o crescimento do fungo *Penicillium sp.* Nota-se que três das fatias de tomate-cereja encontram-se infectadas, mesmo na presença do revestimento de QC, o que evidencia a atividade fungistática do polímero.



Figura 28. Atividade inibitória dos filmes de QC sobre fatias de tomate-cereja inoculadas com *Penicillium sp.*, após 7 dias de incubação.

Com relação aos testes para verificação da presença de halos de inibição, tanto as soluções de QC ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) quanto as de TMQ ($2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) revelaram atividade antifúngica. As soluções de QC apresentaram atividade inibitória contra as três linhagens analisadas (Figuras 29d, 30d e 31d). No entanto, a TMQ apresentou atividade inibitória somente contra *Penicillium sp.* e *A. flavus* padrão (Figuras 29c e 30c). Não foi observada atividade inibitória da TMQ contra *A. flavus* selvagem (Figura 31c). Vale salientar que as linhagens selvagens geralmente são menos sensíveis à agentes antimicrobianos do que as cepas padrões. Esta resistência pode ser adquirida pela exposição prévia do microrganismo à substâncias nocivas semelhantes à quitosana, seja por competição intra ou interespecífica ou por eventuais causas ambientais. As Figuras 29, 30 e 31 mostram que tanto a TMQ quanto a QC afetaram o crescimento micelial e os corpos de frutificação dos fungos. Esse efeito pode ser visualizado comparando-se as placas controle com aquelas em que poços foram preenchidos pelas soluções de TMQ e QC. É nítida a coloração mais clara e a alteração dos corpos de frutificação entre as placas com soluções de TMQ e QC e as placas controle. Apesar de haver alteração no crescimento micelial e dos corpos de frutificação fúngicos, não foram visualizados halos de inibição das soluções contra os fungos.

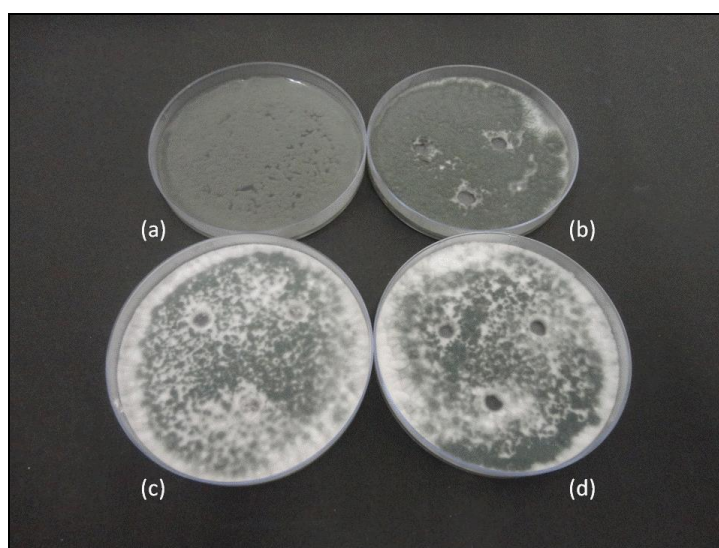


Figura 29. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do *Penicillium* sp. após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e (d) com solução de QC a $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

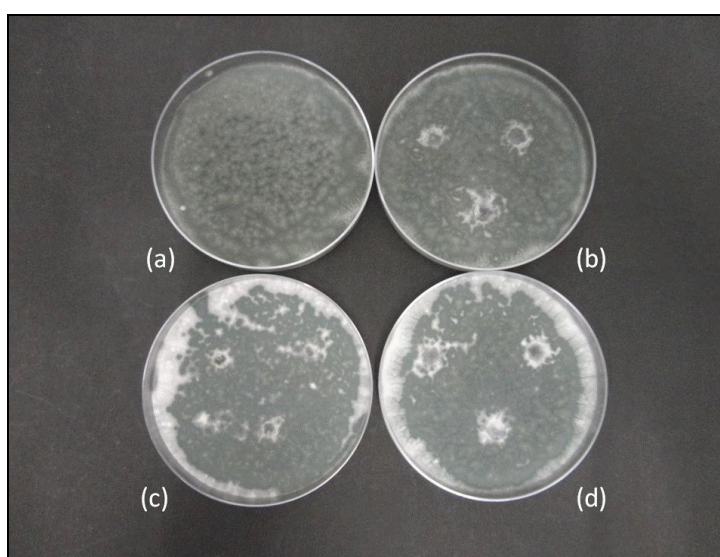


Figura 30. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do *A. flavus* padrão após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ e (d) com solução de QC a $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

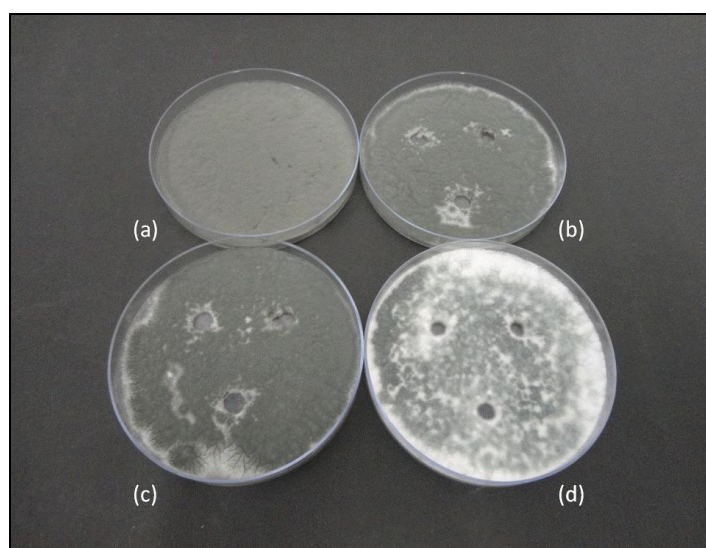


Figura 31. Efeito das soluções de TMQ e de QC sobre o micélio e os corpos de frutificação do *A. flavus* selvagem após 4 dias de incubação: (a) controle, (b) com solução de ácido acético 1%, (c) com solução de TMQ a 2,0 mg.mL⁻¹ e (d) com solução de QC a 2,0 mg.mL⁻¹.

Efeitos da quitosana sobre o desenvolvimento de fungos também foi observado por Camili *et al.* (2007) sobre *B. cinerea in vitro*. A quitosana inibiu tanto o crescimento micelial quanto a germinação dos esporos do fungo. Segundo os autores, o crescimento micelial de *B. cinerea* foi completamente inibido pela quitosana a 5,0, 10, 15 e 20 mg.mL⁻¹, durante o período de incubação de cinco dias a 22 ± 1° C. Eles notaram que no meio acrescido de 2,5 mg.mL⁻¹ de quitosana o fungo *B. cinerea* formou colônias compactas com micélio aéreo crescendo verticalmente e, o mesmo patógeno, crescendo em meio não acrescido de quitosana (controle), formou colônias amplas. A mesma característica de crescimento foi observada para o patógeno *Mucor racemosus* crescido em meio suplementado com 1,0 mg.mL⁻¹ de quitosana (ROLLER e COVILL, 1999) e para *Rhizopus stolonifer* crescido nas concentrações de quitosana maiores que 1,5 mg.mL⁻¹ (EL GHAOUTH *et al.*, 1992). De acordo com El Ghaouth *et al.* (1992), a diferença qualitativa na morfologia das colônias de *R. stolonifer* crescidas em meio com ou sem quitosana sugere que o microrganismo procurou crescer longe da superfície na tentativa de evitar o contato direto com o efeito tóxico do polímero. Com base nas observações deste e de outros trabalhos (ROLLER e COVILL, 1999), pode-se inferir que a atividade antimicrobiana da quitosana contra fungos pode ser melhorada pelo maior contato entre o material e o microrganismo ao qual se pretende controlar. Além disso, tem sido relatado que o contato direto dos fungos com a quitosana é o suficiente para produzir o enfraquecimento e o inchaço

de hifas sendo, portanto, as propriedades fungistáticas da quitosana relacionadas com a sua capacidade em induzir mudanças morfológicas na parede celular microbiana (RABEA *et al.*, 2003). Nesse sentido, autores afirmam que a quitosana altera severamente o fluxo do conteúdo citoplasmático, provavelmente devido à dissociação ou danos causados à parede e membrana celular fúngica (MUZZARELLI *et al.*, 2001).

A inibição da germinação de esporos também tem sido relatada por Camili *et al.* (2007). Os autores observaram que os conídios submetidos à solução de quitosana apresentaram hifas atrofiadas, mais espessas e muitas vezes com ramificação excessiva. Outros estudos mostraram que sob concentração relativamente baixa (20 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a quitosana causou inibição de 50% na germinação de conídios de *B. cinerea* e, quase total inibição foi observado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BEN-SHALOM *et al.*, 2003). Antes mesmo de ser relatado por Camili *et al.* (2007), Ben-Shalom *et al.* (2003) já haviam observado a redução da elongação do tubo germinativo de fungos pela exposição à quitosana. Estudos mais recentes, entretanto, reafirmam que na presença de quitosana, hifas de *A. niger* cresceram lisas e finas em comparação com as desenvolvidas sobre o revestimento controle (MARTÍNEZ-CAMACHO *et al.*, 2010).

Liu *et al.* (2007) também presenciaram a atividade antifúngica da quitosana em diferentes concentrações sobre a germinação de esporos e o alongamento do tubo germinativo de *B. cinerea* e *Penicillium expansum*. A germinação de esporos foi completamente inibida pela quitosana a 5,0 mg.mL^{-1} sobre *P. expansum* e 10 mg.mL^{-1} para *B. cinerea*. O alongamento do tubo germinativo de ambos os patógenos foi significativamente inibido quando a concentração de quitosana foi superior a 1,0 mg.mL^{-1} .

Com relação ao efeito antimicrobiano da quitosana em frutas e hortaliças, esta atividade parece originar uma combinação entre sua propriedade antifúngica e a habilidade em estimular respostas de defesa pelo organismo hospedeiro. Dessa forma, a quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativando várias respostas de defesa do próprio tecido vegetal (EL GHAOUTH *et al.*, 1992; EL GHAOUTH *et al.*, 1994). Ainda sobre as propriedades antifúngicas da quitosana em frutas e hortaliças, a quitosana possui diferentes mecanismos de ação que incluem o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação e indução da síntese de calose (EL GHAOUTH *et al.*, 1994). Estudos *in vitro* realizados sobre o crescimento de fungos filamentosos mostraram que a quitosana provoca agregação dos esporos, afeta a saída do túbulo germinal e interfere com a passagem de nutrientes através da membrana celular (RAAFAT e SAHL, 2009). O estudo

realizado por Muñoz *et al.* (2009) também revelou que o uso de revestimento de quitosana foi eficaz na redução da antracnose em frutos de tomate e bagas de uva “Itália”. Os frutos tratados com soluções em concentrações de 10 e 25 mg.mL⁻¹ de quitosana mostraram uma redução significativa do diâmetro da lesão por *Colletotrichum sp.* em comparação com os frutos controle. Dessa forma, a quitosana e seus derivados têm mostrado boa atividade antifúngica, podendo ser considerados como agentes promissores para a conservação de frutas e hortaliças.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a CIM da TMQ para *P. vulgaris*;
- Determinar a CIM da TMQ e da QC para linhagens de *A. flavus* e *Penicillium* sp.;
- Identificar halos de inibição para a TMQ e a QC sobre linhagens bacterianas e fúngicas;
- Verificar se há inibição da produção de aflatoxina para as linhagens de *A. flavus* na presença da TMQ e da QC;
- Verificar a atividade antimicrobiana da TMQ e da QC contra fungos não filamentosos;
- Realizar testes sobre a associação da TMQ e/ou da QC com outros fármacos ou agentes antimicrobianos (sinergismo), os quais poderiam apresentar resultados promissores em relação à intensificação do potencial antimicrobiano destes polímeros;
- Verificar a atividade antimicrobiana da TMQ e da QC contra *B. cinerea*;
- Realizar análises microscópicas do efeito da TMQ e da QC sobre o crescimento micelial de fungos filamentosos;
- Realizar análises *in vitro* sobre o efeito da TMQ e da QC sobre a germinação de esporos e alongamento do tubo germinativo de fungos filamentosos.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados demonstraram que a TMQ e a QC são polímeros com relevante potencial antibacteriano contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas;
- A atividade antimicrobiana da TMQ comparada à QC foi superior para a maioria das cepas bacterianas analisadas. A TMQ mostrou-se mais eficaz contra as seguintes linhagens: *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. enterica*. Em contrapartida, a QC apresentou maior atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* e *P. vulgaris*;
- Os dados de CIM indicaram que a TMQ e a QC apresentam tanto efeito bactericida quanto bacteriostático. Em maiores concentrações o efeito da TMQ e da QC foi bactericida, mas os dois compostos também exerceram efeitos bacteriostáticos em concentrações mais baixas;
- Constatou-se que soluções de ácido acético em concentrações superiores a 0,05% inibem o crescimento bacteriano. Entretanto, soluções de ácido acético 1% não potencializaram o efeito dos agentes antimicrobianos testados. Além disso, não foram constatados efeitos sinérgicos entre a associação da TMQ com a QC;
- De acordo com os resultados de CBM, a TMQ apresentou maior atividade antibacteriana contra cepas Gram-negativas, enquanto que a atividade antibacteriana da QC foi maior contra cepas Gram-positivas;
- Soluções de TMQ e QC apresentaram atividade antifúngica com alteração na formação dos corpos de frutificação em comparação ao controle;
- Os filmes de TMQ não apresentaram efeito antibacteriano;
- O efeito antibacteriano dos filmes de QC ocorreu apenas pelo contato do material com as cepas, não havendo halo de inibição;
- Os filmes de TMQ apresentaram atividade antifúngica somente contra *Penicillium* sp.;
- Os filmes de QC demonstraram atividade antifúngica contra as três linhagens testadas;
- A atividade dos filmes de TMQ e QC foi considerada como fungistática em vez de fungicida.

8. REFERÊNCIAS

Acheson, D. W. K. *Foodborne Infections. Current Opinion in Gastroenterology*, v. 15, p. 538-545, 1999.

Amorim, R.V.S.; Takaki, G.M.C.; Ledingham, W.M. e Fukushima, K. *Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.32, p. 19-23, 2005.

Andres, Y.; Giraud, L.; Gerente, C. and Le Cloirec, P. *Antibacterial effects of Chitosan powder: Mechanisms of action. Environmental Technology*, v. 28, p.1357-1363, 2007.

Assis, O. B. G. *Avaliação, por análise de imagens, da ação fungistática de coberturas de quitosana em maçãs minimamente processadas. Monografia de Especialização*, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 2008.

Assis, O. B. G.; Bernardes Filho, R.; Viera, D. C. and Campana Filho, S. P. *AFM characterization of Chitosan self-assembled films. Internatinal Journal of Polymeric Materials*, v.51, p.633-638, 2002.

Assis, O. B. G. e Silva, V. L. *Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.13, p. 223-228, 2003.

Assis, O. B. G. and Pessoa, J. D. C. *Preparation of Thin Films of Chitosan for use as Edible Coatings to Inhibit Fungal Growth on Sliced Fruits. Brazilian Journal of Food Technology*, v.7, p.17-22, 2004.

Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Lia Fook, M. V. and Costa, A. C. F. M. *Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p. 27-34, ISSN 1809-8797, 2007.

Balicka-Ramisz, A.; Wojtasz-Pajak, B.; Pilarczyk, A. and Ramisz, L. L. *Antibacterial and antifungal activity of chitosan, in: 12th ISAH Congress on Animal Hygiene*, Warsaw, p. 406, 2005.

Ben-shalom, N.; Ardi, R.; Pinto, R.; Aki, C.; Fallik, E. *Controlling gray mould caused by Botrytis cinerea in cucumber plants by means of chitosan. Crop Protection*, Oxford, v. 22, p. 285-290, 2003.

Berger, L. R. R.; Stamford, T. Ch. M.; Stamford, N. P. *Perspectivas para o uso da Quitosana na Agricultura. Revista Iberoamericana de Polimeros*, v. 2, p. 195-215, 2011.

Beuchat, L. R. *Ecological factor influencing survival and growth of humans pathogens on raw fruits and vegetables*. **Microbes and Infections**, v. 4, p. 413-423, 2002.

Britto, D. and Assis, O.B.G. *A new method for obtaining of quaternary salt of chitosan*. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 305-310, 2007a.

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, 2007b.

Britto, D.; Campana-Filho, S.P. *A kinetic study of the thermal degradation of N,N,N-trimethylchitosan*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 353-361, 2004.

Britto, D.; Campana-Filho, S. P.; Assis, O. B. G. *Mechanical Properties of N,N,N-trimethylchitosan Chloride Films*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 142-145, 2005.

Britto, D.; Santos, M. F.; Assis, O. B. G. *Chitosan solution as coating on apple*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 23, p. 15-21, 2012.

Camili, E. C.; Benato, E. A.; Pascholati, S. F.; Cia, P. *Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p. 215-221, 2007.

Chatelet, C.; Damour, O.; Domart, A. *Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films*. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

Chen, R. H.; Lin, J. H.; Yang, M. H. *Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their coated films*. **Carbohydrate Polymers**, v.24, p. 41-46, 1994.

Chen, R. H.; Hwa, H-D. *Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane*. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 353-358, 1996.

Chen, C. S.; Liau, W. Y.; Tsai, G. J. J. *Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation*. **Food Protection**, v. 61, p. 1124-1128, 1998.

Chi, S.; Zivanovic, S.; Penfield, M. P. *Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes*. **Food Science and Technology International**, v.12, p. 111-117, 2006.

Coma, V.; Martial-Gros, A.; Garreau, S.; Copinet, A.; Salin, F. and Deschamps, A. *Edible antimicrobial films based on chitosan matrix*. **Journal of Food Science**, v. 67, p.1162-1169, 2002.

Costa Silva, H.S.R.; Santos, K.S.C.R.; Ferreira, E.I. *Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços*. **Química Nova**, v. 29, p. 776-785, 2006.

Curti, E.; Britto, D.; Campana-Filho, S.P. *Methylation of chitosan with iodomethane: Effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution*. **Macromolecules Biocides**, v. 3, p.571-576, 2003.

Darmadji, P.; Izumimoto, M. Effect of chitosan in meat preservation. **Meat Science**, Barking, v.38, n. 2, p. 243-254, 1994.

Davies, D. H.; Hayes, E. R. *Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 442-446, 1988.

Devlieghere, F.; Vermeulen, A.; Debevere, J. *Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 703–714, 2004.

Domard, A. *Determination of n- acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements*.

International Journal Biological Macromolecules, v.9, p. 333-336, 1987.

Domard, A.; Rinaudo, M. *Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan*. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 5, p. 49–52, 1993.

Dung, P. L.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Desbrières, J. *Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan*. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, p. 209-214, 1994.

El Ghaouth, A.; Arul, J.; Grenier, J.; Asselin, A. *Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 398-402, 1992.

El Ghaouth, A.; Arul, J.; Wilson, C.; Benhamou, N. *Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, p. 417-432, 1994.

El Ghaouth, A.; Arul, J.; Wilson, C.; Benhamou, N. *Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and Botrytis cinerea in bell pepper fruit*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 183-194, 1997.

Elsabee, M. Z.; Abdou, E. S. *Chitosan based edible films and coatings: A review*. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 1819–1841, 2013.

Eweis, M.; Elkholy, S. S. and Elsabee, M. Z. *Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 1-8, 2006.

Fai, A. E. C.; Stanford, T. C. M.; Stanford, T. L. *Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Aliminetos*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, p. 435-451, 2008.

Fang, S. W.; Li, C. F.; Shih, D. Y. C. *Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied Kumquat*. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 136-140, 1994.

Francis Suh, J. K. and Matthew, H.W.T. *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review*. **Biomaterials**, v. 21, p. 2589-2598, 2000.

Gomes, R. V. *Imobilização de esporos de Bacillus Subtilis em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, 89 p., 2007.

Goy, R. C.; Britto, D.; Assis, O. B. G., *A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan*. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 241-247, 2009.

Goy, R. C.; Britto, D.; Assis, O. B. G. *Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan*. **E-Polymers**. ISSN 1618-7229, 2012.

Hadwiger, L. A.; Kendra, D. F.; Fristensky, B. W.; Wagoner, W. *Chitosan Both Activates Genes in Plants and Inhibits RNA Synthesis in Fungi*. **Chitin in Nature and Technology**, p. 209-214, 1986.

Hirano, S.; Tsuchida, H.; Nagao, N. *N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis*. **Biomaterials**, v.10, p. 574–576, 1989.

Hongpattarakere, T.; Riyaphan, O. *Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp*. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 30, p.1-9, 2008.

Jia, Z.; Shen, D.; Xu, W. *Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan*. **Carbohydrate Research**, v. 333, p.1-6, 2001.

Jiang, Y.; Li, Y. *Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 139-143, 2001.

Jing, Y. J.; Hao, Y. J.; Qu, H.; Shan, Y.; Li, D. S. e Du, R. Q. *Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 58, p.75-86, 2007.

Jung, B.; Kim, C.; Choi, K.; Lee, Y.M.; Kim, J. *Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities*. **Journal of Applied Polymer Science**, v.72, p. 1713–1719, 1999.

Khor, E. *Chitin: a biomaterial in waiting*. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 313-317, 2002.

Koide, S. S. *Chitin-chitosan: properties, benefits and risks*. **Nutrition Research**, v. 18, p. 1091-1101, 1998.

Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. Y. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-63, 2010.

Kubota, N.; Eguchi, Y. *Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility*. **Polymers Journal**, v. 29, p. 123-127, 1997.

Kumar, A. B. V.; Varadaraj, M. C.; Gowda, L. R. e Tharanathan, R. N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 391, p.167-175, 2005.

Kurita, K. *Chemistry and application of chitin and chitosan*. **Polymer Degradation and Stabilify**, v. 59, p. 17-20, 1997.

Leceta, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Dueñas, M.T.; de la Caba, K. *Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films*. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 889–899, 2013.

Liu, J.; Tian, S.; Meng, X.; Xu, Y. *Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, p. 300–306, 2007.

Liu, X. F.; Guan, Y. L.; Yang, D. Z.; Li, Z. e Yao, K. D. *Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, p. 1324-1335, 2001.

Madingan, M. T.; Martinko, J.M.; Parker, J. *Microbiologia de Brock*, São Paulo: **Prentice-Hall**, 10^a ed., 608 p., 2004.

Martínez-Camacho, A.P.; Cortez-Rocha, M.O.; Ezquerro-Brauer, J.M.; Graciano-Verdugo, A.Z.; Rodríguez-Félix, F.; Castillo-Ortega, M.M.; Yépiz-Gómez, M.S.; Plascencia-Jatomea, M. *Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305–315, 2010.

Mao, S.; Bakowsky, U.; Jintapattanakit, A.; Kissel, T. *Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, p. 1036–1048, 2006.

Matan, N.; Rimkeeree, H.; Mawson, A.J.; Chompreeda, P.; Haruthaithanasan, V.; Parker, M. *Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions*. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 180–185, 2006.

Mchugh, T. H.; Huxsoll, C.C.; Krochta, J.M. *Permeability Properties of Fruit Puree Edible Films*. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 88-91, 1996.

Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikama, S. *Highly deacetylated chitosan and its properties*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 28, p. 1909-1917, 1983.

Ministério da Saúde / Brasil. *Portaria, nº. 540, de 27 de outubro de 1997, Regulamento Técnico de Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brasil, 1997.

Muñoz, Z.; Moret, A.; Garcés, S. *Assessment of chitosan for inhibition of Colletotrichum sp. on tomatoes and grapes. Crop Protection*, v. 28, p. 36–40, 2009.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Livro: Microbiologia Médica*. Tradução da 5ª Ed. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 981 p., 2006.

Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Tarsi, R.; Miliani, M.; Gabbanelli, F.; and Cartolari, M. *Fungistatic activity of modified chitosans against Saprolegnia parasitica. Biomacromolecules*, v. 2, p. 165–169, 2001.

Nascimento, G. G. F.; Lucatelli, J.; Freitas, P. C.; Silva, G. L. *Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 247-256, 2000.

Navarre, W. W. and Schneewind, O. *Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, p. 174-229, 1999.

NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos*; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS (**ISBN 1-56238-470-8**). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

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.

No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H.; Meyers, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p. 65-72, 2002.

Ojagh, S. M.; Rezaei, M.; Razavi, SH. and Hosseini, S.M.H. *Effect of Chitosan Coatings Enriched with Cinnamon Oil on the Quality of Refrigerated Rainbow Trout. Food Chemistry*, v. 120, p. 193–198, 2010.

Oliveira, R. A. *Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre aliva e Streptococcus mutans. Dissertação de Mestrado*, USP, São Carlos, 90 p., 2004.

Olsen, R.; Schwartzmiller, D.; Weppner, W.; Winandy, R. *Biomedical applications of chitin and its derivatives. Elsevier Applied Science*, London, v.5, p. 813-820, 2000.

Papineau, A. M.; Hoover, D. G.; Knorr, D. e Farkas, D. F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. **Food Biotechnology**, v.5, p.45-57, 1991.

Plascencia-Jatomea, M.; Viniegra, G.; Olayo, R.; Castillo-Ortega, M. M. and Shirai, K. *Effect of chitosan and temperature on spore germination of Aspergillus niger*. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, p. 582–586, 2003.

Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. *Microbiology*. 3 ed. USA, **WCB Publishers (SBI)**, 935p.,1996.

Raafat, D.; von Bargen, K.; Haas, A. and Sahl, H. G. *Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 3764-3773, 2008.

Raafat, D. and Sahl, H. G. *Chitosan and its antimicrobial potential - A critical literature survey*. **Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 186–201, 2009.

Rabea, E. I.; Badawy, M. E. T.; Stevens, C.V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. **Biomacromolecules**, American Chemical Society, v.4, p. 1457-1465, 2003.

Rabea, E. I.; El Badawy, M.; Rogge, T. M.; Stevens, C. V.; Steurbaut, W. and Höfte, M. *Enhancement of fungicidal and insecticidal activity by reductive alkylation of chitosan*. **Pest Management Science**, v.62, p. 890–897, 2006.

Ravi Kumar, M. N. V. *A review of chitin and chitosan applications*. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

Rinaudo, M.; Domard, A. *Solution properties of chitosan*, in: Skjak-Braek, G.; Anthonsen, T.; Sandford, P. editors. *Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. **London and New York: Elsevier**, p. 71–86, 1989.

Rinaudo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. **ProGram Polymers Science**, v. 31, p.603–632, 2006.

Roller, S. and Covill, N. *The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 67-77, 1999.

Salleh, E.; Muhamad, I.; Khairuddin, N. *Preparation, Characterization and Antimicrobial Analysis of Antimicrobial Starch-Based Film Incorporated with Chitosan and Lauric Acid*. **Asian Chitin Journal**, v. 3, p. 55–68, 2007.

Sannan, T., Kurita, K.; Iwakura, Y. *Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility*. **Macromolecules Chemistry**, v. 177, p. 3589-3600, 1976.

Santos, J. E.; Soares, J. P.; Dockal, E. R.; Campana Filho, S.P.; Cavalheiro, E.T.G. *Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, p. 242-249, 2003.

Sashai, A. S. and Manocha, M. S. *Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.11, p.317-338, 1993.

Schneewind, O.; Mihaylova-Petkov, D.; Model, P. *Cell wall sorting signals in surface proteins of Gram-positive bacteria*. **The EMBO Journal**, v. 12, p. 4803–4811, 1993.

Schulz, P. C.; Rodriguez, M. S.; Del Blanco, L. F.; Pistonesi, M.; Agulló, E. *Emulsification properties of chitosan*. **Colloid Polymer Science**, v. 276, p. 1159-1165, 1998.

Sebti, I.; Martial-Gros, A.; Carnet-Pantiez, A.; Grelier, S. and Coma, V. J. *Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination*. **Food Science**, v.70, p. M100 - M104, 2005.

Sekiguchi, S.; Miura, Y.; Kaneko, H.; Nishimura, S. I.; Nishi, N.; Iwase, M. and Tokura, S. *Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers*, in: Nishinari, K. and Doi, E. Editors. *Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions*, **Plenum Press**, New York, 1994.

Seo, H. J.; Mitsuhashi, K.; Tanibe, H. *In Advances in Chitin and Chitosan*, in: Brine, C. J.; Sandford, P. A.; Zikakis, J. P. Editors. **Elsevier Applied Science**, New York, p. 34-40, 1992.

Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V.; Jeon, Y.-J. *Food applications of chitin and chitosans*. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p. 37-51, 1999.

Sieval, A. B.; Thanou M.; Kotze A. F.; Verhoef J. C.; Brussee J.; Junginger, H.E. *Preparation and NMR characterization of peptide highly substituted N-trimethyl chitosan chloride*. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, p.157–165, 1998.

Silva, G. L., *Estudo da Ação Inibitória da Quitosana sobre os Enteropatógenos: Salmonella enterica, Shigella sonnei e Escherichia coli EPEC*. **Dissertação de Mestrado**, USP, São Carlos, 90 p., 2005.

Silva, L. P.; Britto, D.; Selegim, M. H. R.; Assis, O. B. G. *In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan choride salt agaist E. coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 2089-2092, 2010.

Spinelli, V. A. *Quitosana, polieletrólito natural para tratamento de água potável*. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 134 p., 2001.

Stössel, O. and Leuba, J. L. *Effect of Chitosan, Chitin and some Aminosugars on Growth of Various Soilborne Phytopathogenic Fungi*. **Journal of Phytopathology**, v. 111, p. 82-90, 1984.

Stumpf, P. K. and Green, D. E. *L-Amino Acid Oxidase of Proteus vulgaris*. The **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p. 387-399, 1944.

Sudarshan, N. R.; Hoover, D. G. and Knorr, D. *Antibacterial action of chitosan*. **Food Biotechnology**, v.6, p.257-272, 1992.

Tan, S. C.; Khor, E.; Tan, T. K.; Wong, S. M. *The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination*. **Talanta**, v.45, p.713-719, 1998.

Tin, S.; Sakharkar, K. R.; Lim, C. S.; Sakharkar, M. K. *Activity of Chitosans in combination with antibiotics in Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Biological Sciences**, v.5, p. 153-160, 2009.

Tortora G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. *Microbiologia*. Porto Alegre, **ArtMed**, 8^a ed., Capítulo 4, 2005.

Tripathi, S.; Mehrotra, G. K. and Dutta, P. K. *Chitosan based antimicrobial films for food packaging applications*. **E-Polymers**, v. 93, p. 1–7, 2008.

Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Tripathi, C. K. M.; Banerjee, B.; Joshi, A. K. and Dutta, P. K. *Chitosan based bioactive film: Functional properties towards biotechnological needs*. **Asian Chitin Journal**, v. 4, p. 29–36, 2008.

Tsai, G. J. and Hwang, S. P. *In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria*. **Fisheries Science**, v. 70, p. 675-681, 2004.

Tsai, G. J.; Su, W. H.; Chen, H. C. and Pan, C. L. *Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation*. **Fisheries Science**, v. 68, p.170-177, 2002.

Tsai, G. J.; Zhang, S. L. and Shieh, P. L. *Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 396-398, 2004.

Vu, K. D.; Hollingsworth, R. G.; Leroux, E.; Salmieri, S.; Lacroix, M. *Development of edible bioactive coating on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries*. **Food Research International**, v. 44, p. 198–203, 2011.

Wang, G. *Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, p. 916-925, 1992.

Young, D. H. and Kauss, H. *Release of Calcium from Suspension-Cultured Glycine max Cells by Chitosan, Other Polycations, and Polyamines in Relation to Effects on Membrane Permeability*. **Plant Physiology**, v.73, p.698-702, 1983.

Zago, J. A. A.; Ushimaru, P. I.; Barbosa, L. N.; Junior, A. F. *Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de Staphylococcus aureus e Escherichia coli isoladas de casos clínicos humanos*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p. 828-833, 2009.

Zheng, L.Y. and Zhu, J.F. *Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights*. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.527-530, 2003.

Zhong, Z. M.; Xing, R.; Liu, S.; Wang, L.; Cai, S. B. and Li, P. C. *Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro*. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 566–570, 2008.

Zivanovic, S.; Basurto, C. C.; Chi, S.; Davidson, P. M. and Weiss, J. *Molecular Weight of Chitosan Influences Antimicrobial Activity in Oil-in-Water Emulsions*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 952-959, 2004.