

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA QUITOSANA FÚNGICA

Wesley de Souza Paiva

Graduado em Biotecnologia/UFERSA/RN
wdsipaiva@gmail.com

Francisco Ernesto de Souza Neto

Graduado em Biotecnologia/UFERSA/RN
fernestosn@gmail.com

Anabelle Camorotti de Lima Batista

Doutora em Biotecnologia/RENORBIO/PE
abatista@ufersa.edu.br

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos tem selecionando micro-organismos resistentes a drogas antibacterianas, exigindo a investigação e desenvolvimento de novos medicamentos. Devido a isso, a quitosana fúngica foi utilizada como um novo composto antibacteriano, verificando também o tempo de contato necessário para sua eficácia. Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* ATCC 11775 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em contato com quitosana fúngica 94% desacetilada, obtida do fungo edáfico *Cunninghamella elegans* crescido em meio YPD (Extrato de levedura, peptona e dextrose). A quitosana é um biopolímero solúvel em pH inferior a 6,5, por este motivo, todos os testes foram realizados em meio de cultura de ágar nutritivo (AN), a pH 5,5. Para atividade antibacteriana, alíquotas de 1 mL de gel de quitosana a 1,5% (m/v) e ácido acético a 0,25% (v/v) foram distribuídas em tubos cônicos, seguido da adição 100 µl de cultura bacteriana (10^6 células/mL para *E. coli*) e (10^5 células/mL para *S. aureus*) e incubadas a 37°C nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos. Subsequentemente, as amostras cultivadas em placas de AN foram incubadas a 37°C durante 24 e 48 horas. A inibição do crescimento foi observada em todas as amostras tratadas com quitosana fúngica em todos os tempos de contato, evidenciando assim a sua atividade.

Palavras-chave: Agentes Antibacterianos; Quitosana Fúngica; Inibição.

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics is selecting resistant to antibacterial drugs microorganisms, requiring research and development of new drugs. Because of this, the fungal chitosan was used as a new antibacterial compound, also checking the contact time necessary for its effectiveness. Were used *Escherichia coli* ATCC 11775 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, in contact with fungal chitosan 94% deacetylated, obtained from the soil fungus *Cunninghamella elegans* grown in YPD (yeast extract, peptone and dextrose). Chitosan is a biopolymer soluble at a pH below 6.5, therefore, all tests were performed in culture medium nutrient agar (NA) at pH 5.5. For antibacterial activity, 1 mL aliquots of chitosan gel at 1.5% (w / v) and acetic acid 0.25% (v / v) were distributed in conical tubes, followed by addition of 100 µl bacterial culture (10^6 cells / mL for *E. coli*) and (10^5 cells / mL for *S. aureus*) and incubated at 37°C in the times of 5, 10, 15 and 20 minutes. Subsequently, samples grown in NA plates were incubated at 37°C for 24 to 48 hours. The growth inhibition was observed in all samples treated with fungal chitosan at all contact times. Thus demonstrating its activity.

Keywords : Antibacterial Agents; Fungal Chitosan; Inhibition.

1. INTRODUÇÃO

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. É encontrada em maior quantidade na carapaça de crustáceos e exoesqueleto de insetos. O primeiro relato de isolamento de quitina foi em 1811 por Henri Braconnot, que trabalhou com isolados fúngicos e que a denominou de fungina. Já Odier em 1823 isolou uma substância insolúvel a partir de carapaça de insetos e a chamou de quitina, e também concluiu que essa substância seria o composto mais importante da constituição do exoesqueleto de insetos (SANDFORD et al, 1989).

A partir da quitina, por meio da desacetilação com álcalis ou enzimas, é obtido outro biopolímero, a quitosana, descrita em 1954 por Kreger, com uma análise de raio-x da estrutura da parede celular da levedura *Phycomyces blakesleeanus*. Assim como a quitina, a quitosana apresenta em suas unidades resíduos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina), e resíduos de amino-2-desoxi-D-glicose (N-acetil-glucosamina) (ARANAZ et al, 2010). A produção de quitosana por desacetilação enzimática da quitina não é a única forma de obtenção desse biocomposto, pois o mesmo atualmente é gerado em escala comercial pela desacetilação química da maior parte dos resíduos de N-acetil-D-glicosamina presentes na quitina extraída da carapaça de crustáceos (KUMAR, 2000). Como também é obtida naturalmente na parede celular de alguns fungos, em especial os pertencentes à classe Zygomycetes (KAFETZOPOULOS et al, 1993).

A produção de quitina e quitosana, a partir da biomassa micelial de fungos da classe dos Zygomycetes, vem a ser uma alternativa sustentável, devido a presença do grupamento amina sendo considerada como o polímero do futuro por apresentar uma vasta possibilidade de aplicações (ARANAZ, 2010).

Ao se trabalhar com biopolímeros, é necessário caracterizar suas propriedades físico-químicas, dentre elas, o grau de desacetilação (MILIOLI, 2011). O grau de desacetilação é uma propriedade importante para diferenciar quitina e quitosana. Ao se aproximar do grau de desacetilação de 50%, a quitina se torna solúvel em solução aquosa ácida e passa a ser quitosana (RINAUDO, 2006), que possui um grau de desacetilação variando entre 66 e 95% (AGNIHOTRI et al, 2004).

Atualmente a quitosana tem sido alvo de muitos estudos, pois suas propriedades conferem a ela um amplo espectro de utilização. Sabe-se que a indústria cosmética, alimentícia, biotecnológica e farmacêutica, tem utilizado esse biopolímero em seus diversos produtos, gerando grandes rendimentos para essas empresas, visando a redução de impacto ambiental gerado pelos resíduos e por consequência o aumento dos lucros (AZEVEDO et al, 2007; COSTA SILVA et al, 2006; MENDES et al, 2011).

Outra alternativa para a uso da quitosana fúngica, é como agente antibacteriano. Essa propriedade vem sendo evidenciada por diversos estudos (BATISTA et al, 2011; KIM et al, 2011; HOLAPPA et al, 2006), surgindo como uma possível alternativa frente aos antibacterianos de origem sintética comumente utilizados. Devido a isso, o presente trabalho tem por objetivo a extração da quitosana fúngica a partir do fungo *Cunninghamella elegans*, e o teste da atividade antibacteriana deste biopolímero.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo fúngico

A quitosana fúngica, foi obtida a partir de *Cunninghamella elegans*, gentilmente cedida pelo laboratório de biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), cultivado em meio YPD (extracto de levedura 10 g; peptona bacteriológica 20 g; glucose 20 g; água destilada 1000 ml), por 7 dias a 28°C .

2.2 Extração da quitosana fúngica

Após o cultivo fúngico foi iniciado o processo de extração de quitosana. Os esporos coletados e armazenados com 15 mL de água destilada esterilizada (solução esporica), 10^5 esporos/mL da solução esporica foram adicionados em meio líquido YPD para crescimento da biomassa fúngica a 28°C por 96 horas. Ao término dos 4 dias de agitação a biomassa foi filtrada, seca em estufa a 60°C, macerada em cadinho visando o aumento da superfície de contato, característica necessária nas próximas etapas, e pesada em balança analítica. Em seguida, a biomassa foi tratada numa proporção de 1:40 (m/v) de NaOH (Hidróxido de sódio) à 1M, onde foi colocada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após essa fase, foram realizados ciclos de centrifugações de 15 minutos a 4000 rpm, até atingir pH 7,0, sendo descartado o sobrenadante a cada ciclo.

Na última etapa da extração da quitosana, foi feita a precipitação em ácido acético 1%, na proporção de 1:100 (m/v). Essa solução foi colocada em autoclave no modo vapor fluente a 100°C por 15 minutos, seguido por uma única centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Ao final da centrifugação pôde-se perceber a separação da quitina, o precipitado, e a quitosana, o sobrenadante. O sobrenadante foi ajustado para pH 10, e deixado *over night* à aproximadamente 4°C em geladeira, levando a uma formação da nuvem de quitosana. Por fim, centrifugado a 4000 rpm, sendo o precipitado coletado, liofilizado e guardado em ambiente com umidade regulada (HU et al, 1999).

2.3 Caracterização da quitosana

Para medir o grau de desacetilação da quitosana, foi utilizada a técnica de titulação potenciométrica, devido a sua simplicidade e precisão. A titulação foi realizada com a utilização de um titulador automático, foram adicionados 40 mL de HCL 0,1 mol L⁻¹ para obter uma boa dispersão do adsorvente, como também a protonação dos grupos amino da quitosana analisada. A força iônica foi mantida com KCL 0,1 mol L⁻¹, o agente titulante utilizado foi KOH 0,1 mol L⁻¹ (SIGNINI; CAMPANA FILHO 1998).

2.4 Teste da microgota

A concentração inicial dos micro-organismos foi realizada através da técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). Os inóculos iniciais *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram cultivados em meio de cultura BHI (*brain heart infusion*) a 37°C por 24 horas e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura AN com pH 5.5. A partir do inóculo inicial foram realizadas as diluições seriadas, transferindo-se para tubos cônicos 0,900 mL de salina com 0,3% Tween 80, e 0,100 mL do inóculo inicial para obter uma diluição de 10⁻¹, realizando esse procedimento sucessivamente até chegar a diluição de 10⁻⁸. Posteriormente, utilizando micropipetas e placas de Petri divididas em 4 quadrantes, foram transferidas quatro gotas de cada diluição para cada um dos quadrantes da placa de Petri, cada gota sendo de 10 µl. As placas foram postas em estufa de incubação aeróbia a 37°C por 24 horas, e em seguida foi realizada a contagem dos micro-organismos. O valor final a ser considerado leva em conta à média das contagens das gotas quadruplicadas e avaliação segundo o método biométrico de Cavalli-Sforza (1974).

2.5 Teste de atividade antibacteriana

Para o teste da atividade antibacteriana, foram utilizados 900 µl do gel de quitosana a 1,5% (m/v) e ácido acético a 0,25% (v/v) (TAO et al., 2011), distribuídas em tubos cônicos. Em sequência foram adicionados 100 µl de cultura bacteriana (10⁻⁶ células/mL para *E. Coli*) e (10⁻⁵ células/mL para *S. aureus*). As diluições foram definidas através da leitura dos resultados do teste da microgota que preconiza uma média de 100 colônias por microgota. Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C em quatro tempos pré-

estabelecidos: 5, 10, 15 e 20 minutos. Após a incubação com a quitosana, as amostras de cada tempo foram semeadas em placas com meio AN e incubadas novamente a 37°C sendo observadas após 24 e 48 horas. No grupo controle as culturas foram tratadas com ácido acético na mesma concentração utilizada para a solubilização da quitosana (0,25% (v/v)).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a quitosana com grau de desacetilação de 94%, mostrou possuir uma atividade antibacteriana eficaz, concordando com os resultados de Batista et al. (2011), que utilizou gel de quitosana com desacetilação de 94% em *S.aureus* isoladas de bovinos com mastite e *E. coli* ATCC, testando a ação da quitosana em diferentes tempos, onde a maior inibição ocorreu no tempo de 5 horas. Já Bento et al. (2009) utilizou quitosana fúngica extraída do fungo *Mucor rouxii* com grau de desacetilação de 85% e a atividade antibacteriana ocorreu no tempo mínimo de 4 horas, comprovando que quanto mais desacetilada, mais rápida é a ação da quitosana como antibacteriano. Outros estudos também confirmam a relação entre o alto grau de desacetilação e uma maior ação antibacteriana (XIAO et al. 2011; LIU et al. 2004; TAO et al., 2011).

O mecanismo de ação da quitosana frente aos micro-organismos, difere entre as bactérias gram positivas e gram negativas. Segundo resultados de Lifeng et al. (2004), na presença de quitosana a membrana das gram positivas é fragmentada, enquanto nas gram negativas o citoplasma se concentra, e o espaço intracelular é ampliado. A pesquisa Olsen et al. (1989) relatou que os grupos amínicos da quitosana em contato com os fluidos intracelulares são protonados e se ligam fortemente aos grupos aniônicos dos micro-organismos, o que aumenta o processo de aglutinação entre eles, impedindo seu desenvolvimento.

A inibição do crescimento foi notada em todas as amostras tratadas com quitosana em todos os intervalos de tempo como observado na figura 1 (A,C), ao passo que as amostras tratadas apenas com ácido acético cresceram normalmente em todos os intervalos de tempo, como exposto na figura 1 (B, D). Esses resultados vão contra os resultados apresentados por Ortega-Órtiz et al. (2010) que utilizou um inóculo inicial de concentração de 10^9 células/mL e uma quitosana com grau de desacetilação de 88%, obtendo uma taxa de inibição bacteriana de apenas 70%. O presente estudo demonstra o potencial da atividade antibacteriana da quitosana fúngica com grau de desacetilação elevado em até 48 horas de crescimento em meio de cultura, e depois de 5 minutos do contato das bactérias com o gel de quitosana.

Em comparação com a quitosana extraída de crustáceos, as pesquisas de Oliveira e Nunes (2011) obtiveram uma quitosana de crustáceo com grau de desacetilação de apenas 67%, após todos os procedimentos para obter a quitana e posteriormente a quitosana, esses resultados, geraram uma ação mediana no controle de micro-organismos deteriorantes do cajú, além de uma grande quantidade de geração de resíduos, evidenciando ainda mais as vantagens da quitosana fúngica.

No presente estudo, o tempo mínimo pra ação antimicrobiana da quitosana foi de 5 minutos, demonstrando o grande potencial desse polissacarídeo no combate aos micro-organismos patogênicos, evidenciando a eficácia da quitosana fúngica como uma possível nova droga natural contra as infecções bacterianas.

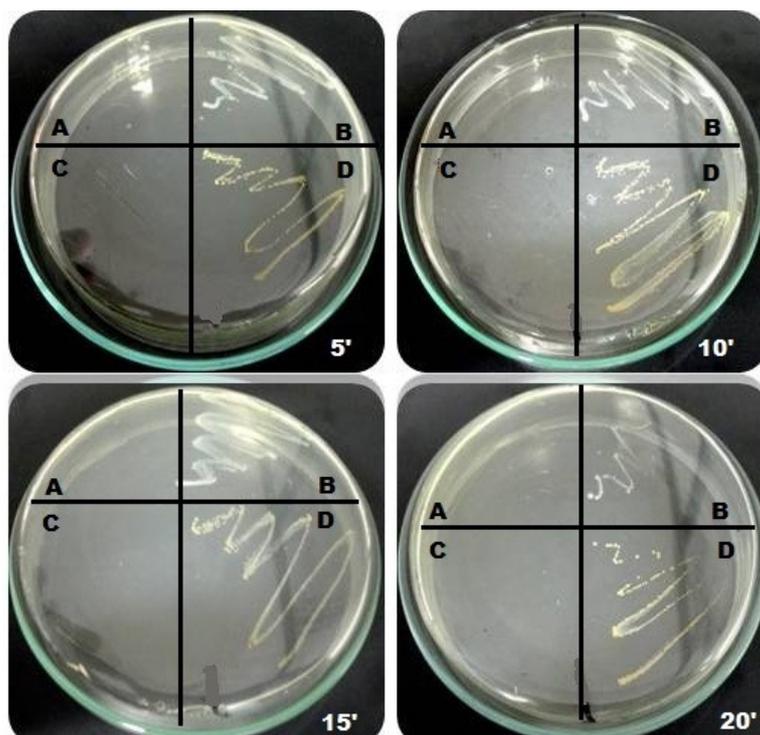


Figura 1: Atividade antibacteriana da quitosana fúngica contra os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC em diferentes tempos de contato, após 48 horas de incubação. A – *E.coli* tratada com gel de quitosana fúngica; B – *E.coli* tratada apenas com ácido acético; C – *S.aureus* tratada com gel de quitosana fúngica; D – *S.aureus* tratada apenas com ácido acético.

4. CONCLUSÃO

Pode-se perceber com o referente trabalho, a efetiva ação da quitosana fúngica como antibacteriano natural contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC. Sendo esta, por sua vez, uma alternativa viável a quitosana de crustáceo, pois depende de um processo menos dispendioso para a obtenção deste biopolímero biotecnológico.

Como também como uma possível alternativa aos antibacterianos convencionais, amortizando a cadeia de processos de resistência microbiana, consequentemente reduzindo a geração de resíduos químicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. S.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 10, p. 5-28, 2004.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS, A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. *Chemistry and Applications. Current Organic Chemistry*, v. 14, p.308-330, 2010.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 2.3, p. 27-34, 2007.

BATISTA, A.C.L.; DANTAS, G.C.; SANTOS, J.; AMORIM, R.V.S. Antimicrobial Effects of Native Chitosan against Opportunistic Gram-negative Bacteria. *Microbiology Journal*, v.1, p.105-112, 2011.

BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E.L. Potential of Chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as Alternative Natural Compound to Inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.583-589, 2009.

CAVALLI-SFORZA L. *Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)*. Stuttgart: Gustav Fisher, 1974. p. 201-4.

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.

HU, K-J.; YEUNG, K.W.; HO, K.P.; HU, J.L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry*, v. 23, p.187-196, 1999.

HOLAPPA, J.; HJÁLMASSDOTTIR, M.; MÁSSON, M.; RÚNARSSON, Ö.; ASPLUND, T.; SOININEN, P.; NEVALAINEN, T.; JARVINEN, T. Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. *Carbohydrate. Polymers*, v. 65, p.114–118, 2006.

KAFETZOPOULOS, D.; MARTINO, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p.2564-2568, 1993.

KIM, K.W.; MIN, B.J.; KIM, Y-T.; KIMMEL, R.M.; COOKSEY, K.; PARK, S.I. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT - Food Science and Technology*, v.44, p.565-569, 2011.

KREGER, D. R. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica at Biophysica Acta*, v.13, p.1-9, 1954.

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

LIFENG Q.; ZIRONG X.; XIA J.; CAIHONG H.; XIANGFEI Z. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 2693-2700, 2004.

LIU, H.; DU, Y. M.; YANG, J. H.; ZHU, H. Y. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betain derivative complex. *Carbohydrate Polymers*, v. 55, p. 291–297, 2004.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011.

MILIOLI, K.; YAMAMURA, K.; YANO, K.; OSADA, T.; SAEKI, S.; TAKIMOTO, N.; SAKURAI, T.; NIMURA, Y. Effect of chitosan film containing basic fibroblast growth factor on wound healing in genetically diabetic mice. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 64A, p. 177-181, 2003.

- ORTEGA-ORTIZ, H.; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, B.; CADENAS-PLIEGO, G.; JIMENEZ, L.I. Antibacterial activity of chitosan and the interpolyelectrolyte complexes of poly(acrylic acid)- chitosan. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.53, p. 623-628, 2010.
- OLIVEIRA, B. S., NUNES M. L. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. *Scientia Plena*. v. 7, p. 01-06, 2011
- OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. "Biomedical applications of chitin and its derivatives," in *Chitin and Chitosan*, G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, and P. Sandford, Eds., pp. 813–828, Elsevier Applied Science, London, UK, 1989.
- RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHAMED, N. S. Extraction, characterization, and nematocidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils*., v. 48, p.463–468, 2012.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.
- ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, p.279, 2001.
- SANDFORD, P. A.; ANTHOSSEN, T.; SKJAK-BRAEK, G. Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. London: Elsevier, p.853, 1989.
- SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S.P.; Purificação e Caracterização de quitosana comercial. *Polímeros*, v.8, p. 63-68, 1998.
- TAO Y, QIAN L.-H., XIE J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p.969–974, 2011.
- XIAO, B.; WAN, Y.; ZHAO, M.; LIU, Y.; ZHANG, S. Preparation and characterization of antimicrobial chitosan-N-arginine with different degrees of substitution. *Carbohydrate Polymers*. v.83, p.144-150, 2011.