

# **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE GELATINA E QUITOSANA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

**Fernanda Saraiva Gomes Brazeiro**<sup>1</sup>

**Jaqueline Motta de Moura**<sup>2</sup>

**Luciano Almeida**<sup>3</sup>

**Caroline Costa Moraes**<sup>4</sup>

**Catarina Motta De Moura**<sup>5</sup>

## **Resumo:**

A pesquisa relacionada a essas embalagens vem crescendo, devido ao aumento de doenças transmitidas por alimentos provenientes de micro-organismos patógenos, o que levou a incorporação de agentes antimicrobianos nos filmes, ou seja, embalagens com atividade antimicrobiana. Com o intuito de interagir favoravelmente com os alimentos, são elaborados revestimentos comestíveis para aumentar sua vida útil, como filmes de gelatina. Estes filmes têm potencial para reduzir o uso de polímeros sintéticos tradicionais. A gelatina tem sido um dos biopolímeros mais estudados na elaboração de filmes flexíveis, porém é necessário a adição de algum outro componente uma vez que os filmes de proteínas são muito sensíveis às condições ambientais. A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina, é um polímero de elevado peso molecular que está presente na composição do exoesqueleto de crustáceos, insetos e também na parede celular de fungos. Devido a evitar ou retardar a deterioração microbiana de alimentos, a quitosana e seus derivados. A atividade antimicrobiana da quitosana está relacionado à formação de complexos polieletrólitos, uma vez que seus grupos amínicos protonados se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares. Conforme a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, é realizada para verificar a presença de micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, Coliformes termotolerantes, *Bacillus cereus* nos alimentos. O presente trabalho tem como objetivo a elaboração de filmes com gelatina e quitosana e realizar sua atividade antimicrobiana na bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* no filé de peixe de Tilápia obtida no mercado local. Os filmes foram elaborados segundo a técnica Casting. Para as análises microbiológicas realizaram-se através do método Food and Drug Administration (FDA) descrito no Bacteriological Analytical Manual (BAM). Para o filme a base de gelatina podemos observar que não houve crescimento de *Staphylococcus aureus*, ou seja, não houve um turvamento característico da presença do micro-organismo. Já para filme de quitosana, o resultado obtido também foi positivo,

comprovando sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Conclua-se que os filmes elaborados possuem uma atividade antimicrobiana notável e satisfatória contra o micro-organismo patogênico *Staphylococcus aureus* presente nos alimentos devido à falta de higiene dos meios de produção. Já para o filme de gelatina com quitosana, há um grande potencial devido a quitosana ser um agente antimicrobiano natural, ou seja, possível potencial para estudos futuros.

**Palavras-chave:** Biofilme, antimicrobiano, micro-organismos

**Modalidade de Participação:** Iniciação Científica

## **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE GELATINA E QUITOSANA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

<sup>1</sup> Aluno de graduação. fernanda.gbrazero@gmail.com. Autor principal

<sup>2</sup> Co-autor. jaquefurg@gmail.com. Co-autor

<sup>3</sup> Co-autor. almeidahades@gmail.com. Co-autor

<sup>4</sup> Co-autor. carolinecmoraes@gmail.com. Co-autor

<sup>5</sup> Docente. catarinamoura@unipampa.edu.br. Orientador

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES A BASE DE GELATINA E QUITOSANA CONTRA *Staphylococcus aureus*.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de filmes e revestimentos comestíveis vem se tornando de interesse, devido ao potencial para evitar a deterioração dos alimentos e pela característica de biodegradabilidade. Desta forma, tem-se produzido filmes à base de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídios (Villadiego et al., 2005).

A pesquisa relacionada a essas embalagens vem crescendo, devido ao aumento de doenças transmitidas por alimentos provenientes de micro-organismos patógenos, o que levou a incorporação de agentes antimicrobianos nos filmes, ou seja, embalagens com atividade antimicrobiana (Ferreira, 2014).

Com o intuito de interagir favoravelmente com os alimentos, são elaborados revestimentos comestíveis para aumentar sua vida útil, como filmes de gelatina. Estes filmes têm potencial para reduzir o uso de polímeros sintéticos tradicionais, que prejudicam o meio ambiente melhorando assim a qualidade dos alimentos. Novas concepções de embalagens ativas estão sendo criadas com incorporação de aditivos que possuam atividade antimicrobiana, como a quitosana, um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental (Brazeiro et al., 2017).

A gelatina tem sido um dos biopolímeros mais estudados na elaboração de filmes flexíveis, porém é necessário a adição de algum outro componente uma vez que os filmes de proteínas são muito sensíveis às condições ambientes. Filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteína (gelatina), possuem excelentes propriedades mecânicas e ópticas, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água, um fator importante quando relacionado com a vida útil do alimento. A gelatina é um hidrocolóide extremamente versátil, produzido em abundância e de baixo custo, além de possuir propriedades funcionais interessantes. Para auxiliar em suas propriedades como flexibilidade, é necessário a inserção de plastificantes, como o glicerol (Alves, 2007).

A quitosana é obtida através da desacetilação da quitina, é um polímero de elevado peso molecular que está presente na composição do exoesqueleto de crustáceos, insetos e também na parede celular de fungos. Suas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas desde o início do século passado, devido a ser um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível. Entre suas propriedades, está a atividade antimicrobiana, decorrente em grande parte da presença de grupos amino livres nas unidades de glicosamina (Silva et al., 2015).

Devido a evitar ou retardar a deterioração microbiana de alimentos, a quitosana e seus derivados, vêm sendo estudados como agentes antimicrobianos e tem se mostrado em grande potencial em decorrência de pesquisas cuja a quitosana apresenta ser eficiente como antimicrobiano contra vários microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* (Fai et al., 2007).

A atividade antimicrobiana da quitosana está relacionado à formação de complexos polieletrólíticos, uma vez que seus grupos amínicos protonados se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares (Fai et al., 2007). Esta atividade aumenta de acordo com o peso molecular do polímero contra bactérias gram positivas, pois quanto menor a massa molecular do polímero, maior será o potencial antimicrobiano. Ou seja, nas bactérias gram positivas a quitosana de alto massa molecular age formando um filme em volta da célula que acaba por inibir a absorção de nutrientes. Já para as bactérias gram negativas, a quitosana de baixa massa molecular penetra

mais facilmente, ligando-se ao DNA, causando distúrbios no metabolismo celular (Fai et al., 2007).

Conforme a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que considerando a definição de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, indispensáveis para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, da aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) e da qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doença Transmitida por Alimentos (DTA), é realizada para verificar a presença de micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Coliformes termotolerantes*, *Bacillus cereus* no alimento.

O presente trabalho tem como objetivo a elaboração de filmes com gelatina e quitosana e realizar sua atividade antimicrobiana na bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* no filé de pescada de Tilápia obtida no mercado local.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Elaboração dos filmes

Os filmes foram elaborados segundo a técnica *Casting*, onde preparou-se um filme controle de gelatina e outro filme com gelatina adicionado de quitosana, conforme mostra a Figura 1.

Figura 1: Fluxograma da produção dos filmes.



Fonte: Autores, 2018.

Para elaboração do filme de gelatina pesou-se 1,8 g<sub>ss</sub> de gelatina comercial de pescada (*Sigma Aldrich*), que foram dissolvidas em 50 mL de água destilada. Em seguida adicionou-se 0,2 g de glicerol e o pH ajustado a 4,0 com solução de NaOH de 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Agitou-se a solução a 600 rpm durante 2 horas. Após verteu-se a solução em placas de plexi glass e foi levado à estufa à 40 °C durante 24 horas. Já para a elaboração do filme de gelatina com quitosana diissolveu-se 0,20 g<sub>ss</sub> de quitosana em 20 mL de solução de ácido acético (0,10 mol L<sup>-1</sup>) sob agitação constante de 600 rpm num agitador magnético (Mars, MAG01H, São Paulo, Brasil) por 2 horas. Em seguida, adicionou-se 30 mL de solução de gelatina de pescada e 0,20 g de glicerol. O pH da solução foi ajustado para 4,0 usando NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup>. Assim, a massa total de sólido seco em cada filme é de 2 g. Agitou-se a solução a 600 rpm durante 2 horas. Após verteu-se a solução em placas de plexi glass e foi levado à estufa à 40 °C durante 24 horas.

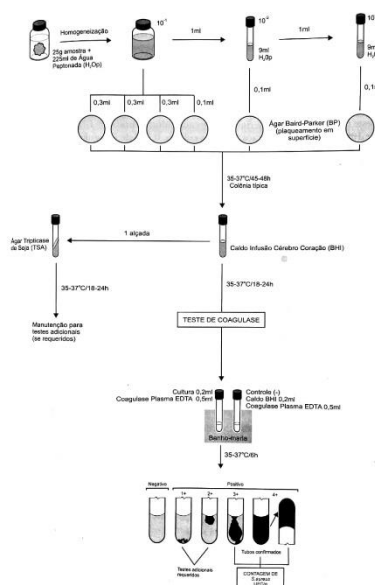
## 2.2 Acondicionamento dos filés de Tilápia

Para a realização das análises microbiológicas os filés de pescado foram acondicionados em placas de petri e envoltos com os filmes e levado a refrigeração por 24 horas, para posterior análise microbiológica.

## 2.3 Atividade antimicrobiana

As análises microbiológicas realizaram-se através do método *Food and Drug Administrations* (FDA) descrito no Bacteriological Analytical Manual (BAM), conforme Figura 2.

Figura 2: Bacteriological Analytical Manual (BAM).



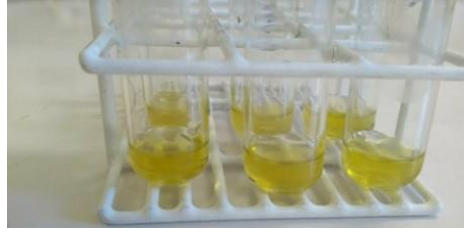
Fonte: Autores, 2018.

Conforme podemos observar a Figura 2, pesou-se 25 g da amostra e misturou-se com 225 mL de água peptonada. Após realizou-se as diluições de  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Em seguida foi realizado o plaqueamento em superfície em placas de petri contendo Ágar Baird-Parker (BP) com suas respectivas diluições. Após as placas foram inversamente incubadas na estufa na temperatura de 35/37 °C durante 45/48 horas. Após o período de encubação, transferiu-se as colônias típicas de cada diluição para o Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), logo o caldo foi levado para estufa na temperatura de 35/37 °C durante 18/24 horas. Após esse período na estufa, realizou-se o teste da Coagulase, onde colocou-se 0,2 mL do Caldo BHI no plasma EDTA e 0,2 mL da cultura no plasma EDTA, em seguida foram levados em banho-maria na temperatura de 35/37 °C durante 6 horas. Após o banho, notou-se se houve ou não turvamento na amostra presente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostra a Figura 3 (filme de gelatina), podemos observar que não houve crescimento de *Staphylococcus aureus*, ou seja, não houve um turvamento característico da presença do micro-organismo. Isso se dá devido a todo cuidado acético que ocorreu com as análises realizadas.

Figura 3: Plasma EDTA (filme de gelatina).

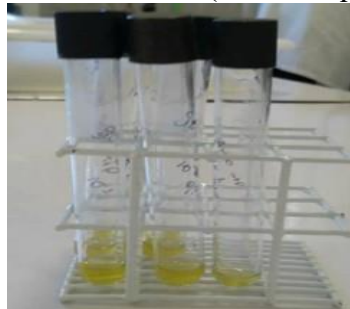


Fonte: Autores, 2018.

Segundo Brandalise (2017) diversos fatores afetam o desenvolvimento do crescimento microbiano, dentre eles o pH. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho para a gelatina de pescado uma vez que seu pH ajustado na formulação do filme. Segundo Oliveira e Bezerra (2015), que encontraram inibição para vários micro-organismos patogênicos como *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus* com filme de gelatina obtida a partir de resíduos da indústria pesqueira.

Ainda podemos observar na Figura 4 (filme de quitosana) que para o filme de gelatina com quitosana, o resultado obtido também foi positivo comparado com Rodrigues et al., onde encontrou para o a solução filme/quitosana valor de CIM (concentração inibitória mínima) de  $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , comprovando sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Figura 4: Plasma EDTA (filme de quitosana).



Fonte: Autores, 2018.

Tal resultado foi semelhante com o encontrado Bonilla e Sobral (2016), onde obtiveram resultados contra *S. aureus* e *E.coli* significativos utilizando filmes de quitosana e gelatina incorporados com óleo de alecrim. Fan et al. (2009), ao estudarem os efeitos do revestimento de quitosana sobre a qualidade e vida útil da carpa prateada durante o armazenamento por congelamento, obtiveram resultados significativos para inibição do micro-organismo analisado.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclua-se que os filmes elaborados possuem uma atividade antimicrobiana notável e satisfatória contra o micro-organismo patogênico *Staphylococcus aureus* presente nos alimentos devido à falta de higiene dos meios de produção.

Já para o filme de gelatina com quitosana, há um grande potencial devido a quitosana ser um agente antimicrobiano natural, ou seja, possível potencial para estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- BRANDALISE, E. B., **Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Gelatina Recuperada de Resíduo do Couro curtido ao Cromo (III) com Tratamento Enzimático.** Universidade de Caxias do Sul, 2017.
- ANVISA. Resolução - RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.** 2001.
- ALVES, M. S. **Obtenção e Caracterização de Biofilmes de Gelatina.** Iniciação Científica; (Graduando em Engenharia Química) - Universidade Metodista de Piracicaba, 2007.
- ANDREWS W. H; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online. Cap. 5, 2007. Disponível em: . Acesso em: 16 jun. 2017.
- BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. A. Investigation of the physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan edible film mixed with plant ethanolic extracts. *Food Bioscience*, 16, 17-25, 2016.
- BRAZEIRO, F. S. G., MOURA, C. M., MORAES, C. C., ALMEIDA, L. **Atividade Antimicrobiana de Filmes de Gelatina de Pescado contendo Quitosana.** Urcamp Bagé - RS, 2017.
- FAI, A. E. C., STAMFORD, T. C. M., TÂNIA, L. M. S. **Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos.** Revista Ibero americana de Polímeros Volumen 9(5), Julio, 2008.
- FAN, W., SUN, J., CHEN, Y., QIU, J., ZHANG, Y., CHI, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silvercarp during frozen storage. *Food Chemistry*, v. 115, p. 66-70, 2009
- RODRIGUES, M. A. V., MARANGON, C. A., LEITE, P. M. F., MARTINS, V. C. A., NITSCHKE, M., PLEPIS, A. M. G. Emulsões de Quitosana/Gelatina com Óleos de Andiroba e de Pracaxi: Avaliação da Atividade Antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*.
- OLIVEIRA, R. M. V. V., BEZERRA, R. S. Desenvolvimento e Caracterização de um Hidogel de Gelatina Obtida de Resíduos da Indústria Pesqueira. UFPE, 2015.
- SILVA, M. G., SILVA, S. B., SILVA, J., SANTIN, C. K., SOUZA, D., FROTA, M. JR. **Caracterização de Filmes à base de quitosana.** Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Escola Politécnica, Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2015.
- VILLADIEGO, A. M. D., SOARES, N. F. F., ANDRADE, N. J., PUSCHMANN, R., MINIM, V. P. R., CRUZ, R. Filmes e Revestimentos Comestíveis na Conservação de Produtos Alimentícios. *Revista Ceres*, 52(300):221-244, 2005.

