

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DE MEMBRANAS DE QUITOSANA MODIFICADAS COM COBRE E PRATA

Ellen M. Carvalho¹; Zilvam M. Santos²; Izabelly L. Lucena³, Késia K. V. de Castro⁴; Mônica R. de Oliveira⁵, Igor M. Jales⁶.

^{1,2,3,4,5,6} Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Campus Mossoró.

Palavras-Chave: Quitosana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

Introdução

Polímeros são materiais formados por cadeias moleculares repetitivas, que podem ser orgânicas ou sintéticas. Essas cadeias conferem aos polímeros características como resistência à corrosão e baixa densidade, além de uma flexibilidade que permite sua aplicação em diversas áreas (Anastácio, 2015). A quitosana é um biopolímero derivado da desacetilação da quitina, encontrada em exoesqueletos de crustáceos, como camarões e caranguejos, sendo o segundo polímero natural mais abundante no mundo (R. Spin Neto et al., 2008). A produção de quitosana ocorre quando a quitina é submetida a uma solução de hidróxido de potássio, quebrando as ligações N-acetil e gerando D-glicosamina, que precisa ter um grau de desacetilação superior a 50% para ser considerada quitosana (Queiroz Junior, 2017).

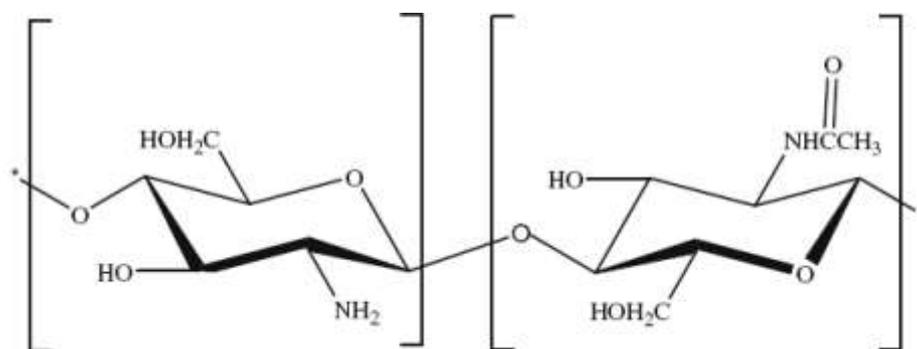


Figura 1: Estrutura química da Quitosana (Santos, 2009).

A quitosana possui várias propriedades que a tornam ideal para diferentes aplicações: é atóxica, biodegradável e biocompatível. Esse biopolímero tem usos em áreas como purificação de água, processamento de alimentos, liberação controlada de medicamentos e inibição de colônias bacterianas (Paiva, 2009). Além disso, é economicamente relevante, pois é derivada de resíduos da indústria pesqueira, sendo amplamente utilizada na fabricação de membranas (Dallan, 2005). Por apresentar grupos amino livres, a quitosana interage bem com metais pesados, sendo eficaz na remoção de metais de efluentes industriais, devido à sua alta capacidade de adsorção. A incorporação de metais como cobre e prata às membranas de quitosana amplia sua funcionalidade, especialmente para fins antimicrobianos (R. A. Taring et al., 2014).

O cobre é essencial para a vida humana, com uma média de 100 mg presente no organismo adulto, mas quantidades superiores podem ser tóxicas. Ele é utilizado em diversos processos industriais e possui grande importância biológica (Coelho, 2006). Suas propriedades antimicrobianas se devem à sua capacidade de alternar estados de oxidação, facilitando a doação e aceitação de elétrons, o que interfere no crescimento de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e vírus (Paiva, 2009). A prata, por sua vez, tem sido usada como agente antimicrobiano por séculos. Seus íons possuem atividade bacteriostática e são amplamente empregados devido à alta área superficial e às propriedades físico-químicas que conferem maior eficácia na inibição de microrganismos (Pereira, 2017). Sua ação antimicrobiana é superior à de metais como cobre, mercúrio e chumbo, sendo frequentemente utilizada em curativos para prevenir infecções (Cardoso et al., 2011). A incorporação de metais em membranas biopoliméricas, como a quitosana, abre novas possibilidades para a criação de materiais com propriedades antibacterianas. Estudos mostram que a presença de íons de cobre e prata nas membranas é essencial para garantir a atividade antimicrobiana (Paiva, 2009; Goldol, 2013).

Para avaliar a eficácia dessas membranas contra o crescimento bacteriano, é importante identificar os microrganismos que elas conseguem inibir. Um exemplo é a *Escherichia coli*, bactéria patogênica que causa infecções intestinais e extraintestinais, sendo um problema grave em países em desenvolvimento, onde contribui para altas taxas de mortalidade infantil (Silva, 2005). Essa bactéria pode provocar doenças agudas em humanos e animais (Guth, 2000). Outro microrganismo importante é o *Staphylococcus aureus*, encontrado no corpo humano, particularmente em áreas como o nariz, garganta e pele. Ele representa um risco considerável para pessoas com doenças como diabetes ou HIV, podendo causar infecções graves em feridas cirúrgicas. A resistência desse patógeno a antibióticos é um desafio crescente, especialmente em casos de tratamento inadequado (Santos, 2007).

O crescimento bacteriano só ocorre em ambientes adequados, fornecidos pelos meios de cultura, que proporcionam os nutrientes necessários. Os meios de cultura são específicos para diferentes tipos de bactérias e são essenciais para o método de disco-difusão, um teste qualitativo utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias. Nesse teste, discos impregnados com agentes antimicrobianos são colocados sobre o meio de cultura, e a presença de halos de inibição ao redor dos discos indica a eficácia do agente testado (ANVISA, Interpretação de dados microbiológicos). O Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) é amplamente utilizado para determinar a eficácia de antimicrobianos. Nesse método, utiliza-se o ágar Mueller Hinton, recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por sua alta precisão na determinação de suscetibilidade bacteriana (ANVISA. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão). O teste é fundamental para determinar a sensibilidade de bactérias a diferentes antibióticos e para orientar o tratamento de infecções.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia de membranas de quitosana modificadas com sais de cobre e prata na inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A aplicação dessas membranas em sistemas antimicrobianos pode contribuir para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades bactericidas, úteis em áreas como a medicina e a purificação de água.

Material e Métodos

Reagentes e equipamentos

Foi utilizada a quitosana (massa molar viscosimétrica média de $2,38 \times 10^5$ g/mol), produzida pela Polymar Ltda, com grau médio de desacetilação de 97,3%, determinado por titulação condutimétrica seguindo a metodologia descrita por (Santos, 2009). Outros reagentes incluíram: Hidróxido de Sódio (99%, VETEC Brasil), Ácido Acético (99,7%, VETEC Brasil), Nitrato de Prata (CRQ Produtos Químicos), Sulfato de Cobre II (98%, Dinâmica Química), Ágar MacConkey, Ágar Mueller Hinton e Ágar Sangue. Os equipamentos utilizados incluíram Swab estéril para coleta de amostras, Alça descartável estéril de 10 μ L, Estufa de cultura bacteriológica (ECB – Linea) e Capela de fluxo laminar (TROX Technik).

Teor de Sólidos

A quantidade de água presente na quitosana foi determinada pelo teor de sólidos. Amostras foram pesadas e levadas à estufa a 120-125 °C, até se obter uma massa constante. O teor de sólidos foi calculado pela equação (1):

$$Ts (\%) = \frac{mc}{mo} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde $Ts (\%)$ é o teor de sólidos, mc é a massa constante e mo a massa inicial.

Espessura das membranas

As espessuras das membranas foram medidas com um micrômetro externo (Mitutoyo, 0-25 mm), obtendo-se uma espessura média de 0,0405 mm.

Preparação das Membranas de Quitosana

As membranas de quitosana foram preparadas dissolvendo-se quitosana 2% (m/v) em ácido acético 2% (m/v), sob agitação magnética por 24h. Após completa solubilização, a solução foi filtrada e 120 mL foram distribuídos em placas acrílicas (30 x 15 cm), sendo secas em estufa a 50 °C por 48h (Figura 2). A neutralização foi feita com NaOH 2% (m/v) por 2h, seguida de lavagens com água destilada. As membranas foram cortadas em quadrados e depois em discos de 6 mm de diâmetro.



Figura 2: Membrana de Quitosana. (Autoria própria).

Membranas com Metais

Membranas foram impregnadas com metais ao serem imersas em soluções de Nitrato de Prata e Sulfato de Cobre (1 g/L) por 24h (Figura 3). Após secagem à temperatura ambiente, as membranas foram cortadas em discos de 6 mm.



Figura 3: Membranas de Quitosana com metais: AgNO_3 e CuSO_4 , respectivamente (Autoria própria).

Identificação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para isolar *Escherichia coli*, amostras de urina humana foram coletadas com uma Alça Descartável (10 μL), diluídas em 1 mL de soro fisiológico e transferidas para Ágar Sangue com um Swab Estéril. Após incubação a 36 °C por 24h, as bactérias foram submetidas a testes adicionais, incluindo cultivo em Ágar MacConkey e Teste de Oxidação e Fermentação (O/F).

Para identificar *Staphylococcus aureus*, as colônias foram cultivadas em Ágar Sangue (Figura 4). O teste de catalase foi realizado adicionando H_2O_2 à colônia, verificando a formação de bolhas. O teste de coagulase confirmou a identidade da bactéria.



Figura 4: *Staphylococcus aureus* no meio de cultura Ágar sangue (Autoria própria).

Teste de Disco-Difusão

Após a identificação das bactérias, realiza-se o Antibiograma, ou Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA), para escolher o antibiótico mais eficaz. O teste usa o Ágar Mueller Hinton, onde são colocados discos antimicrobianos que formam halos de inibição.

A bactéria foi retirada com uma Alça Descartável de 10 μL (Figura 8), diluída em soro fisiológico, e transferida para o Ágar Mueller Hinton com um Swab Estéril (Figura 9). Discos de antibióticos, como Ciprofloxacina, Cefepime e Ampicilina para *Escherichia coli*, e Vancomicina, Tetraciclina e Rifampicina para *Staphylococcus aureus*, foram adicionados. Membranas de quitosana também foram testadas para verificar a formação de halos de inibição. Todos os discos foram incubados a 36°C por 24 horas, com a quitosana necessitando de um plástico rígido para manter sua regularidade no meio de cultura devido à umidade.

Resultados e Discussão

Teor de Sólidos

Com base nas massas inicial e final das amostras, foi possível calcular o teor de sólidos aplicando os valores na Equação (1). O valor obtido foi de 86,3%, o que determina a quantidade real de quitosana presente e utilizada no preparo das membranas. Esse valor é importante para assegurar a consistência no processo de fabricação das membranas, já que a quantidade de água residual pode influenciar na estrutura final e nas propriedades mecânicas do biopolímero.

Membranas de Quitosana com Metais

A quitosana contém grupos amino que facilitam a incorporação de íons metálicos, como cobre e prata. Esses grupos atuam como bases de Lewis, enquanto os metais funcionam como ácidos de Lewis, possibilitando a quelação dos metais com a quitosana (Silva, 2005). Esse processo ocorre porque os elétrons livres no nitrogênio e oxigênio do biopolímero permitem que ele interaja com ânions metálicos por troca iônica (Oliveira, 2011). A Figura 10 demonstra como acontece essa interação, a ligação do metal com o biopolímero faz com que a substância apresente maior aplicabilidade na sua função.

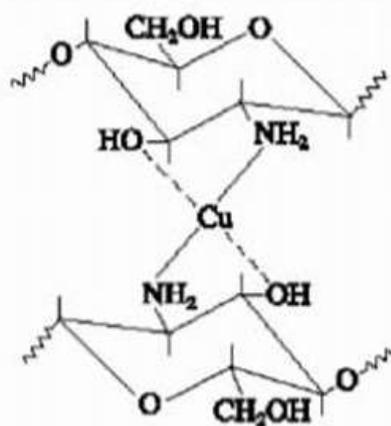


Figura 5: Interação do metal Cobre com a Quitosana (Oliveira, 2011).

A complexação dos metais com o biopolímero é um fator que pode aumentar sua aplicabilidade, especialmente em sistemas antimicrobianos. Embora o cobre tenha propriedades antimicrobianas reconhecidas, foi observada uma diferença significativa no desempenho quando comparado à prata. Isso pode ser explicado pela forma como esses metais interagem com as bactérias e pela sua capacidade de liberar íons que afetam diretamente as funções celulares dos microrganismos.

Avaliação da Capacidade Inibitória das Membranas de Quitosana

Para a avaliação da capacidade inibitória da estrutura, foi realizado o teste de disco-difusão como descrito no tópico 2.2.7. Nesse procedimento é possível verificar a formação ou ausência do halo de inibição. A membrana de quitosana pura e com sulfato de cobre, não obtiveram êxito nesse teste, não formaram halo de inibição, indicando que a estrutura não possui nenhuma capacidade inibitória contra as bactérias avaliadas neste estudo. A membrana de quitosana com nitrato de prata obteve formação de halo de inibição, formou-se 10 mm de halo no meio inserido com *Staphylococcus aureus* (Figura 6) e 13 mm de halo no meio inserido com *Escherichia coli* (Figura 7). É possível observar diante do Teste de Disco Difusão com os discos de antibióticos comparativos que a estrutura feita não atinge nível semelhante significativo do halo de inibição formado, isso se deve pelo fato de que os discos de antibióticos já passaram por inúmeros testes durante anos e atendem todas as normas da legislação CLSI M100-S15 (2005) obtendo eficiência da sua atuação contra bactérias.

Na literatura é possível encontrar trabalhos onde demonstram que quitosana imersas com metais possui uma boa capacidade bacteriostática. Pereira (2017) verificou a formação de um halo de inibição em membranas de quitosana com nanopartículas de prata diante da *E. Coli* de 16 mm. Sousa (2018) diante da mesma estrutura, com 0,025% de concentração das nanopartículas de prata, obteve 2 mm de halo de inibição, indicando que o procedimento foi eficiente tendo aplicabilidade na área de curativo para regeneração tecidual. Paiva (2009), com multicamadas de quitosana e alginato imersas em cobre, relata que o metal é fundamental para a capacidade antibacteriana do sistema, obtendo aplicabilidade em tratamento de feridas e tratamento de água. Sendo assim, os resultados obtidos demonstram que a membrana de quitosana com nitrato de prata apresenta boa capacidade de inibição para ambas as bactérias testadas.

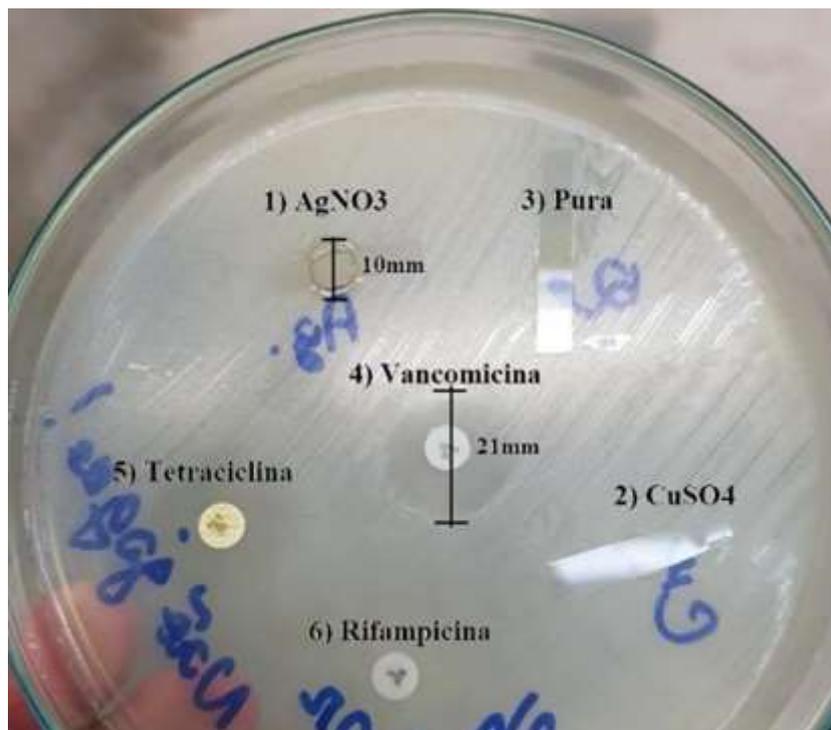


Figura 6: TSA da S.Aureus com 10mm de halo de inibição de Quitosana + AgNO₃. (Autoria própria).

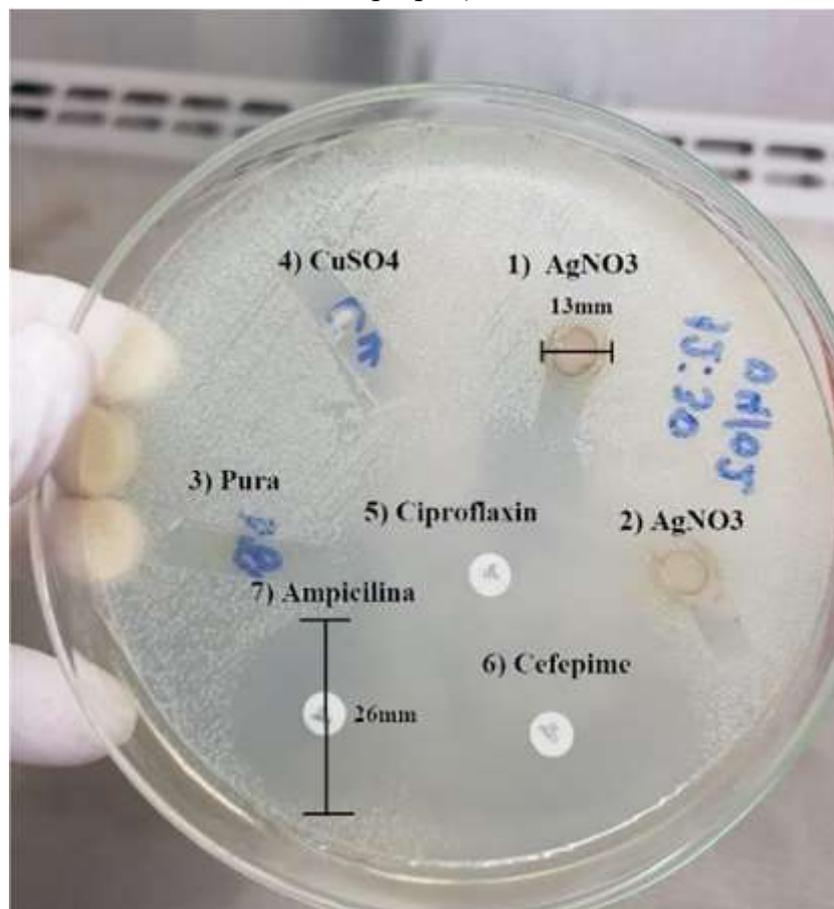


Figura 7: TSA da E.Coli com 13mm de halo de inibição de Quitosana + AgNO₃. (Autoria própria).

Conclusões

inscrição do nitrato de prata foi fundamental para que as membranas de quitosana obtivessem característica inibitória contra a bactéria, embora seja encontrado na literatura que a quitosana pura possui particularidade antibacteriana, não foi possível visualizar para as bactérias avaliadas neste trabalho. Foi previsto que as membranas com sulfato de cobre também possuísem eficiência no teste realizado, visto que na literatura encontra-se dados da sua capacidade de inibição, a explicação para a ocorrência desse fato pode ter sido a baixa concentração da solução do metal ou alguma contaminação involuntária diante do teste. O respectivo trabalho propõe um indicativo para que novas análises e experimentos sejam realizados. Acredita-se que com a continuidade do projeto resultados mais promissores possam ser obtidos.

Referências

ANASTÁCIO, Amanda Gleyce. A importância dos biomateriais e suas aplicações.

Disponível em:

<http://192.100.247.84/bitstream/prefix/1154/1/Amanda%20Gleyce%20Anast%c3%a1cio.p>

Acesso em: 6 jan. 2020.

ANVISA **Interpretação de dados microbiológicos.** Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/microbiologia.htm> Acesso em 10 jan. 2020.

ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão.**

Disponível em http://anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf Acesso em 10 jan. 2020.

Cardoso M.J.B et al. Ensaio Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio, REMAP, Campina Grande, v.7, n.1, p.1-6, fev. 2011. Disponível em:

<<http://www2.ufcg.edu.br/revista-remap/index.php/REMAP/article/view/240/229>>

Acesso em 04 jan. 2020.

COELHO, Thalia Camila. **Estudos de adsorção de Cobre (II) em microesferas de quitosana reticuladas com Epicloridrina e impregnadas com Heparina.** Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88790/226924.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em 02 jan. 2020.

DALLAN, Paula. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.** Disponível em:

<http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/267454/1/Dallan_PaulaRulfMarreco_D.pdf> Acesso em 02 jan. 2020.

DE PAIVA, Rafael Gonçalves. **Obtenção e caracterização de membranas multicamadas de quitosana alginate contendo cobre.** Disponível em:

<http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/267188/1/Paiva_RafaelGoncalvesde_M.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2020.

GODOI, Fernanda Condi de. **Membrana densa de quitosana contendo nanopartículas de Cobre: caracterização e possíveis aplicações.** Disponível em:

<http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/266672/1/Godoi_FernandaCondi_D.pdf> Acesso em 03 jan. 2020.

GUTH, Beatriz. Enterotoxigenic Escherichia coli – na Overview, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Janeiro, v.95, n.1, p.95-97, 2000. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-0276200000700017 Acesso em 9 jan. 2020.

OLIVEIRA, Margarete. **O biopolímero Quitosana modificado quimicamente ou reticulado com metais, em forma de pó ou esfera, aplicado no estudo termoquímico da interação com Cobre e Aminas alifáticas.** Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/250070/1/Oliveira_Margarete_D.pdf> Acesso em 09 fev. 2020

PEREIRA, Anna Karla dos Santos. Síntese de nanopartículas de prata suportadas em microesferas e filmes de quitosana: **Estudo da atividade antibacteriana e aplicação na liberação controlada do ibuprofeno.** Disponível em: <<http://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/496>> Acesso em 01 jan. 2020.

Queiroz Júnior, Heronildes Fernandes de. Utilização de membranas de quitosana como alternativa para efluentes com metais pesados. Disponível em: <http://monografias.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/4181/1/Utilizacaodamembrana_Monografia> Acesso em 03 jan. 2020.

R. Spin Neto et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura, **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v.37, n.37, p.155-161, 2008. Disponível em: <<https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018447f8c9d0a098b4b49/pdf/rou-37-2-155.pdf>> Acesso em 02 jan. 2020.

R.A Tariq et al. Chemical modification of Chitosan for metal ion removal, **Arabian Journal of Chemistry**, n.5, p.741-746, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535210002753#bi0005>> Acesso em 02 jan. 2020.

SANTOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Lab**, v.43, n.6, p. 413-423, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n6/v43n6a05.pdf> Acesso em 05 jan. 2020.

SANTOS, Z. M.; CARONI, A. L. P. F.; PEREIRA, M. R.; DA SILVA, D. R.; FONSECA, J. L. C. **Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis.** Carbohydrate research, v. 344, n. 18, p. 2591-5, 2009. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/38033298_Determination_of_deacetylation_degree_of_chitosan_A_comparison_between_conductometric_titration_and_CHN_elemental_analysis> Acesso em 09 fev. 2020.

SILVA, Gracie Luiza da. **Estudo da ação inibitória da quitosana sobre enteropatógenos: Salmonella entérica, Shigella sonnei e Escherichia coli EPEC.** Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-10052006095954/publico/TDE_GracieLuizaSilva.pdf> Acesso em 4 jan. 2020.