

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Instrumentação Agropecuária  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio  
Anais do V Workshop 2009**

**Odílio Benedito Garrido de Assis  
Wilson Tadeu Lopes da Silva  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Editores**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária  
São Carlos, SP  
2009**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Rua XV de Novembro, 1452  
Caixa Postal 741  
CEP 13560-970 - São Carlos-SP  
Fone: (16) 2107 2800  
Fax: (16) 2107 2902  
<http://www.cnpdia.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpdia.embrapa.br](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,  
Dr. João de Mendonça Naime,  
Dr. Washington Luiz de Barros Melo  
Valéria de Fátima Cardoso  
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso  
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane  
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho  
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

**1ª edição**

1ª impressão (2009): tiragem 200

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

---

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao  
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação  
Agropecuária, 2009.

Irregular  
ISSN: 2175-8395

I. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.  
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique  
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

---

© Embrapa 2009



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DE QUITOSANA

Fabiana Eiko Shibahara Asano, Douglas de Britto, Odilio Benedito Garrido Assis\*

Embrapa Instrumentação Agropecuária  
Rua XV de Novembro, 1452, C.P. 741, 13560-970, São Carlos, SP  
Tel: (16) 2107-2800, Fax (16) 2107-2902; e-mail: \*odilio@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC3

Plano de Ação: 01.05.1.01.03.03

### Resumo

Quitosana comercial e sais alquilados quaternários de quitosana foram sintetizados e suas ações antifúngicas como coberturas sobre superfície de maçãs fatiadas avaliadas. Soluções de esporos do fungo *Penicillium expansum* foram empregadas como contaminantes. Após 3 dias de estocagem as maçãs revestidas com quitosana apresentaram média de desenvolvimento de fungos de cerca de 19% enquanto as maçãs controles apresentaram médias de 41%. Para as coberturas com sais alquilados quaternários de quitosana os valores medidos foram inferiores a 9%. Para o derivado N,N,N-trimetilquitosana o meio ácido foi muito favorável ao desenvolvimento do fungo.

**Palavras-chave:** N,N,N-trimetilquitosana, cobertura antifúngica, filmes comestíveis, maçãs minimamente processadas.

### Introdução

Frutos e hortaliças minimamente processados apresentaram um crescimento significativo nos últimos anos, tornando-se um segmento de potencial exploração comercial (ASSIS e PESSOA, 2004). Vários países têm apresentado demandas expressivas por este mercado como a China, Índia e América Latina. Nos EUA esse mercado é bem estabelecido e sua taxa cresce cerca de 15% ao ano, e em escala mundial este mercado apresenta potenciais gerais de crescimento da ordem de 30% ao ano (GORNLY, 2005).

No entanto, produtos minimamente processados apresentam uma série de problemas. Durante descascamento, cortes ou mesmo transportes, injúrias são introduzidas nos tecidos e estes passam a se degradar mais rapidamente que os tecidos intactos. As perdas se dão principalmente por

ataques de microrganismos como os fungos, que representa a principal causa de perdas pós-colheita.

A quitosana e seus derivados têm sido amplamente estudados e propostos como material de grande potencial para aplicações como revestimentos protetores em alimentos. Como alternativas para superar o fato da limitada solubilidade da quitosana, a qual é solúvel somente em soluções diluídas de ácidos, e também como um meio de tornar sua atividade antimicrobiana mais efetiva, o emprego de derivados hidrossolúveis têm sido propostos, como, por exemplo, os sais quaternários (LEE et al., 2002; BRITTO e ASSIS, 2007).

Assim, este trabalho objetivou avaliar a capacidade antifúngica de derivados quaternários de quitosana contra o fungo *Penicillium expansum*, que é um dos principais microrganismos infectantes de maçãs.



## Materiais e métodos

A quitosana inicialmente empregada foi de origem comercial, marca Aldrich, de média massa molar. Os derivados estudados foram obtidos a partir de duas reações básicas: a primeira de alquilação com aldeídos e a segunda de quaternização com dimetilsulfato (DMS), através da qual se obtém o sal solúvel em água, segundo procedimentos adotados pelo grupo (BRITTO & ASSIS, 2007).

Esporos do fungo *P. expansum* foram isolados de frutas contaminadas e replicados em placa de Petri com o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). A partir destes fungos colonizados sobre as placas prepararam-se as soluções de esporos. A concentração dos esporos foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer.

Soluções de quitosana e de seus sais quaternários foram preparadas na concentração de 2g/L, dissolvendo-os em 50mL de solução de ácido acético 1% ou água (sais solúveis) sob agitação mecânica durante uma noite. A estas soluções foram adicionados 500L da solução de esporos de *P. expansum*, fazendo com que todas tivessem a mesma concentração final de  $1 \times 10^6$  esporos/mL. Soluções de controle também foram preparadas, adicionando-se os esporos ao solvente puro (sem a presença da quitosana ou sais derivados).

Maçãs (cv. Gala, *Malus domestica*) adquiridas em supermercados locais foram fatiadas ao meio e imersas nas soluções filmogênicas por cerca de 30s e escoadas por alguns segundos. Após o escoamento as maçãs foram colocadas numa bandeja e deixadas ao ar livre ou em estufa a 25°C e 90% de umidade relativa. Lotes de 20 amostras em cada condição foram avaliados. Acompanhou-se a proliferação dos fungos por meio do registro fotográfico diário das superfícies ao longo de 7 dias. Essas imagens foram na seqüência analisadas com auxílio do programa ImageJ, onde pôde-se calcular a área superficial relativa da maçã colonizada pelos fungos (ASSIS et al., 2007).

## Resultados e discussão

No primeiro experimento as maçãs foram revestidas com quitosana não modificada e comparadas com seu controle. A percentagem da área superficial da face cortada colonizada pelos fungos após três dias é mostrada na Figura 1. Nota-se claramente que a quitosana, como descritos na literatura (ASSIS e PESSOA, 2004), mostrou uma atividade fungicida satisfatória contra o *P. expansum*, inibindo seu crescimento, ou seja, com uma ação bacteriostática.

Na Figura 2 temos os mesmos ensaios realizados com os sais de quitosana alquilada, que apresentaram resultados superiores, estabelecendo frente ao controle pode-se perceber ação inibitória bastante satisfatória, o que indica que o tamanho da cadeia alquila é um fator importante na ação fungistática.

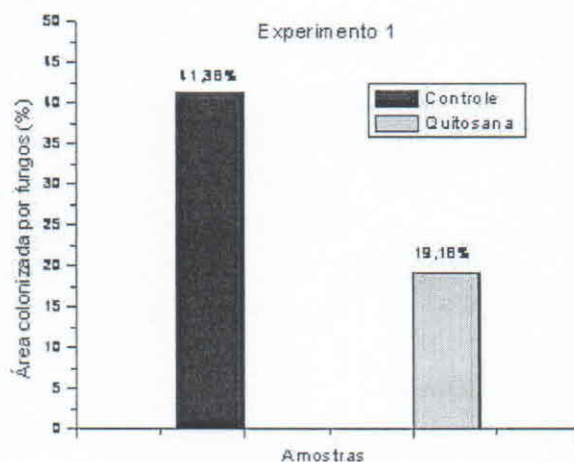


Fig. 1. Comparação da área superficial das maçãs revestida com solução de quitosana e não revestida (controle) após três dias.

Os sais alquilados contendo cadeias com 8 carbonos (Oct) e 12 carbonos (Dodec) apresentaram resultados superiores ao o sal alquilado com 4 carbonos (But). Comparando estes resultados com os dados da Figura 3 vê-se que todos os sais apresentam melhores resultados que a quitosana de partida, ou seja, para o fungo gênero *P. expansum*, os sais quaternários alquilados apresentaram ação inibitória superior ao medido para a quitosana.

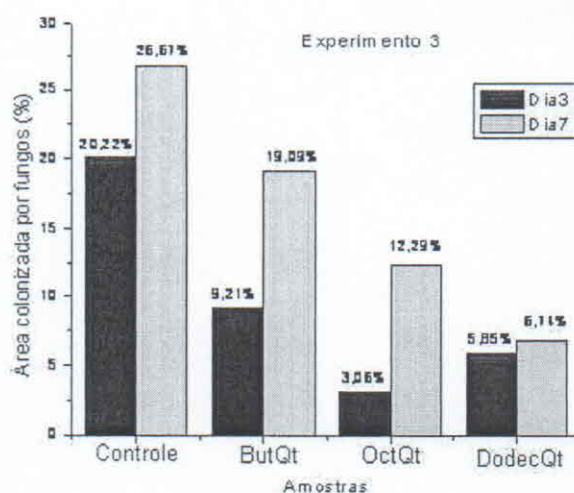


Fig. 2. Comparação da área superficial das maçãs revestida com soluções de sais quaternários de quitosana e não revestida (controle) após 3 e 7 dias em estufa a 25°C.



Outro derivado da quitosana estudado foi a N,N,N-trimetilquitosana ou TMQ. Este derivado não sofreu o processo de alquilação, sendo a quitosana submetida diretamente à segunda reação. Na Figura 3 vemos o comportamento do fungo frente a TMQ solubilizada em água e em ácido acético. Percebe-se que tanto o controle em água quanto a solução de TMQ em água apresentam uma menor proliferação do fungo, enquanto a solução ácida apresenta inibição reduzida. Comparada a Figura 1, em que temos os dados da quitosana, vemos que a TMQ apresenta resultados comparáveis aos da quitosana, com valores muito próximos de atividade fungistática. No entanto, este derivado tem a vantagem de ser solúvel em água, apresentando assim uma maior compatibilidade biológica. Neste caso, a alteração do sabor do fruto minimamente processado revestido com sal solúvel em água é altamente minimizada.

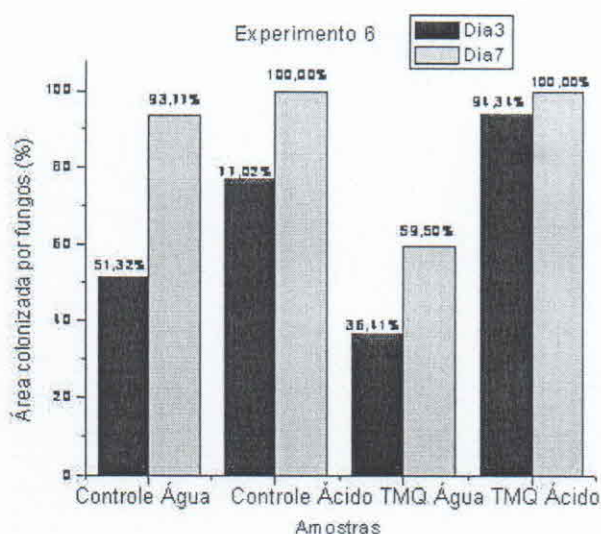


Fig. 3. Comparação da área superficial das maçãs revestida com solução de TMQ e não revestida (controle) após 3 e 7 dias em estufa a 25°C, em meios ácido e neutro.

## Conclusões

A ação antifúngica dos derivados de quitosana mostrou resultados positivos, nos quais os sais apresentaram ação inibitória superior ou semelhante a quitosana de partida. Os derivados solúveis em água possuem ainda a vantagem de serem solúveis em pH neutro, implicando em uma superior biocompatibilidade. Ensaio biológicos preliminares para a determinação da mínima concentração inibitória estão em andamento e os resultados preliminares apresentados neste evento.

## Agradecimentos

FAPESP, CNPQ, FINEP/MCT, FIPAI, EMBRAPA, REDE AGRONANO

## Referências

- ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Nota Científica: Preparação de Filmes Finos de Quitosana para uso como Revestimento Comestível e Inibidor de Crescimento de Fungos sobre Frutas Fatiadas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 17-22, 2004.
- ASSIS, O. B. G.; GOUVEA, S. P.; BRITTO, D. **Uso de metodologia simples por análise de imagens para acompanhamento da proliferação de fungos em frutos fatiados**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2006. 25 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 17).
- 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**, Guildford, v. 41, n. 2, p. 198-203, 2007.
- GORNY, J. R. Leveraging innovative fresh-cut technologies for competitive advantage. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 687, p. 141-148, 2005.
- LEE, J. K.; LIM, H. S.; KIM, J. K. Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chem. Letters**, New York, v. 12, n. 20, p. 2949-2951, 2002.