

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TPP COMO INIBIDORAS DO CRESCIMENTO FÚNGICO

Taís Téó de Barros-Alexandrino^{1,3}; Milena Martelli-Tosi²; Odílio B. Garrido Assis³

¹Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFSCar, São Carlos. tais.teo@hotmail.com

²Departamento de Engenharia de Alimentos, FZEA-USP, Pirassununga.

³Embrapa Instrumentação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, São Carlos, SP. odilio.assis@embrapa.br

Classificação: Processamento de filmes nanoestruturados para embalagens e conservação de alimentos.

Resumo

A contaminação por patógenos é um problema global e está relacionada a aproximadamente 25% das perdas totais de frutas e hortaliças. Os antimicrobianos sintéticos empregados com o objetivo de minimizar essas perdas podem gerar problemas ambientais indesejáveis e observa-se paralelamente um aumento pela preferência por alimentos saudáveis ausentes de contaminantes químicos. Uma alternativa para atender essas demandas é o desenvolvimento de fungicidas naturais, biodegradáveis, que possam atuar de maneira satisfatória. Neste contexto, a quitosana tem sido considerada como uma alternativa viável para o desenvolvimento de antimicrobianos, principalmente por ser um material biodegradável e oriundo de fontes naturais. No presente trabalho, o potencial de suspensões de nanopartículas do sistema Quitosana-Tripolifosfato (Qui-TPP) é avaliado como antifúngico natural para aplicação tópica em frutas via *spray*, considerando que quanto maior a área, maior será a interação superficial entre a quitosana e os patógenos. As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de gelatinização ionotrópica e avaliadas nas concentrações de 2 e 10g/L e ensaios preliminares conduzidos *in vitro* pela análise da inibição do fungo *Penicillium expansum* inoculados em meio PDA. As partículas obtidas apresentaram formato esférico, com aspecto homogêneo e organizadas em aglomerados, no caso das amostras pré-centrifugação e com boa dispersão, no caso das amostras pós-centrifugação. Partículas com menores tamanhos foram encontrados no sobrenadante tanto na concentração de 2g/L como na de 10g/L: 140 e 760 nm, respectivamente. Os ensaios microbiológicos indicaram um menor crescimento fúngico na presença das nanopartículas na maior concentração avaliada em comparação com o controle, indicando o potencial do uso de quitosana na forma de *spray* como antifúngico natural contra o *Penicillium expansum*.

Palavras-chave: anti-fúngico; *P. expansum*; coberturas protetoras; perdas pós-colheita; quitosana.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-TPP NANOPARTICLES AS AND THEIR POTENTIAL AS A NATURAL ANTIFUNGAL AGENT

Abstract

The food contamination by pathogen is a problem in worldwide scale. It is related to approximately 25% of the total losses of fruits and vegetables. The synthetic antimicrobials ordinary used to reduce such losses can generate environmental impacts which along with an increasing by the consumers options for healthy food, without chemical have move up the search for new natural antimicrobials. An alternative for these demands is the development of non-aggressive agents which can act on satisfactory way. In such context, the chitosan has been considered as a feasible material. In the present study, a nanoparticle suspension from the chitosan tripolyphosphate (Chit-TPP) system is evaluated as antifungal agent. The nanoparticles were produced by the ionotropic gelatinization process and evaluated at concentration of 2 and 10 g/L and *in vitro* analyses were carried out against the fungi *Penicillium expansum* in PDA medium. The particles have spherical format, with homogeneous size distribution, in agglomerated form when in pre-centrifuged and well dispersed in pos-centrifuged condition. Smaller sized particles were attained in the supernatant either in the concentration of 2 and 10 g/L. The microbial essays indicated an inferior growth in the medium with

nanoparticles, showing the potential of using chitosan nanoparticles in spray form as a natural agent against *Penicillium expansum*.

Keywords: antifungal; protective coatings; post-harvest losses; chitosan.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil perde cerca de 22% das 41 milhões de toneladas de sua produção anual de frutas e hortaliças. Estima-se que do total das perdas 25% sejam consequência da contaminação por patógenos de origens diversas (GUSTAVSSON et al., 2011). Um dos fungos de maior incidência e que contribui para esses altos índices de perdas são os do gênero *Penicillium sp.*. Estes constituem em fungos oportunistas os quais não somente são responsáveis pela podridão de frutas e hortaliças, como o bolor azul (Blue mold), mas também produzem metabólitos tóxicos como micotoxinas, com potenciais efeitos à saúde humana e animal como doenças hepáticas e neurais e alterações mutagênicas (NARAYANASAMY, 2005).

Para o combate deste problema, há diversos antifúngicos sintéticos como o tiabendazol, o benomil e o iprodione. Embora eficientes, estes agentes podem gerar problemas ambientais de difícil remediação, havendo assim uma pressão para o desenvolvimento de alternativas que sejam menos agressivas (TRIPATHI, 2004). Neste contexto, a quitosana tem sido considerada como ideal para o desenvolvimento deste tipo de material, considerando sua origem natural e abrangente atividade antimicrobiana (GOY et al., 2009). A quitosana é um polímero considerado seguro ao consumo humano - GRAS e tem sido largamente explorada, principalmente como agente protetor, seja na formação de coberturas comestíveis (BRITTO et al., 2012) ou na produção de nanopartículas de reforço (MARTELLI et al., 2013) ou para o encapsulamento de vitaminas (BRITTO et al., 2014).

Por ser a atividade antifúngica uma ação basicamente de interação superficial: os sítios eletricamente carregados das lipoproteínas presentes na parede celular dos microrganismos interagem com os grupos protonados das cadeias da quitosana (GOY et al., 2009), quanto maior a área superficial maior será a intensidade dessas reações. Ou seja, a quitosana na forma de nanopartículas apresenta uma maior atividade antimicrobiana que se empregada na forma de filme. A formação de suspensão de nanopartículas de quitosana como agente antimicrobiano em alimentos já foi testado com resultados promissores (PILON et al., 2015).

A produção de nanopartículas pelo sistema Quit-TPP e sua avaliação, neste momento *in vitro*, de sua capacidade inibitória contra fungos *Penicillium expansum* é o principal objetivo deste trabalho, que tem como meta a busca de formulações, com partículas e concentrações adequadas, para o desenvolvimento de incipientes para aplicação tópica na formação de coberturas protetoras em frutas e hortaliças.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A nanopartículas de quitosana (Aldrich) foram inicialmente obtidas pelo procedimento padrão de gelatinização ionotrópica, no qual os géis de quitosana, nas concentrações 2 e 10g/L, foram preparados por solubilização em ácido acético a 1 %, sob agitação intensa ao longo de 6 horas. Em seguida, o TPP (tripolifosfato de sódio) (Aldrich) foi dissolvido em água destilada, e adicionado ao gel por via *drop wise* (gotejamento controlado e contínuo na razão de 1 mL.min⁻¹). O entrecruzamento se deu em meio aquoso e a suspensão reativa de quitosana e TPP centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm, segundo procedimento adotado (BRITTO et al., 2012). Alíquotas das etapas do processo de síntese foram reservadas para comparação de seus tamanhos: (i) pré-centrifugação; (ii) sobrenadantes pós-centrifugação e (iii) partículas ressuspensas.

As dimensões das nanopartículas e seu potencial Zeta foram obtidos em sistema Zeta Potencial Analyser (Malvern Instruments). As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C.

As suspensões foram submetidas a banho ultrassônico por 15 minutos, e diluídas em água deionizada, depositadas em lâmina de silício e secas espontaneamente na temperatura ambiente. Após 48h foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG - Jeol, USA).

Para a avaliação do crescimento radial, seguiu-se procedimento similar ao descrito em Mendes et al., 2016, ou seja, meio sólido de cultura BDA foi preparado em placas de Petri nos quais alíquotas de nanopartículas foram adicionadas em ambas concentrações avaliadas. Poços de 6 mm foram

puncionados em cada placa e preenchidos com 10 μL da solução de esporos. A cepa de *P. expansum* cultivada é de origem do banco de microrganismos da Embrapa Instrumentação. O crescimento se deu na temperatura ambiente e registrado ao longo de uma semana. O mesmo procedimento foi repetido sem a adição dos polímeros. O crescimento foi registrado diariamente ao longo de 7 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tamanho de partícula e potencial Zeta

Na Tabela 1 estão dispostos os tamanhos das partículas (Quit-TPP) e os respectivos valores de potenciais Zeta nas diversas condições de amostragem.

Tabela 1. Comparação de tamanhos (nm) e potencial zeta (mV) de nanopartículas de Quitosana-TPP em concentrações de diferentes de quitosana e em etapas distintas do processo de síntese

Concentração de Quitosana	Pré-centrifugação		Sobrenadante		Ressuspensas	
	Tamanho (nm)	Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Zeta (mV)
2g/L	712,9	22,8	139,8	16,6	626,3	31,8
10g/L	4619	15,06	760,1	9,89	1142	18,3

As análises realizadas em diferentes etapas de síntese avaliadas indicam distintos tamanhos, sendo as menores dimensões de partículas obtidas no sobrenadante e na menor concentração de quitosana entrecruzada. A uma clara tendência de redução de dimensões quando se considera as amostras pré-centrifugação, ressuspensas e no sobrenadante, independente da concentração avaliada. Como o objetivo é a produção de partículas de menores dimensões (alta área superficial e consequentemente maior interação), as amostras do sobrenadante mostraram-se adequadas ao uso direto na elaboração de incipientes para aspersão (uso na forma de spray). As partículas na condição pré-centrifugação apresentam dimensões além das desejadas, e a separação do meio não reagido (no qual supõe-se que não houve o entrecruzamento dos grupos entre a quitosana e o tripolifosfato), ou seja, ressuspensas após a centrifugação, também não foi efetiva na consolidação de partículas de dimensões nanométricas desejáveis.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG)

Os aspectos microscópicos das nanopartículas de quitosana, obtidas nas diferentes etapas de síntese, estão organizados na Figura 1 para diferentes ampliações. Para as nanopartículas analisadas a partir das amostras na condição pré-centrifugação, são observados a formação de grandes aglomerados e estruturas esparsas, possivelmente quitosana não solubilizada. Nas amostras colhidas diretamente do sobrenadante e após a ressuspensão das amostras centrifugadas, são observadas nanopartículas de formatos esféricos, com aspecto homogêneo e dispersão regular. Com base no formato e observação de distribuição dentro das escalas de ampliação, as imagens são compatíveis com os resultados obtidos via análises por Zeta-sizer.

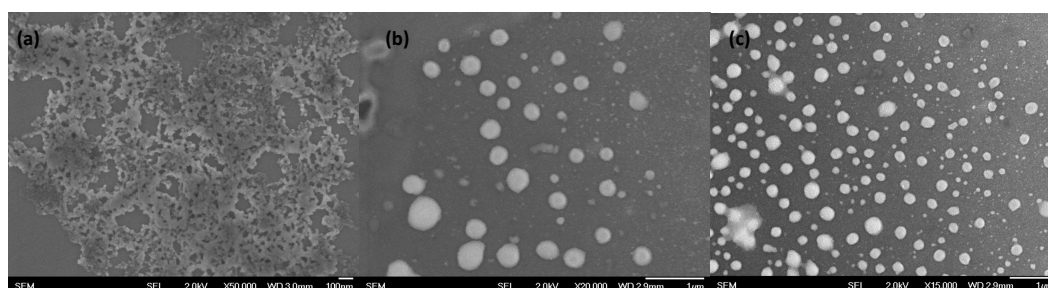


Figura 1. Imagens de MEV-FEG de nanopartículas de quitosana em diferentes etapas de síntese: (a) amostra pré-centrifugação; (b) no sobrenadante e (c) ressuspensas.

3.3 Ensaio de crescimento fúngico

Os ensaios preliminares de acompanhamento do crescimento do fungo *Penicillium expansum*, na presença ou não de nanopartículas está ilustrado na Figura 2. A presença de nanopartículas mostrou

efeito positivo na inibição do crescimento, no caso da solução de nanopartículas com concentração de 10g/L o que pode ser observado visualmente (em comparação com o controle), indicando a efetividade da aplicação da quitosana na forma de nanopartículas. Medidas de mínima concentração inibitória estão em curso para definir concentrações otimizadas no desenvolvimento da aspersão para aplicação *in vivo*.

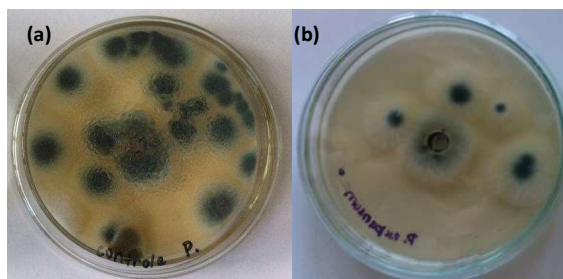


Figura 2. Ensaio preliminar da atividade antifúngica da quitosana na condição particulada em relação ao microrganismo *Penicillium expansum*: (a) Controle; (b) Placa com nanopartículas de quitosana (10g/L).

4 CONCLUSÃO

As análises preliminares indicam a síntese de nanopartículas no sistema Quit-TPP resulta em tamanhos diferentes nas diferentes etapas do processo, sendo as menores, e em princípio, as mais efetivas do ponto de vista microbiológico, aquelas formadas diretamente no meio reativo (sobrenadante), sem a necessidade de centrifugação e ressuspensão. Nos testes realizados *in vitro* em meio de cultura sólido, o crescimento do fungo *P. expansum* foi claramente inibido na presença das nanopartículas, provendo indícios para futuras formulação de incipientes de aplicação tópica.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar, a CAPES pela concessão de bolsa e a Rede AgroNano por auxílios recebidos.

REFERÊNCIAS

- GOY, R.C.; BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n.3, p. 241-247, 2009.
- GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG, C.; SONESSON, U.; VAN OTTERDIJK, R.; MEYBECK, A. Global food losses and food waste. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italy, 29p. 2011
- NARAYANASAMY, P. *Postharvest Pathogens and Disease Management*. Wiley-Interscience Inc. Hoboken, N. Jersey. 1st ed. 592p. 2005 .
- TRIPATHI, P. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest biology and Technology*, v. 32, n.3, p. 235-245. 2004.
- BRITTO, D.; SANTOS, M.F.; ASSIS, O.B.G. Evaluation of chitosans with different degrees of acetylation as fungicide coating on cut apples. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 1, p. 16-21, 2012.
- MARTELLI, M.; BARROS, T.T.; MOURA, M.R.; MATTOSO, L.H.C.; ASSIS, O.B.G. Effect of Chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. *Journal of Food Science*, v. 78, n.1, p. N98-N104, 2013.
- MENDES, L.D.; BRESOLIN, J.D.; ASSIS, O.B.G.; BRITTO, D. avaliação *in vitro* da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *penicillium expansum*. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas*, v.10, n.1, p.116-128, 2016.