

ATIVIDADE INIBITÓRIA DA QUITOSANA E DE SEU DERIVADO QUATERNIZADO TMQ SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO *Penicillium expansum*

Leila D. Mendes¹; Joana D. Bresolin²; Odílio B. G. Assis²; Douglas de Britto³

¹Universidade de São Paulo – IQSC, São Carlos, SP

²Embrapa Instrumentação, LNN, São Carlos, SP – odilio.assis@embrapa.br

³Embrapa Semiárido – Petrolina, PE – douglas.britto@embrapa.br

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

Resumo

Quitosana comercial de média massa molar e seu derivado quaternizado hidrossolúvel *N,N,N*-trimetilquitosana foram avaliados *in vitro*, como agentes inibidores do crescimento de *Penicillium expansum*. Formulações nas concentrações de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 gL⁻¹ de cada polímero foram preparadas e adicionados em meio de cultura BDA sólido e aquoso. O fungo foi isolado de frutas contaminadas, cultivado e inoculado nos meios contendo os polímeros. Análises foram conduzidas por medida do crescimento de colônias em meio sólido e por contagem de esporos germinados em meio líquido indicaram eficiência na redução da infestação por ambos os polímeros. A quitosana apresentou elevada eficiência em meio líquido enquanto seu derivado foi eficaz na redução do crescimento em meio de cultura sólido, ambos em baixas concentrações (0,1 e 1,0 gL⁻¹).

Palavras-chave: quitosana; antifúngico natural; bolor azul; biopolímeros; *P. expansum*.

INHIBITORY ACTIVITY OF CHITOSAN AND ITS QUATERNIZED DERIVATIVE ON THE *Penicillium expansum* GROWTH

Abstract

Chitosan of medium molar weight and its quaternized water-soluble derivative *N,N,N*-trimethylchitosan were evaluated *in vitro*, in laboratorial analyses scale, as inhibitors agents of *Penicillium expansum* growth. Formulations with polymer concentrations of 0.1; 1.0; 5.0 and 10.0 gL⁻¹ were prepared and added to PDA solid and aqueous culture medium. The fungus strain was collected from decay fruits, harvested and inoculated in the medium with the polymers. Measurement of colony size growth (in solid medium) and germinated spore's counting in liquid medium indicated that both polymers act efficiently in reducing infestation. The chitosan showed high efficiency in liquid medium while the derivative was more effective in solid medium, both at low concentrations (0.1 e 1.0 gL⁻¹).

Keywords: chitosan; natural antifungal; blue mold; biopolymers; *P. expansum*.

Publicações relacionadas: Mendes, L.D.; Bresolin, J.D.; Assis, O,B,G.; Britto, D. *In vitro* evaluation of chitosan and its quaternized derivative on the inhibition of *penicillium expansum* growth. Brazilian Journal of Biosystem Engineering, v.10, n.1, p.116-128, 2016.

1 INTRODUÇÃO

O bolor azul é um dos maiores responsáveis por perdas ocasionadas por podridão não somente na condição pós-colheita como também de incidência comum na indústria de processamento de sucos. O agente responsável pelo aparecimento do bolor azul é o fungo *Penicillium expansum*, patógeno necrotrófico bastante agressivo que infecciona pontos de ferimentos, lesões ou pequenas fissuras na epiderme ou na região do pedúnculo, encontrando assim condições adequadas para a germinação de seus esporos. As perdas de maçãs decorrentes da ação do *P. expansum* são da ordem de 90% com respeito às ocorrências totais de podridão (BLUM et al., 2004), e estimada como superior a 40% na incidência em peras e pêssegos (NARAYANASAMY, 2005).

Diversos compostos antifúngicos alternativos aos comerciais (usualmente tiabendazol, benomil e iprodione) têm sido avaliados no controle do bolor azul, como fosfitos, ácidos fenólicos, ácido acético e benzaldeídos, com variáveis graus de eficiência. A quitosana, um polissacarídeo obtido pela desacetilação parcial da quitina e seus derivados, tem sido também indicada como antimicrobiano natural com atividade satisfatória na inibição de uma série de patógenos de ocorrência pós-colheita. A atividade antifúngica da quitosana é bem documentada na literatura sendo o modelo mais aceito o relacionado à natureza policatiônica que estabelece interação com sítios aniônicos presentes nas paredes celulares dos microrganismos. Tal interação ocorre preferencialmente entre os grupos NH_2 protonados da quitosana e os resíduos negativos das lipoproteínas que constituem a parede celular, causando danos estruturais que geram alterações na permeabilidade das membranas, levando consequentemente a uma instabilidade osmótica (GOY et al., 2009).

A quitosana é considerada segura ao consumo humano, sendo classificada como GRAS (*generally recognized as safe*) pelo FDA e neste trabalho avaliamos o potencial da quitosana comercial e de seu derivado quaternizado *N,N,N*-trimetilquitosana como agentes inibidores do crescimento de *Penicillium expansum* em ensaios *in vitro*, objetivando potencial aplicação como antifúngico tópico no controle do bolor azul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As soluções de quitosana comercial de média massa molar ($400.000 \text{ g mol}^{-1}$) e com grau de acetilação médio entre 68-75% (Sigma-Aldrich), e seu derivado quaternizado foram preparados por dissolução em solvente ácido acético a 1% e água destilada respectivamente, nas concentrações 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 g L^{-1} para cada polímero. O derivado quaternizado, identificado como TMQ (*N,N,N*-trimetilquitosana) foi obtido a partir de reações específicas da quitosana comercial com dimetilsulfato e NaOH conforme processo desenvolvido pela Embrapa e descrito em Britto e Assis, 2007.

O fungo *P. expansum* foi isolado de frutas contaminadas e replicado em placa de Petri com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-agar). Os esporos foram incubados a 26°C até o crescimento visual do microrganismo. A partir desta cultura foram preparadas as suspensões em soluções esterilizadas de Tween 80 (0,1% v/v) na qual foram adicionados os fungos já crescidos. A concentração dos esporos foi determinada em câmara de Neubauer. Para o teste utilizou-se uma concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} segundo determinação prévia por densidade ótica por espectroscopia UV no comprimento de onda de 530 nm (UV-vis Spectrum series SP-2000UV).

Para a avaliação do crescimento radial em meio sólido, meio de cultura BDA foi preparado em placas de Petri adicionados a 15,0 mL de solução inibidora. O mesmo procedimento foi repetido nas amostras controle, embora sem a adição dos polímeros. O crescimento foi registrado fotograficamente, diariamente ao longo de 6 dias e o diâmetro medido diretamente sobre as placas. Para a análise de germinação em meio líquido, foram preparadas suspensões em tubos de ensaio vedados. A incubação se deu por 26 h na temperatura de 25°C sob agitação orbital de 120 RPM fazendo uso de uma incubadora modelo TE-4200 (Tecnal). A contagem dos fungos germinados foi realizada diretamente nas imagens e expressas em percentagem em relação aos não germinados. As análises foram consideradas para nível de significância de $p < 0,05$ (Tukey) empregando o programa Bioestat 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 temos dispostas imagens típicas do crescimento das colônias de *P. expansum* em meio de cultura DBA sólido, para diversas concentrações de quitosana e TMQ, sendo possível um acompanhamento visual do crescimento fúngico com o tempo. Fica evidente, através da comparação entre as placas, que o derivado TMQ apresenta uma maior atividade antifúngica que a quitosana, principalmente para adições em baixas concentrações. Esse resultado pode ser melhor depreendido através da comparação da evolução dos valores numéricos do crescimento radial, plotados para a quitosana e para a TMQ na Figura 2.

A diferença entre as medidas do crescimento radial das colônias no meio controle e com quitosana, embora ligeiramente menor, não evidencia um ação intensa. O aumento da concentração de polímero no meio também não resultou em um aumento proporcional da atividade. Contudo, deve-se levar em consideração que a atividade antifúngica da quitosana é fortemente influenciada por diversos

fatores físico-químicos, como a massa molar polimérica, pH do meio, grau de acetilação, e composição do meio de cultura e da temperatura em que as interações ocorrem (BRITTO et al., 2012; SZYMAŃSKA & WINNICKA, 2015).

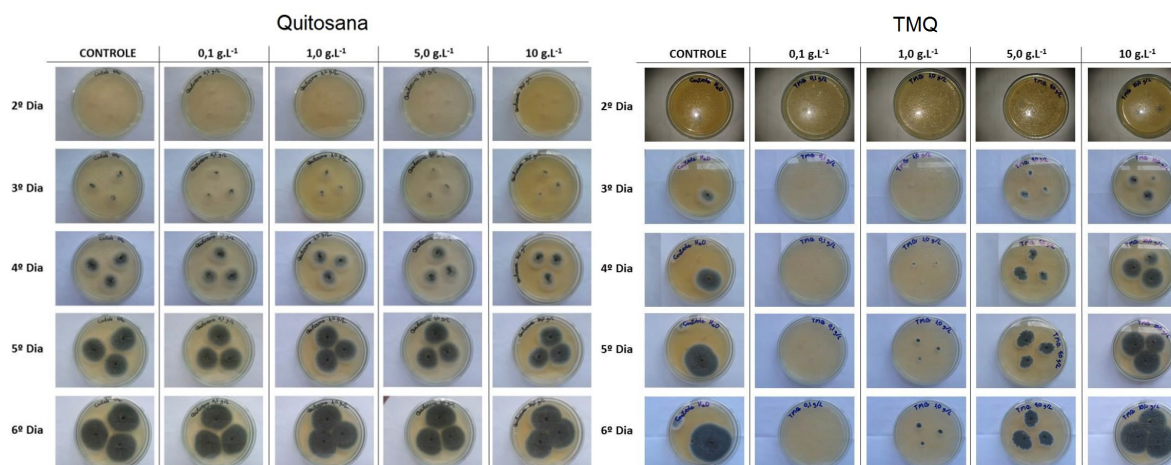


Figura 1. Montagem fotográfica representativa do crescimento radial das colônias de fungo *P. expansum* em meio sólido DBA, sem (controle) e com adições de TMQ.

Nos ensaios realizados com a TMQ, as medidas do crescimento das colônias em meio sólido indicam que este derivado apresenta atividade antifúngica consideravelmente superior a da quitosana comercial, principalmente para as diluições em baixas concentrações (0,1 e 1,0 gL⁻¹). Nestas concentrações o efeito inibidor foi máximo, não sendo possível visualizar crescimento ao longo dos dias observados.

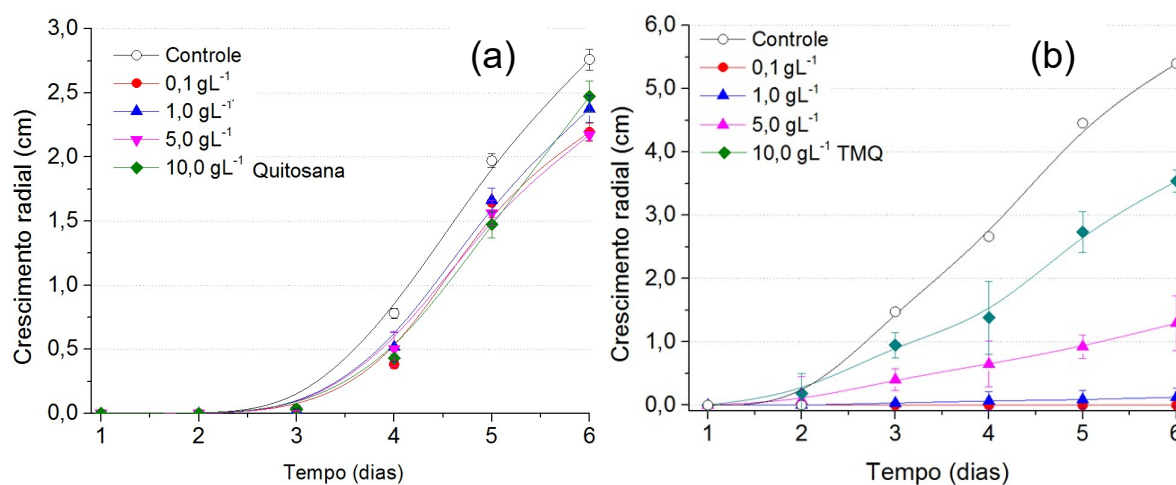


Figura 2. Crescimento radial das colônias do fungo *P. expansum* para ensaios realizados com adição de quitosana (a) e do derivado TMQ (b), em diversas concentrações ao longo do tempo.

O efeito da concentração de quitosana e TMQ na inibição do crescimento do *P. expansum* tem comportamento similar aos registrados em testes conduzidos para bactérias gram-positivas e gram-negativas, em ensaios com os polímeros na forma de gel nos quais menores concentrações proporcionaram uma maior atividade antibacteriana (GOY et al., 2016). Este fenômeno tem sido interpretado em termos do arranjo espacial que as cadeias poliméricas assumem em solução: em baixas concentrações de polímeros, menor é o número de interações intercadeias, o que facilita os acoplamentos dos grupos funcionais laterais com os fosfolípidos da parede celular dos fungos.

Com o aumento da concentração, há um aumento proporcional do volume hidrodinâmico por unidade de massa molar. Isto implica em uma elevação no número de cadeias poliméricas por volume o que favorecendo as trocas iônicas entre os grupos carregados, levando a uma configuração espacial

de densa estrutura sobreposta. Esse efeito tem papel relevante na atividade da quitosana e derivados conforme comprovado em estudos realizados por Goy et al., (2016) e Mendes et al., (2016).

4 CONCLUSÃO

Quitosana de média massa molar e seu derivado quaternizado TMQ apresentaram atividade satisfatória na inibição do crescimento de colônias do fungo *P. expansum* em testes realizados *in vitro*. A quitosana apresentou um melhor desempenho quando dispersa em meio aquoso, reduzindo totalmente a germinação dos esporos. Efeito semelhante foi observado para o ácido acético, aqui tomado como referência considerando que este foi empregado como solvente da quitosana. Independente da concentração adicionada, o derivado quaternizado não foi efetivo na redução do crescimento em meio aquoso. Em meio de cultura sólido contudo, a TMQ tem boa atividade e apresenta uma melhor eficiência quando adicionado em baixas concentrações (0,1 e 1,0 gL⁻¹). Os dados foram discutidos considerando os mecanismos aceitos de ação antimicrobiana da quitosana e de seu derivado em meio sólido e aquoso. Dos resultados gerais depreende-se que ambos os polímeros apresentam ações inibidoras contra *P. expansum*, necessitando serem definidos critérios mais específicos, como concentração, tempo de interação, acidez e meio de solubilização para a definição de aplicação tópica *in vivo* que resulte em boa eficiência na redução do crescimento fúngico.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao apoio financeiro do CNPq (Universal processo 475509/2013-7) e da Rede AgroNano (Embrapa).

REFERÊNCIAS

- BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P. *Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs. Fitopatologia Brasileira, v.29, n.4, p. 433-436, 2004.
- BRITTO, D.; ASSIS, O.B.G. A new method for obtaining of quaternary salt of chitosan. Carbohydrate Polymers. v.69, n.2, p.305-310, 2007.
- 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.
- MANIVASAGAN, P.; SENTHILKUMAR, K.; VENKATESON, J., KIM, S-E. Biological applications of chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives. In: Chitin and Chitosan Derivatives. Kim, S-K. Ed., CRP Press, Boca Raton, FL., pp. 243-260. 2014.
- 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.
- 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.
- GOY, R.C.; MORAIS, C.T.B.; ASSIS, O.B.G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.26, n.1, p. 122-127, 2016.
- SZYMAŃSKA, E.; WINNICKA, K. Stability of chitosan - A Challenge for pharmaceutical and biomedical applications. Marine Drugs, v.13, n.4, p.1819-1846, 2015.