

**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

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

1^a edição

1^a 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
Agropecuaria, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

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

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 (GORNY, 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 microorganismos 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 (saís 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 1×10^6 esporos/mL. Soluções de controle também foram preparadas, adicionando-se os esporos ao solvente puro (sem a presença da quitosana ou saís 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.

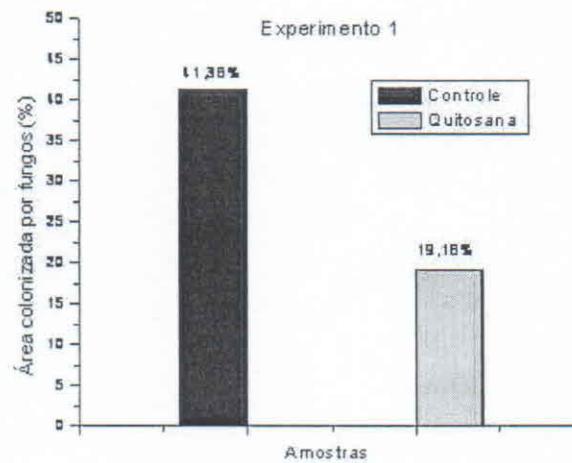


Fig. 1. Comparação da área superficial das maçãs revestida com solução de quitosana e não revestida (controle) após três dias.

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.

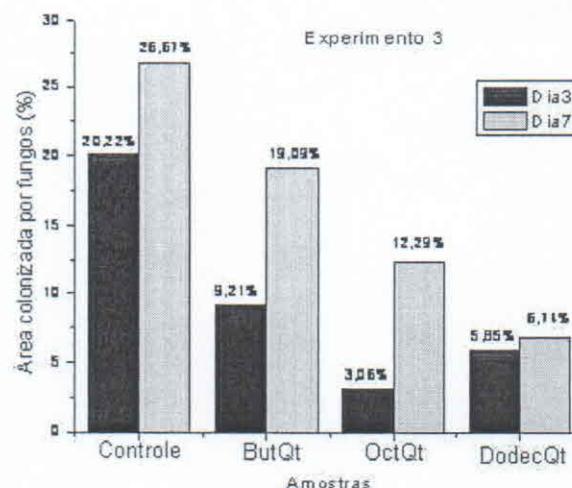


Fig. 2. Comparação da área superficial das maçãs revestida com soluções de sais quaternários de quitosana e não revestida (controle) após 3 e 7 dias em estufa a 25°C.

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.

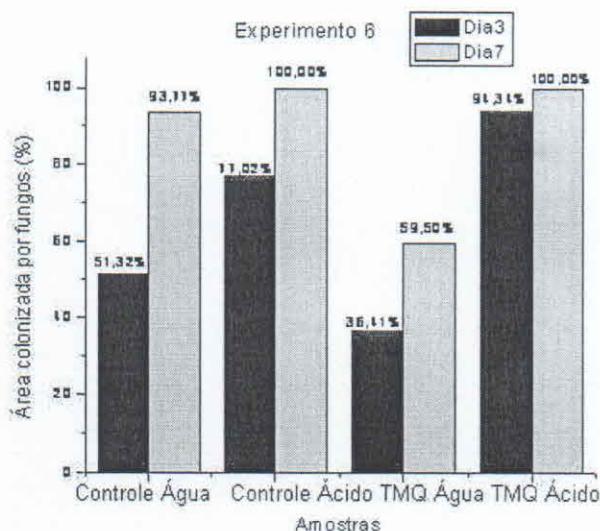


Fig. 3. Comparação da área superficial das maçãs revestida com solução de TMQ e não revestida (controle) após 3 e 7 dias em estufa a 25°C, em meios ácido e neutro.

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.
- GORMY, 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.

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. Ensaios biológicos preliminares para a determinação da mínima concentração inibitória estão em andamento e os resultados preliminares apresentados neste evento.