

ATIVIDADE ANTIFUNGICA DE NANOPARTICULAS DE QUITOSANA EXTRAÍDA DE *CUNNINGHAMELLA ELEGANS*

Mikaella Carla de França Cavalcanti¹; Thayza Christina Montenegro Stamford²

¹Estudante do Curso de Nutrição - CCS – UFPE; E-mail: cfmikaella@gmail.com ²Docente/pesquisador do Depto de Medicina Tropical – CCS – UFPE; E-mail: thayzastamford@yahoo.com.br

Sumário: O presente estudo teve por objetivo preparar nanopartículas de quitosana (NQ) e verificar sua ação antimicrobiana frente a fungos patógenos pré e pós-colheita. As NQ foram obtidas pelo método de gelificação iônica. Os tamanhos dos raios hidrodinâmicos e a morfologia das NQ foram obtidos por Espalhamento Dinâmico de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão, respectivamente. A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de microdiluição seriada para determinação das concentrações mínimas inibitórias e fungicidas. NQ apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos estudados, com ação estática e fungicida. O potencial antimicrobiano das NQ sugere aplicação na preservação de alimentos em diferentes fases de processamento.

Palavras-chave: atividade antifúngica; nanopartículas; quitosana.

INTRODUÇÃO

Quitosana é um heteropolímero natural, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, sendo encontrada na parede celular de fungos. Dentre as inúmeras características que distinguem a quitosana e seus derivados dos demais polissacarídeos, destaca-se a sua bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e potencialidade antimicrobiana (COSTA SILVA et al., 2006). Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de possíveis aplicações como agente antimicrobiano, estabilizante, antioxidante, emulsificante, formulação de biofilmes, redução da respiração de frutos, barreira à perda de umidade, redução da produção de etileno e poligalacturonase em frutos, encapsulação de aromas, e recuperação de subprodutos. As possibilidades de aplicações são ainda aumentadas, pelo fato da quitosana poder ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, microsferas e nanopartículas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006). Nanopartículas de quitosana têm sido desenvolvidas para uso em alimentos visando inúmeras aplicações, tais como: melhorar a hidrofobicidade, continuidade; homogeneidade e manuseabilidade de coberturas comestíveis, prolongar a manutenção da cor e do aroma, principalmente quando aplicadas em frutos. Nanopartículas de quitosana também apresentam ação antimicrobiana intensificada, contudo essa propriedade depende do tipo de solvente usado no preparo das nanopartículas (CRUZ-ROMERO et al, 2013). Neste sentido, frente ao reconhecido potencial biológico da quitosana e de suas nanopartículas, e considerando a obtenção deste polímero a partir de fungo como uma alternativa rentável e promissora, o presente projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de nanopartículas de quitosana extraída da biomassa de *Cunninghamella elegans* crescida em resíduos industriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção e extração de quitosana: A produção e extração de quitosana foram realizadas a partir da biomassa de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), cedida pela Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP. A quitosana foi extraída a partir da massa micelial

liofilizada do fungo. **Determinação do grau de desacetilação (DD%) e do peso molecular:** O grau de desacetilação e o peso molecular da quitosana foram determinados, respectivamente, por espectrometria de raio de infravermelho e por viscosidade.

Preparo e caracterização da nanopartícula de quitosana microbiológica: As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo método de gelificação iônica preconizado por Yang et al., 2010. Os tamanhos dos raios hidrodinâmicos das nanopartículas foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) usando Zetasizer (Nano-ZS, Malvern, UK). A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET - FEI Morgagni) foi usada para observar a morfologia das nanopartículas de cada quitosana. **Preparo dos inóculos e fúngicos e atividade antimicrobiana:** As cepas fúngicas patogênicas pré e pós-colheita de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioide* foram repicadas em Agar Sabouraud e incubadas 37°C, 48h antes da realização do experimento. Em seguida, foram obtidas suspensões padronizadas em 10⁶ células viáveis/mL em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%) pela técnica de exclusão com azul de Tripán em câmara de Neubauer para cada cepa analisada. Para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CIM) e mínimas fungicidas (CFM) da nanopartícula de quitosana foi realizado o teste de microdiluição seriada em placas de 96 poços. Foi utilizado o meio BHI e as concentrações de nanopartícula de quitosana variando de 0 a 600µg/mL. Para determinação da CIM foi utilizado como revelador de viabilidade fúngica o corante resazurina. A CFM foi considerada como sendo a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo, na ausência da nanopartícula de quitosana.

Análises estatísticas: Dentre os tratamentos aplicados, foram utilizados testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e teste de Tukey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes (p<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de desacetilação e o peso molar da quitosana utilizada no ensaio antimicrobiano (Qce) foi, respectivamente, de 5,6 x 10⁵ g/mol (±0,1) e 80%GD (±3). O valor da massa molar média da quitosana QCe está de acordo com os relatados na literatura por Santos et al. (2003) e Anjos (2005). A atividade antimicrobiana da nanopartícula de quitosana em relação aos fungos filamentosos fitopatogênicos testes foi avaliada segundo a determinação da concentração mínima fungioestática e da concentração mínima fungicida. Como se pode observar pelos resultados descritos na tabela 2. As nanopartículas de quitosana inibiram o crescimento dos fungos filamentosos testados, com efeito estático e fungicida. É importante salientar que a nanopartícula de quitosana apresentou CIM (31,98 mg.mL⁻¹) e CFM (47,97 mg.mL⁻¹) igual para todos os fungos testados, exceto para *A. niger* e *A. flavus*, e *B. cinerea* que apresentaram CIM de 47,97 mg.mL⁻¹ e de 23,98 mg.mL⁻¹, respectivamente e CFM de 63,96 mg.mL⁻¹ e 31,98 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de nanopartícula de quitosana (NQ) para amostras de fungos filamentosos fitopatogênicos.

FUNGOS	CIM	CFM
	NQ	NQ

<i>Aspergillus Níger</i>	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	63,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Aspergillus flavus</i>	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	63,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Fusarium oxysporum</i>	31,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Penicilium expansum</i>	31,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Rhizopus stolonifer</i>	31,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Botritis cinérea</i>	23,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	31,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	31,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	47,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

CONCLUSÕES

O emprego antimicrobiano do cloridrato de quitosana foi comprovado, ao inibir o crescimento dos fungos filamentosos testados, com efeito estático e fungicida. Seu potencial antimicrobiano faz com que essa substância possa ser aplicada na prevenção de contaminações em diferentes fases do processamento de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa- CNPq pelo auxílio financeiro, ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, pela realização da microscopia eletrônica de transmissão e o espalhamento dinâmico de luz.

REFERÊNCIAS

1. ANJOS, F.S.C. Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de química fundamental. 2005, 93p.
2. BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F.M., et al.. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42: 3569-3580, 2001.
3. FAI, A.E.C.; STAMFORD, T C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.A.; SILVA, M.C. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.L. M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Molecules*. 16, 7143-7154, 2011
4. FIGUEIREDO, J.F.D. Compósitos hidroxiapatita: Quitosana. Preparação, caracterização e aspectos físico-químicos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2002. 69p.
5. LAVERTU M, XIA Z, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32:1149-1158, 2003.
6. NUNTHANID J, et al. *Drug development and Industrial Pharmacy*, 27:143-157, 2001.
7. PALOMINO, J., C. et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 2720, 2002
8. ROBERTS, G.A.F. *Chitin Chemistry*. The Macmillan Press, London. 1992; 368p.
9. SANTOS, J. E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, EDWARD R.; FILHO, S.C.; CAVALHEIRO, E.TG. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímero: Ciência e Tecnologia*, 13, 4, 242-249, 2003.
10. STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; NETO, B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10, 8-2007.

11. YANG, H.C.; WANG, W.H.; HUANG, K.S.; HON, M.H. Preparation and application of nanochitosan to finishing treatment with anti-microbial and anti-shrinking properties. *Carbohydrate Polymers*, 79 (2010) 176-179.
12. ZHANG H, OH M, ALLEN C AND KUMACHEVA E. Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery. *Biomacromolecules*, 2004, 5 (6), 2461-2468.