

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA EXTRAÍDA DE *Cunninghamella elegans*

Jéssica Rodrigues Delmiro Carneiro da Silva¹; Thayza Christina Montenegro Stamford²

¹Estudante do Curso de Nutrição – CCS – UFPE; E-mail: jessica.rdc.nut@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Medicina Tropical – CCS – UFPE; E-mail: thyzastamford@yahoo.com.br

Sumário: O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana e citotoxicidade de nanopartículas de quitosana extraída da biomassa de *Cunninghamella elegans* crescida em resíduos industriais. Quitosana foi obtida da biomassa de *C. elegans*, crescida em meio contendo milho 5% e maniveira 10%, 28°C, 150rpm, 72h e extraída por tratamento álcali-acido. Quitosana foi caracterizada quanto ao grau de desacetilação por Espectroscopia de Raio de Infra-vermelho (80%GD) e quanto ao peso molar por viscosidade ($5,6 \times 10^5$ g/mol). As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo processo de gelificação iônica e caracterizadas pelos métodos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão. A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de diluição seriada para determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas. Além disso, as nanopartículas de quitosana também foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade, através de ensaio MTT. As nanopartículas de quitosana apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos estudados, com ação estática e cida, e mostraram-se atóxicas diante do teste de citotoxicidade. Seu potencial antimicrobiano sugere sua aplicação na preservação de alimentos em diferentes fases de processamento.

Palavras-chave: antimicrobiano; citotoxicidade; *Cunninghamella elegans*; 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, microesferas 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). Observa-se, todavia, grande distância entre pesquisa e realidade comercial, evidenciando-se que um dos aspectos que têm dificultado a

aplicação de nanopartícula de quitosana, assim como da quitosana como antimicrobiano é a falta de padronização do polímero. Os tipos de quitosana disponíveis são de procedências diversas e não apresentam uniformidade em suas características físico-químicas. Esta heterogenicidade torna os materiais comerciais consideravelmente diferentes entre si, dificultando, dessa maneira, o estabelecimento de um processamento padrão para a obtenção da molécula, e conseqüentemente de suas aplicações com características reprodutíveis. Desta forma, poder-se-ia atribuir mais um benefício à quitosana extraída de fungos, cuja obtenção e características físico-químicas podem ser padronizadas, quanto à sua aplicação no segmento alimentício, visto que a quitosana derivada de crustáceos é considerada relativamente inconsistente quanto às suas propriedades físico-químicas devido à variação da própria matéria-prima, contaminação por proteínas e efeitos cáusticos dos produtos químicos necessários à síntese em altas temperaturas, resultando em hidrólise da cadeia (STAMFORD et al 2007). 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 antibacteriana e citotoxicidade de nanopartículas de quitosana extraída da biomassa de *Cunninghamella elegans* crescida em resíduos industriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

A quitosana foi obtida da biomassa de *C. elegans*, crescida em meio contendo milhorcina 5% e manipueira 10%, 28°C, 150rpm, 72h e extraída por tratamento álcali-acido, e caracterizada quanto ao grau de desacetilação por Espectroscopia de Raio de Infravermelho, e peso molar por viscosidade. As nanopartículas de quitosana foram obtidas pelo processo de gelificação iônica e caracterizadas pelos métodos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) usando Zetasizer (Nano-SZ, Malvern, UK) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET-FEI Morgagni). As medidas de DLS foram operadas com o comprimento de onda de 633nm a 25°C com um ângulo de detecção de 90°. As amostras foram diluídas em ácido acético 1% (16 µmol/L) em água MilliQ. Três medidas subsequentes foram determinadas para cada amostra. Quanto a preparação para MET, as suspensões de nanopartículas foram diluídas em água MilliQ para 1:20 (v/v) e depois foi feito o contraste negativo com solução de ácido fosfotungstíco 1% (PTA). As amostras foram gotejadas em grades de cobre e para remover o excesso foi usado papel de filtro. A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de diluição seriada para determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas (CIM e CBM, respectivamente) contra cepas de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para isso, utilizou-se placas de 96 poços contendo meio BHI (Brain Heart Infusion) e nanopartículas de quitosana em concentrações de 0 a 600µg/mL. Para determinação da CIM foi utilizado como revelador de viabilidade bacteriana o corante resazurina. A CBM foi considerada como sendo a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo, na ausência das nanopartículas de quitosana. Além disso, as nanopartículas de quitosana também foram submetidas à teste de citotoxicidade (ensaio do 3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL]-2,5-BROMETO DE DIFENIL TETRAZÓLICO : MTT). As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) e HEp-2 (carcinoma de laringe humana) mantidas em meio de cultura DMEM e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e RAW 264.7 (macrófagos murinos) mantidas em meio de cultura RPMI. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a

37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. As células NCI-H292, HEP-2, MCF-7 e RAW 264.7 (10⁵ células/mL) e HL-60 (0,3 x 10⁶ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%) foram adicionadas aos poços em concentração final de 50 µg/mL. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizado como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism 5.0*.

RESULTADOS

A produção de quitosana a partir da biomassa de *C. elegans* teve rendimento de 10,86 mg/g, e apresentou grau de desacetilação e peso molar de 80% GD e 5,6 x 10⁵ g/mol., respectivamente. Quanto às nanopartículas de quitosana preparadas por gelificação iônica, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) revelou partículas individualizadas, com distribuição homogênea. Segundo os resultados obtidos pelo Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), as nanopartículas de quitosana apresentaram tamanho ligeiramente inferior ao evidenciado pela MET. De acordo com a análise de atividade antimicrobiana, as nanopartículas de quitosana inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas, com efeito estático e cida, como descrito na Tabela 1.

Microrganismos	NQ mg/mL	
	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,98	47,97
<i>Escherichia coli</i>	23,98	31,98
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47,97	63,96
<i>Enterococcus faecalis</i>	47,97	63,96
<i>Listeria monocytogenes</i>	31,98	47,97
<i>Salmonella enterica</i>	31,98	47,97

Tabela 1. Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) das nanopartículas de quitosana microbiológica, para bactérias patogênicas.

O ensaio MTT evidenciou que as nanopartículas de quitosana foram atóxicas frente às linhagens de células testadas, quando considerado seu percentual de inibição abaixo de 50% (Tabela 2).

Tabela 2. Citotoxicidade das nanopartículas de quitosana frente às linhagens de células NCI-H292, HEP-2, MCF-7, HL-60 e RAW.

Produtos teste	% de inibição									
	NCI-H292	SEM	HEP-2	SEM	MCF-7	SEM	HL-60	SEM	RAW	SEM
Amostra	22,54	1,76	8,03	0,73	4,01	0,00	4,26	0,00	13,92	0,79

*SEM: Erro padrão médio.

DISCUSSÃO

O grau de desacetilação encontrado para a quitosana extraída da biomassa de *C. elegans* (80% GD) sugere que a mesma não se encontra totalmente deacetilada. O peso molar encontrado (5,6 x 10⁵ g/mol) corrobora com os valores relatados na literatura. A

discreta diferença evidenciada pelos métodos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), quanto ao tamanho das nanopartículas de quitosana, não caracteriza os resultados encontrados como incompatíveis, já que o segundo método fornece apenas uma pequena porção das nanopartículas isoladas do meio. A determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana demonstrou valores iguais de CIM e CBM para *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella entérica* (31,98 mg/mL e 47,97 mg/mL, respectivamente), ocorrendo o mesmo para *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, que apresentaram CIM de 47,97 mg/mL e CBM de 63,96 mg/mL. A *Escherichia coli* exibiu os menores valores para CIM e CBM, quando comparada as demais bactérias. As nanopartículas de quitosana podem ser consideradas atóxicas (inibição de crescimento celular abaixo de 50%), diante dos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade (MTT). Vale salientar que para determinação do potencial citotóxico da amostra foi utilizada uma escala de intensidade, onde: amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES et al., 2014).

CONCLUSÕES

O potencial antimicrobiano da nanopartícula de quitosana foi comprovado, através da inibição das bactérias patogênicas testadas, com efeito estático e cida. Sendo assim, o emprego dessa substância apresenta-se como uma alternativa promissora para a prevenção de contaminações em diferentes fases do processamento de alimentos, principalmente diante do seu caráter atóxico e biocompatibilidade.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos CNPq e Propesq pelo subsídio dado a esta pesquisa. À professora Thayza C. Montenegro Stamford pela orientação. Ao Departamento de Nutrição, Departamento de Antibióticos e CETENE pela colaboração.

REFERÊNCIAS

- BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARD, A.N.; VELÁZQUEZ-DEL-VALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; et al.. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, 25, 108-, 2006.
- COSTA SILVA, H. S. R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, 29, 776-785. 2006.
- CRUZ-ROMERO, M.C.; MURPHY, T.; MORRIS, M. CUMMINS, E. KERRY, J.P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications **Food Control**, 2013.
- RODRIGUES, F. A. R. et al. Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *ChemBiol Drug Des*, v. 83, p. 126–131, 2014.
- 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.