

PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E APLICAÇÃO COMO REVESTIMENTO EM BLENDA DE AMIDO DE MANDIOCA E POLI(ÁCIDO LÁTICO)

PRODUCTION OF CHITOSAN NANOPARTICLES AND APPLICATION AS COATING IN STARCH AND POLY(LACTIC ACID) SHEETS

RESUMO

Neste trabalho nanopartículas de quitosana (NPQ) foram sintetizadas por gelificação iônica e foram utilizadas no recobrimento de laminados a base de blenda de amido e poli(ácido láctico) (TPS/PLA) produzidas por extrusão termoplástica. Nas NPQ determinou-se o diâmetro médio, a morfologia por microscopia eletrônica de transmissão e a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus ochraceus*. Nos laminados de TPS/PLA recobertos com NPQs foram determinadas as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água. As NPQ foram produzidas com êxito através do método de gelificação iônica, o diâmetro médio foi de 146,9 nm, o índice de polidispersão foi de 0,281 e apresentaram morfologia esférica. Porém, as NPQ não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos estudados e seu uso como recobrimento em laminados de TPS/PLA não alteraram as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; gelificação iônica; extrusão termoplástica; material biodegradável.

ABSTRACT

In this work chitosan nanoparticles (CNP) was produced by ionic gelation and used as coating in starch (TPS) and poly(lactic acid) (PLA) sheets produced by thermoplastic extrusion. In the CNP the average diameter, the morphology by transmission electronic microscopy and the antimicrobial activity against the microorganism *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium expansum* and *Aspergillus ochraceus* were determined. In the TPS/PLA sheets coated with CNP the mechanical properties and water vapor permeability (WVP) were determined. The CNP were successfully produced by ionic gelation method, the average diameter was 146.9 nm, the polydispersity index was 0.281 and showed spherical shape. However, CNP did not show antimicrobial activity against the microorganism studied and their use as a coating on TPS/PLA sheets did not alter the mechanical and water vapor barrier properties.

Key-words: antimicrobial activity; ionic gelation; thermoplastic extrusion; biodegradable material.

1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, composta por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β (1-4). O grupo amino (NH₂) presente em sua estrutura, quando em meio ácido, apresenta cargas positivas devido à sua protonação (NH₃⁺). Geralmente é encontrada em carapaças de crustáceos (caranguejo, lagosta e camarões) e insetos, podendo ser produzida também por fungos (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* e *Penicillium notatum*) (Abdou et al., 2008, Elsabee e Abdou, 2013).

A quitosana possui grande potencial para ser utilizada na produção de embalagens alimentícias e como veículo para liberação controlada de fármacos e aditivos, podendo ser empregada em diferentes formas, tais como microesferas, flocos, nanopartículas, fibras e filmes. A crescente aplicação da quitosana na forma de nanopartículas se deve ao fato de esta ser um polissacarídeo natural, abundante, biodegradável e com atividade antimicrobiana (Agulló et al., 2003; Lorevice; Moura; Mattoso, 2014; Ravi Kumar, 2000; Sullivan et al., 2018).

Acredita-se que a atividade antimicrobiana da quitosana ocorre através da interação eletrostática entre as cargas positivas de grupos amino presentes na estrutura da quitosana e a carga negativa na superfície da célula bacteriana, interferindo no funcionamento da membrana e impedindo sua multiplicação. Além disso, a quitosana pode afetar a morfogênese da parede celular e interferir diretamente sobre a atividade de enzimas responsáveis pelo crescimento de fungos (Ravi Kumar, 2000; Pedro et al., 2013). A atividade antimicrobiana de quitosana e nanopartículas de quitosana foi descrita com sucesso frente a diferentes microrganismos (Qi et al., 2004; Du et al., 2009).

Diferentes métodos de produção de nanopartículas de quitosana encontram-se disponíveis na literatura, sendo que a técnica de gelificação iônica apresenta algumas vantagens, pois as nanopartículas são obtidas em condições que não envolvem o uso de solventes orgânicos tóxicos e altas temperaturas de processo. Este método é baseado na interação eletrostática entre o grupamento amino da quitosana e as cargas negativas de um poliânion, como o tripolifosfato de sódio (TPP). Devido à complexação das cargas opostas, a quitosana sofre gelificação iônica e precipita formando partículas esféricas (Calvo et al., 1997; Kumari; Yadav; Yadav, 2010). Pesquisas sobre o uso de blendas contendo polímeros biodegradáveis, como o amido e o poli (ácido lático) (PLA), vem ganhando destaque no setor de embalagens para alimentos, pois ambos os materiais são biodegradáveis e provenientes de fonte renovável (Shirai et al., 2015; Pizzoli et al., 2016). Frente aos benefícios ambientais propostos pelo uso dessas blendas, a viabilidade econômica e tecnológica destes materiais seria incrementada se estes além de possuírem a função de proteger os alimentos de agentes externos, atuassem como uma embalagem ativa, que se caracterizam por alterarem as condições do ambiente ao redor do alimento para prolongar a sua vida útil, mantendo as propriedades sensoriais, nutricionais e de segurança do produto (Yam; Takhistov; Miltz, 2005).

Muitos estudos relatam a aplicação das nanopartículas de quitosana em filmes (Lorevice; Moura; Mattoso, 2014; Lorevice et al., 2016; Moura et al., 2009) e compósitos (Chang et al., 2010) produzidos pela técnica de casting e nenhum trabalho foi encontrado sobre a incorporação destas em materiais a base de amido termoplástico (TPS) e PLA obtidos pelo processo de extrusão. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi de sintetizar nanopartículas de quitosana pela técnica de gelificação iônica e utilizar no recobrimento de superfície de laminados de TPS/PLA produzidos por extrusão plana (calandragem). As NPQ foram caracterizadas quanto à distribuição de tamanho, morfologia e atividade antimicrobiana e nos laminados contendo NPQ foi determinada a propriedade mecânica e a permeabilidade ao vapor de água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As nanopartículas foram sintetizadas utilizando-se quitosana de baixo peso molecular (Sigma Aldrich, EUA) com grau de desacetilação de 85%, tripolifosfato de sódio (Vetec, Brasil) e ácido acético glacial (Vetec, Brasil). Para as análises microbiológicas foram utilizados Ágar Batata Dextrose (Neogen, Brasil), Caldo e ágar Müeller Hinton (Himedia, Índia), Peptona Bacteriológica (Himedia, Índia) e Tween 80 (LabMaster, Brasil). Os laminados foram produzidos utilizando amido de mandioca nativo (Indemil, Brasil), PLA Ingeo 4043D (Natureworks LLC, Cargill, USA) e glicerol (Dinâmica, Brasil).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As NPQs foram sintetizadas pela técnica de gelificação iônica de acordo com Calvo et al. (1997) e Neves et al. (2015), com algumas modificações. O volume de 8 mL da solução de TPP (1 mg/mL) foi adicionado por gotejamento e sob agitação magnética a 15 mL de solução de quitosana (2 mg/mL), previamente dissolvida em ácido acético 0,1 M e com pH ajustado para 4,4. Após a adição de TPP, as soluções foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 hora. A concentração de quitosana e TPP ao final do processo foi de 1,3 mg/mL e 0,3 mg/mL. A proporção de quitosana e TPP, bem como as condições de processo foram definidas por testes preliminares.

2.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NPQ

O tamanho médio das NPQ foi determinado por dispersão de luz dinâmica (DLS, Malvern Zetasizer Nano S). A morfologia das NPQ foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (JEOL, JEM-1011 a 80 kV). A solução de NPQ foi gotejada

sobre um grid de cobre (200 Mesh, Electron Microscopy Sciences) previamente recoberto com colódio. O grid contendo a NPQ foi mantido em dessecador para secagem até o momento da análise.

A atividade antimicrobiana das NPQ foi determinada pela técnica de difusão em poço, utilizando as bactérias *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), e os fungos *Penicillium expansum* n. 2 e *Aspergillus ochraceus* isolado de frutos de café e proveniente de cultura monospórica. Para o ensaio com as bactérias, inicialmente estas foram reativadas em caldo Müeller Hinton a 35-37°C por 24 horas, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland com escala de 0,5. Em seguida, placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton foram adicionados da suspensão bacteriana e poços foram feitos com um cilindro de aço inoxidável estéril (diâmetro de 6 mm), e os mesmos foram preenchidos com 0,1 mL de solução de NPQ. As placas foram incubadas a 35-37 °C por 24-48 horas e observou-se a formação de halo de inibição.

Para a atividade antifúngica, repiques das cepas de *P. expansum* e *A. ochraceus* foram mantidas a 27°C por 5 dias. Os esporos foram padronizados na concentração de 1×10^5 mL/esporos com solução de Tween 80 e contagem em câmara de Neubauer. Após a padronização, os esporos foram semeados em placas de Petri contendo ágar Batata Dextrose (BDA) e poços foram feitos com auxílio de um cilindro de aço inoxidável estéril (diâmetro de 6 mm) e os mesmos foram preenchidos com 0,1 mL de solução de NPQ. As placas foram incubadas a 27°C por 5 dias e observou-se a presença ou ausência de halo de inibição.

2.2.3 PRODUÇÃO DOS LAMINADOS DE TPS/PLA

O laminado de TPS e PLA foi produzido de acordo com Shirai et al. (2015) e consistiu em 50% (m/m) de PLA, 37,5% (m/m) de amido de mandioca e 12,5% (m/m) de glicerol. Inicialmente foi feita a homogeneização dos componentes da blenda em extrusora dupla rosca co-rotacional (marca BGM, modelo D-20, Brasil), empregando-se as seguintes condições: diâmetro das roscas de 20 mm, L/D 35, velocidade dos parafusos de 100 rpm, velocidade do alimentador de 30 rpm e perfil de temperatura 100 / 180 / 180 / 180 / 180°C. Em uma segunda etapa, os extrudados obtidos na forma de perfis cilíndricos foram peletizados e processados na mesma extrusora dupla rosca acoplada a uma calandra laminadora (AX – Plásticos, Brasil). O perfil de temperatura empregado foi de 100 / 170 / 170 / 170 / 175°C, a velocidade do alimentador e do parafuso foram iguais ao da etapa de preparação das blendas.

2.2.4 APLICAÇÃO DAS NPQ NOS LAMINADOS DE TPS/PLA

Para o revestimento dos laminados de TPS/PLA, a solução de NPQ foi incorporada a uma solução contendo 3% de amido de mandioca (m/m) previamente gelatinizada a

80°C. A solução de NPQ foi adicionada ao gel de amido na concentração de 10 e 20% (m/m) e em seguida os laminados de TPS/PLA (10 cm x 20 cm) foram imersos nessas misturas por um período de 30 segundos e secos em estufa com circulação de ar a 40°C / 12 horas. As formulações foram denominadas como C (Controle, sem aplicação), NPQ10 (gel de amido com 10% de NPQ) e NPQ20 (gel de amido com 20 % de NPQ).

2.2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS LAMINADOS CONTENDO NPQ

Os testes de tração foram realizados em texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA XTplus, Inglaterra), conforme os métodos e normas da American Society for Testing and Material (ASTM D882-02, 2002). As propriedades determinadas foram resistência máxima à tração, alongação na ruptura e módulo de Young. A permeabilidade ao vapor foi determinada por método gravimétrico, conforme o método da American Society for Testing and Material (ASTM E-96-00, 2000).

2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$) ao controle.

Comportamento diferente foi relatado por Alberti et al. (2015) e Bie et al. (2013), onde a adição de quitosana in natura em blendas de amido e PLA comprometeram as propriedades dos materiais a partir da redução de T e E.

Os valores de PVA variaram de 2,92 a 3,18 x 10⁻⁶ g.Pa⁻¹.m⁻¹.dia⁻¹ e não apresentaram diferença significativa em relação aos resultados relatados por Alberti et al. (2015), Pizzoli et al. (2016), Pizzoli et al. (2017) e Shirai et al. (2015). Do mesmo modo que as propriedades mecânicas, não foi observada diferença nos valores de PVA. Esses resultados sugerem que os laminados de TPS/PLA atuaram como um suporte efetivo para incorporação de NPQ, sem interferir nas propriedades funcionais dos mesmos. Resultados diferentes foram observados em filmes de hidroxipropilmetilcelulose, filmes de pectina e compósitos de amido produzidos por casting, onde a adição de NPQ melhorou significativamente as propriedades mecânicas e de barreira, além de conferir maior estabilidade térmica aos materiais (Lorevice; Moura; Mattoso, 2014; Lorevice et al., 2016; Moura et al., 2009). A diferença nos resultados se deve principalmente aos métodos utilizados para a produção dos materiais.

4 CONCLUSÃO

As NPQ foram sintetizadas com sucesso pela técnica de gelificação iônica, pois apresentaram tamanho nanométrico e distribuição de tamanho homogêneo. A aplicação das NPQ em laminados de TPS/PLA não afetaram as propriedades mecânicas e de barreira ao vapor de água. Entretanto, é necessário um melhor estudo da produção de nanopartículas de quitosana visando uma atividade antimicrobiana relevante para viabilizar a aplicação em alimentos e na produção de embalagens ativas para conservação de alimentos.