

4.03.01 - Farmácia / Farmacotecnia

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE BEADS A BASE DE NANOCOMPÓSITO POLIMÉRICO COMO MATRIZ DE AGENTE BIOATIVO

Lucas T. C. do Nascimento Bezerra^{1*}, Diogo P. C. Batista², Henrique F. Goulart³, Antônio E. G. Santanna⁴, Luciano A. M. Grillo⁵, Camila B. Dornelas⁶

- 1 Graduando do curso de Farmácia da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL
- 2 Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Materiais do Centro de Tecnologia da UFAL
- 3 Professor/Pesquisador do Centro de Ciências Agrárias da UFAL
- 4 Professor/Pesquisador do Centro de Ciências Agrárias da UFAL
- 5 Professor/Pesquisador da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL
- 6 Professora/Pesquisadora do PPGMat do Centro de Tecnologia da UFAL / Orientadora

Resumo:

A encapsulação de agentes bioativos em matrizes poliméricas é de grande importância na manutenção da qualidade dos mesmos, sobretudo quando em associação com outros compostos para para melhoramento das propriedades. Diante disso, avaliou-se um nanocompósito polimérico como matriz para encapsulação de um agente entomopatogênico. Conídios fúngicos em suspensão foram encapsulados em *beads* alginato/bentonita por gelificação ionotrópica. Estereoscopia binocular, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência dos conídios encapsulados foram utilizadas para caracterização morfológica do sistema. A visualização de conídios na superfície dos *beads* por MEV somente foi possível nas matrizes sem bentonita. Contudo, seções transversais revelaram conídios distribuídos homogeneamente na matriz. Imagens de fluorescência confirmaram este sistema monolítico de distribuição, indicando boas propriedades de encapsulamento e de proteção do silicato na matriz.

Palavras-chave: Encapsulação de bioativos; sistema monolítico de distribuição; caracterização morfológica.

Apoio financeiro: CAPES, CNPQ, FACEPE/CETENE, FINEP e FAPEAL.

Introdução:

A ocorrência de pragas em cultivares mostra-se um grande desafio para a agricultura, portanto, o êxito da implantação de técnicas de controle se torna indispensável para o sucesso do cultivo. Nos últimos anos as práticas “ecofriendly” tem conquistado espaço no Manejo Integrado de Pragas (MIP). A utilização de entomopatógenos surge como uma forma segura e eficiente, com aplicação consolidada e apresentando efeitos mínimos ou nulos sobre espécies não-alvo. O fungo *Beauveria bassiana* é um exemplo bem-sucedido desta aplicação, no entanto, seus conídios são muito sensíveis a fatores abióticos, como umidade, temperatura e radiação. Portanto, a utilização de matrizes poliméricas ou materiais híbridos na encapsulação destes agentes bioativos pode proporcionar a manutenção de suas propriedades intrínsecas. Logo, sendo uma matriz biodegradável, o alginato é um dos compostos mais utilizados para tal finalidade. Contudo, este biopolímero apresenta algumas limitações como: baixa resistência mecânica, elevada porosidade e instabilidade no hidrogel diante de íons monovalentes. Sua combinação com argilas lamelares tem atraído grande interesse, principalmente as silicatadas como a bentonita, uma esmectita composta predominantemente por montmorilonita (MMT). Nanocompósitos polímero-silicato lamelar (*Polymer-Layered Silicate Nanocomposite* – PLN) podem ser obtidos por meio dessa combinação. Desta forma, o atual estudo foi dedicado à caracterização morfológica destes produtos bem como o mapeamento do bioativo no interior da matriz, como complemento de resultados promissores encontrados em estudos anteriores do nosso grupo e que abrem precedentes para a obtenção de produtos com propriedades otimizadas.

Metodologia:

Preparo das formulações

As formulações foram preparadas como descrito em Batista et al. (2017) [1], de maneira que a solução aquosa de alginato de sódio (Sigma-Aldrich, Alemanha) se encontrasse em uma concentração final de 1%. Em seguida foi adicionada suspensão aquosa de bentonita sódica (Bentec Laviosa Chimica Mineraria S.p.a, Itália) em diferentes concentrações, sendo estabelecidas em função deste parâmetro, como AB0; AB2; AB4 e AB6, para 0, 2, 4 ou 6% de bentonita, respectivamente. Cada formulação foi submetida à agitação magnética por um período de 4 horas, e após a adição da suspensão fúngica contendo 10^8 con/mL (na proporção de 1/1 – suspensão/matriz), a formulação foi submetida a mais 1 hora de agitação magnética. Em seguida foi realizada extrusão em cloreto de cálcio 0,25 M (Vetec, Brasil), resultando na gelificação inotrópica do alginato e na formação de *beads* [2]. Estes permaneceram na solução de cloreto de cálcio por mais 30 minutos para a incorporação de íons de cálcio e rigidez de sua estrutura. Os *beads* foram submetidos a filtração simples, lavados com água deionizada para a interrupção do processo de incorporação de cálcio e então submetidos à secagem por fluxo de ar [3] por 12 horas em temperatura ambiente. Desta forma, foram obtidos *beads* secos que foram armazenados sob refrigeração a uma temperatura de 4°C (+/- 2°C) até o momento da análise. Também foram produzidas amostras controle, ou seja, sem conídios, pelos mesmos métodos para avaliação da matriz.

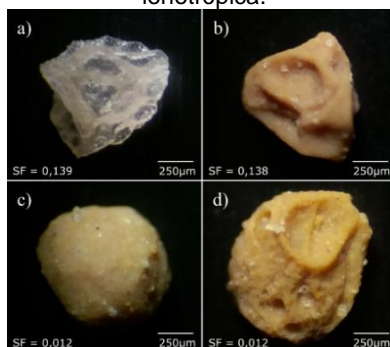
Morfologia e distribuição do bioativo

Foram utilizadas as técnicas de estereoscopia binocular, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência. Imagens dos *beads* secos foram obtidas por meio de um microscópio estereoscópio binocular modelo Meiji Techno-EMZ. As análises de MEV foram realizadas em um microscópio Shimadzu SSX-550 Superscan. Os *beads* secos foram recobertos por ouro no metalizador Sanyu Electron, modelo QuickCoater SC-701, com corrente de 10mA durante 8 minutos, e observados em seu formato original ou seccionados ao meio com a face de corte exposta a visualização. Antes da microscopia de fluorescência, o iodeto de propídio (IP) foi utilizado como corante para bioativo, com o objetivo de mapear a distribuição dos conídios no interior dos *beads*. Alíquotas de 50 microlitros da biomassa fermentada foram espalhadas na superfície de lâminas de microscopia, fixadas por evaporação e cobertas com solução corante durante 3 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água deionizada para remoção do excesso de corante, e após a secagem, estes conídios foram ressuspensos na matriz de encapsulação e submetidos à gelificação inotrópica como citado anteriormente. Foram visualizados tanto *beads* intumescidos quanto secos. As lâminas foram observadas em microscópio invertido de fluorescência (ZEISS Observer Z. 1 ApoTome) selecionando-se comprimento de onda de 543nm.

Resultados e Discussão:

As imagens de estereoscopia binocular dos *beads* contendo diferentes proporções do silicato são mostradas na Figura 1. No momento da gelificação inotrópica da matriz, todos os produtos se apresentaram esféricos, contudo, após o processo de secagem, os *beads* assumiram formato irregular. *Beads* AB0 exibiram uma forma bastante assimétrica após o processo de secagem, como mostrado nas figuras 1 (a). À medida que a concentração de bentonita é elevada, pode-se perceber que os *beads* tendem a preservar sua forma inicial, como ilustrado nas figuras 1 (b), 1 (c) e 1 (d) que representam AB2, AB4 e AB6, respectivamente.

Figura 1: Imagens de microscopia óptica de *beads* com diferentes concentrações de bentonita após secagem por fluxo de ar, em (a) AB0, (b) AB2, (c) AB4 e (d) AB6. Nota-se que o aumento da concentração do silicato tende a preservar o formato inicial dos *beads* após a gelificação ionotrópica.

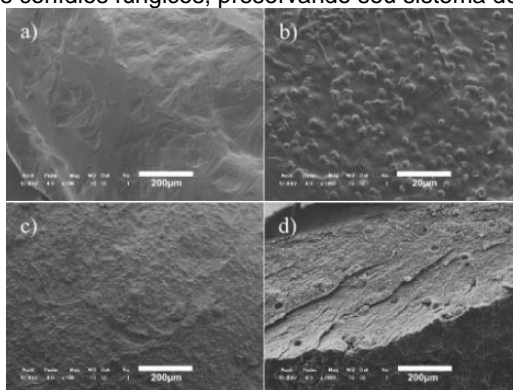


Fonte: Autor, 2017.

Nas imagens obtidas por MEV, os *beads* contendo bioativos e formados apenas pelo polímero como matriz (sem silicato – AB0), demonstraram a presença de conídios na superfície, vistos em alto relevo na face externa do produto, recobertos por uma fina camada do polímero e distribuídos homoganeamente por toda extensão da área observada (Fig. 2b). O controle, ou seja, os produtos sem conídios, demonstraram superfície lisa, sem a presença do bioativo (Fig. 2a).

Já para os produtos contendo bentonita, a camada externa dos *beads* se mostrou irregular e bastante rugosa, porém, sem a presença de conídios, o que demonstrou um potencial de capacidade de proteção proporcionada pelo silicato através do recobrimento de internalização do ativo. A figura 2c ilustra AB4, tomada como exemplo dentre as matrizes a base de PLN.

Figura 2: Imagens de MEV de *beads* com diferentes composições: a) *bead* AB0 sem conídios (controle), b) *bead* AB0 com conídios, c) *bead* AB4 com conídios, e d) secção de um *bead* AB4 contendo conídios distribuídos homoganeamente na matriz. Observe que a bentonita atua como agente protetor para os conídios fúngicos, preservando seu sistema de distribuição monolítico.



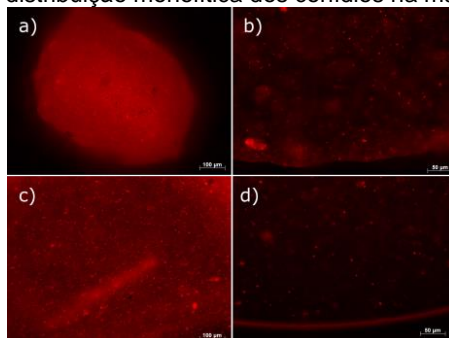
Fonte: Autor, 2017.

A partir desta observação, foram realizadas micrografias de secções destes *beads* com exposição de seu interior. A face de corte dos produtos foi posicionada de forma que pudesse ser visualizada diretamente através da microscopia. Estes cortes demonstraram a presença dos conídios dispersos homoganeamente por toda a matriz de encapsulação (Fig. 2d). Nesta imagem também podem ser observadas cavidades no formato dos conídios, arcaçouços que possivelmente abrigavam o bioativo e que foram removidos no momento do corte.

A Figura 3 ilustra as micrografias de fluorescência, as quais corroboraram com esses achados. *Beads* secos (Fig. 3 a-c) e *beads* intumescidos (Fig. 3 d-e) foram analisados. Como pode ser verificado, os conídios corados com IP apresentaram-se distribuídos de forma homogênea em toda a extensão da matriz, demonstrando um padrão uniforme de distribuição para todos os produtos. A confirmação

de que apenas os conídios foram corados foi demonstrada pelo controle (formulação com ausência de conídios), pois não foi observada emissão de fluorescência (dados não mostrados).

Figura 3: Imagens de microscopia de fluorescência de conídios corados com IP encapsulados na matriz. *Bead* seco em diferentes aumentos – a), b) e c); *bead* intumescido – d), e) e f). Note o perfil de distribuição monolítica dos conídios na matriz.



Fonte: Autor, 2017.

É importante ressaltar que a ausência de emissão de fluorescência nos *beads* sem conídios impossibilitaram a aquisição de imagens, esta ausência de emissão indica interação eficaz do cromógeno com o agente bioativo, o que satisfaz os requisitos metodológicos para viabilidade de aplicação da técnica. Tal resultado está de acordo com os dados encontrados na MEV.

Conclusões:

Os resultados encontrados são parte integrante de um conjunto de características importantes e promissoras que vêm sendo explanadas no decorrer de nossas pesquisas. Sistemas PLN deste tipo se mostram seguros para o ambiente, eficazes e de baixo custo, demonstrando potencial de aplicabilidade na encapsulação de diversos princípios ativos e agregando valor ao produto final. A capacidade de encapsulação satisfatória das matrizes testadas pode oferecer melhorias mecânicas, de estabilidade, proteção e liberação do agente bioativo. A forma com que os conídios são encapsulados, bem como sua distribuição na matriz podem influenciar fortemente como o produto se comportará no ambiente. As matrizes testadas possibilitaram a verificação de um sistema monolítico de distribuição [8], caracterizado pela localização aleatória e igualitária dos conídios por toda a massa interna dos *beads*, tal característica foi verificada concomitantemente pelas técnicas de MEV e microscopia fluorescência, que demonstraram a encapsulação satisfatória do bioativo, com excelente capacidade de recobrimento do silicato, características essenciais na obtenção de um produto padronizado, eficiente e seguro. Ao longo da pesquisa, esse produto vem apresentando alto potencial de aplicabilidade comercial, tendo em vista o MIP e conseqüente melhoria econômica, social e ambiental da nossa região.

Referências:

1. BATISTA, D. P. C. et al. Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. **RSC Advances**, 7, 26468-26477, 2017.
2. WU, Z.; GUO, L.; QIN, S.; LI, C. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 39, 317-327, 2012.
3. SINGH, B.; SHARMA, D. K.; GUPTA, A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch-alginate *beads* to control environmental and health. **Journal of Hazardous Materials**, 161, 208-216, 2009.